



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

BRUNA SANTANA DAS CHAGAS

**PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA EM MEIO À BASE DE MELAÇO DE
SOJA EM CULTIVO ESTÁTICO**

FORTALEZA

2018

BRUNA SANTANA DAS CHAGAS

**PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA EM MEIO À BASE DE MELAÇO DE
SOJA EM CULTIVO ESTÁTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientadora: Dra. Morsyleide de Freitas Rosa.

Co-orientadora: Dra. Maria de Fatima Borges

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C424p Chagas, Bruna Santana das.
Produção de celulose bacteriana em meio à base de melaço de soja em cultivo estático / Bruna Santana das Chagas. – 2018.
89 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2018.
Orientação: Profa. Dra. Morsyleide de Freitas Rosa.
Coorientação: Profa. Dra. Maria de Fatima Borges.

1. biopolímero. 2. Komagataeibacter. 3. hidrólise ácida. 4. etanol. I. Título.

CDD 660

BRUNA SANTANA DAS CHAGAS

**PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA EM MEIO À BASE DE MELAÇO
DE SOJA EM CULTIVO ESTÁTICO**

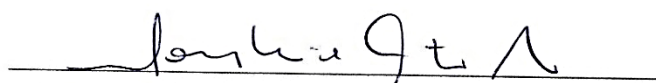
Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Engenharia Química
da Universidade Federal do Ceará como
requisito parcial para obtenção do título
de Mestre em Engenharia Química.

Orientadora: Dra. Morsyleide de Freitas
Rosa.

Co-orientadora: Dra. Maria de Fatima
Borges

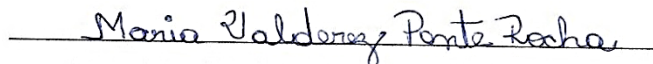
Data da aprovação: 12/06/2018

BANCA EXAMINADORA



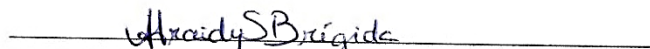
Dra. Morsyleide de Freitas Rosa (Orientadora)

Embrapa Agroindústria Tropical



Prof. Dra. Maria Valderez Ponte Rocha

Universidade Federal do Ceará (UFC)



Dra. Ana Iraidy Santa Brígida

Embrapa Agroindústria Tropical

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus por ter me dado força e sabedoria para superar as dificuldades durante o período da pesquisa.

Obrigada ao meu esposo André Felipi, que me encorajou e compreendeu minha ausência pelo tempo dedicado aos estudos. Agradeço aos meus pais Valdivino e Maria José e minha irmã Priscila, que me deram apoio e incentivo nas horas difíceis.

Agradeço à minha orientadora Dra. Morsyleide, que acreditou em meu potencial de uma forma a que eu não acreditava ser capaz de corresponder.

Agradeço à minha co-orientadora Dra. Fatima Borges por tudo que fez por mim nesse período do mestrado, sua orientação, suas dicas e observações foram cruciais para o trabalho. Agradeço também pelo incentivo, confiança e amizade.

Aos amigos e funcionários do Laboratório de Microbiologia de Alimentos pelo apoio e pelos dias que choraram e sorriram junto comigo nesses últimos meses. Sucesso na carreira de vocês.

Aos meus colegas de pós-graduação que perseveraram junto comigo pela conclusão do curso, sempre ofertando apoio uns aos outros.

Aos colegas e funcionários do Laboratório de Tecnologia da Biomassa que sempre me auxiliaram nas análises. Obrigada pela disposição, ajuda e atenção.

Agradeço à Prof^a. Dra. Maria Valderez e Dra. Fábila Karine por aceitarem prontamente o convite de fazerem parte da banca de qualificação. Agradeço à Dra. Maria Valderez e Dra. Ana Iraidy por aceitarem prontamente o convite de fazerem parte da banca de defesa.

A Embrapa pela estrutura e recursos oferecidos para a realização deste trabalho; e a CAPES pelo auxílio financeiro.

E, enfim, a todos aqueles que, embora não citados nominalmente, contribuíram direta e indiretamente para a execução deste trabalho.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”

(Marthin Luther King)

RESUMO

Celulose bacteriana (CB) é um biopolímero que apresenta aplicação na área biomédica, alimentícia, cosmética, entre outras. Contudo, sua produção em grande escala é limitada por, dentre alguns motivos, o custo do processo onde o meio de cultivo é responsável por até 30% do custo total de produção. Neste contexto, o melaço de soja (MS), coproduto de baixo custo da cadeia da soja, pode ser um substrato promissor para produção de CB, pois contém em sua composição fonte de carbono e nitrogênio para o processo fermentativo. O objetivo do trabalho foi produzir celulose bacteriana por *Komagataeibacter xylinus* ATCC 53582 utilizando melaço de soja como meio alternativo de fermentação em cultivo estático. Para aumentar o teor de açúcares fermentáveis o MS foi hidrolisado com ácido sulfúrico. Desse modo, foram realizados ensaios variando a proporção de ácido e MS e, posteriormente, um planejamento experimental para otimizar a hidrólise dos oligossacarídeos. A partir dos resultados dos ensaios foram formulados os meios de fermentação hidrolisados MSH75 (solução aquosa com 75 g/L de MS hidrolisada com 5% (v/v) H₂SO₄ 1M) e MSH100 (solução aquosa com 100 g/L de MS hidrolisada com 10% (v/v) H₂SO₄ 1M) tratados termicamente a 90 °C/10 min e, posteriormente, pH ajustado para 6,0. Também foram preparadas soluções controles nas quais não foram adicionadas ácido, denominadas MS75 e MS100, soluções aquosas com 75 g/L e 100 g/L de MS, respectivamente. Para fermentação os meios à base de MS e HS (meio de referência) com (1,0; 1,5 e 2,0% v/v) e sem adição de etanol foram inoculados com 10% (v/v) de cultura de *K. xylinus* e incubados a 30 °C/10 dias. Os meios à base de MS hidrolisados apresentaram maior produção de CB que os meios não hidrolisados devido à maior concentração de açúcares fermentáveis presentes no meio de cultivo. Contudo, a produção do biopolímero nos meios MSH75 e MSH100 foi inferior à do meio de referência HS, indicando necessidade de suplementação para aumentar a produção. A suplementação com etanol pode elevar a produção de CB, pois a bactéria oxida etanol a ácido acético que por meio do ciclo de Krebs sintetiza ATP influenciando na via metabólica para produção do biopolímero. A melhor produção do biopolímero foi observada no meio MSH75 suplementado com 2,0% (v/v) de etanol (MSH75+), apresentando uma produção de CB (aproximadamente 7 g/L) similar à do meio HS. A CB obtida do meio MSH75+ foi caracterizada e apresentou composição química padrão de CB, início de decomposição térmica em torno de 312 °C, índice de cristalinidade de 80%, morfologia das nanofibrilas com característica típicas de CB e boas propriedades mecânicas. Os resultados encontrados foram similares à celulose produzida em meio HS indicando que a composição dos meios de MS não afetou, de maneira expressiva, as propriedades do biopolímero. Além disso, o meio MSH75+ apresentou, em escala laboratorial, menor custo em sua elaboração (76%) quando comparado com meio HS. Portanto, o meio à base de melaço de soja hidrolisado e suplementado com etanol apresenta potencial como meio de fermentação para síntese de CB.

Palavras-chave: biopolímero; *Komagataeibacter*; hidrólise ácida; etanol.

ABSTRACT

Bacterial cellulose (BC) is a biopolymer that presents applications in the biomedical area, food, cosmetic, among others. However, its large-scale production is limited by, among some reasons, the cost of the process where the medium is responsible for up to 30% of the total cost of production. In this context, the soybean molasses (SM), a co-product of low cost soybean, may be a promising substrate for the production of BC because it contains carbon and nitrogen sources for the fermentation process. The objective of the work was to produce bacterial cellulose by *Komagataeibacter xylinus* ATCC 53582 in static culture, using soybean molasses as an alternative fermentation medium. To increase the content fermentable sugar, the SM was hydrolyzed with sulfuric acid. Thus, assays were performed varying the acid and SM ratio and, later, an experimental design to optimize the hydrolysis of the oligosaccharides. From the results of the tests the hydrolysed fermentation media were formulated HSM75 (75 g/L aqueous solution of SM hydrolyzed with 5% (v/v) H₂SO₄ 1M) and HSM100 (100 g/L aqueous solution of SM hydrolyzed with 10% (v/v) H₂SO₄ 1M) heat-treated at 90 °C/10 min and, thereafter, pH adjusted to 6,0. Control solutions were also prepared in which no acid was added, named MS75 and MS100, aqueous solutions with 75 g/L and 100 g/L of SM, respectively. For fermentation, the medium based on SM and HS (reference medium) with (1.0, 1.5 and 2.0% v / v) and without addition of ethanol were inoculated with 10% (v/v) culture of *Komagataeibacter xylinus* and incubated at 30 °C/10 days. Medium based on hydrolyzed SM showed higher BC production than unhydrolyzed medium due to the higher concentration of fermentable sugars present in the culture medium. However, the production of the biopolymer in HSM75 and HSM100 medium was lower than the reference HS medium, indicating the need for supplementation to increase its production. Ethanol supplementation may increase the production of BC because the bacterium oxidizes ethanol to acetic acid, which through the Krebs cycle synthesizes ATP influencing the metabolic pathway to produce the biopolymer. The best biopolymer production was observed in the HSM75 medium supplemented with 2,0% (v/v) ethanol (HSM75+), presenting a production of CB (approximately 7 g/L) similar to the HS medium. The BC obtained from HSM75+ medium was characterized and showed a chemical composition of BC standard, beginning thermal decomposition at around 312 °C, crystallinity index of 80%, morphology of the nanofibrils with typical characteristics of BC and good mechanical properties. The results found were similar to the cellulose produced in HS medium indicating that the composition of the SM medium did not significantly affect the properties of the biopolymer. In addition, on laboratory scale, the HSM75+ medium presented a lower cost in its elaboration (76%) when compared to HS medium. Therefore, the soybean molasses medium hydrolyzed and supplemented with ethanol has potential as a fermentation medium for CB synthesis.

Keywords: biopolymer; *Komagataeibacter*; acid hydrolysis; ethanol.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Esquema (a) das ligações de hidrogênio intramoleculares e intermoleculares que estão presentes na celulose e (b) da interação entre as fibrilas na formação da região cristalina e amorfa das microfibrilas de celulose.....	19
Figura 2 -	Esquema da via metabólica para síntese de celulose bacteriana por <i>Komagataeibacter xylinus</i>	20
Figura 3 -	a) Microscopia explicativa da formação da celulose bacteriana a) <i>Komagataeibacter xylinus</i> excretando fibrilas elementares; b) rede tridimensional formada pela bactéria.....	21
Figura 4 -	Imagens da película de CB. (a) imagem óptica da CB mostrando direcionalidade para as imagens b e c. Imagem MEV de emissão de campo mostrando a (b) a rede CB de baixa densidade no plano e (c) a estrutura transversal.....	22
Figura 5 -	Celulose bacteriana formada na fermentação em cultivo a) estático e b) agitado produzida por <i>Komagataeibacter xylinus</i> K975.....	25
Figura 6 -	Fluxograma da produção do melaço da soja.....	29
Figura 7 -	Influência do etanol na via metabólica para a produção de celulose bacteriana.....	32
Figura 8 -	Esquema da avaliação da influência da concentração de ácido sulfúrico e de MS no tratamento de hidrólise.....	35
Figura 9 -	Hidrólise do melaço de soja com H ₂ SO ₄ 1M.....	36
Figura 10 -	Resumo esquemático para obtenção de CB e preparação das membranas para caracterização.....	39
Figura 11 -	Concentração de glicose e açúcares redutores (A) e conversão dos açúcares totais em glicose e açúcares redutores (B) em solução aquosa com 150 g/L de melaço de soja após hidrólise ácida (90 °C/10 min) com diferentes volumes de ácido sulfúrico.....	46
Figura 12 -	Concentração de glicose e açúcares redutores (A) e conversão dos açúcares totais em glicose e açúcares redutores (B) em diferentes concentrações de soluções aquosa de melaço de soja após hidrólise ácida (5% v/v de H ₂ SO ₄ 1M) submetido a tratamento térmico a 90 °C por 10 minutos.....	48

Figura 13 -	Gráfico de Pareto para os termos lineares e quadráticos de açúcar redutor, gerado a partir do planejamento experimental.....	50
Figura 14 -	Superfície de resposta e curvas de contorno para açúcares redutores.....	51
Figura 15 -	Concentração de nitrogênio, glicose e açúcar redutor presentes nos meios de fermentação à base de melaço de soja (hidrolisado e não hidrolisado) e HS.....	53
Figura 16 -	Produção de CB por <i>K. xylinus</i> em meio à base de melaço de soja e HS suplementados com diferentes concentrações de etanol, após 10 dias de fermentação a 30 °C.....	55
Figura 17 -	Membranas de celulose bacteriana produzidas em meios HS e MS (hidrolisado e não hidrolisado) com e sem suplementação com etanol (v/v) após 10 dias de fermentação em cultivo estático a 30 °C.....	57
Figura 18 -	Perfil da fermentação por <i>K. xylinus</i> no meio MSH75 suplementado com 2% (v/v) de etanol (■) e HS (●) sob condição estática durante 15 dias de cultivo a 30 °C. (A) Consumo de glicose; (B) Consumo de AR (■) e AT (●) no meio MSH75 suplementado com 2% (v/v) de etanol; (C) pH; (D) Produção CB; (E) Rendimento sobre os açúcares consumidos e (F) Produtividade.....	59
Figura 19 -	Membranas de CB em meio MSH75 suplementado com 2% (v/v) de etanol (A) e HS (B) obtidas em diferentes intervalos de fermentação durante 15 dias de cultivo estático a 30 °C.....	60
Figura 20 -	Espectros de FTIR de CB obtida nos meios HS e MSH75 com (+) /sem (-) suplementação com 2% de etanol.....	63
Figura 21 -	Curvas termogravimétricas (A) e DTG (B) das membranas de CB obtida nos meios HS e MSH75 com (+) e sem (-) suplementação com 2% de etanol.....	64
Figura 22 -	Difratogramas de raios X de CB obtidas em meios HS e MSH75 com (+) e sem (-) suplementação com etanol.....	66

Figura 23 -	Micrografias das membranas de CB obtidas nos meios HS e MSH75 com (+) e sem (-) suplementação com 2% de etanol (aumento de 75000x)	67
Figura 24 -	Ensaio de tração da CB obtida em meio MSH75+ antes (a) e após (b) a ruptura completa da membrana.....	71
Figura 25 -	Participação de custo (%) dos diferentes componentes de meio HS.	72
Figura 26 -	Participação de custo (%) dos diferentes elementos no preparo do meio à base de melaço de soja hidrolisado e suplementado com etanol.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Produção de celulose bacterina em diferentes subprodutos em cultivo estático.....	26
Tabela 2 - Níveis e parâmetros utilizados no planejamento do estudo da hidrólise do melaço de soja.....	37
Tabela 3 - Ensaios do planejamento experimental DCCR com valores originais e codificados das variáveis no estudo da hidrólise dos oligossacarídeos presentes no melaço de soja.....	38
Tabela 4 - Caracterização físico-química do melaço de soja.....	44
Tabela 5 - Condições experimentais do planejamento e variável de resposta....	49
Tabela 6 - Análise de variância para a variável concentração de açúcar redutor.....	51
Tabela 7 - Concentração de açúcares totais nos meios à base de melaço de soja e HS.....	54
Tabela 8 - Temperaturas e perdas de massa da CB obtida nos meios HS e MSH75 com (+) e sem (-) suplementação com 2% de etanol.....	65
Tabela 9 - Índice de cristalinidade das membranas de CB obtidas em meios HS e MSH75 com (+) e sem (-) suplementação com etanol.....	67
Tabela 10 - Dimensões das nanofibras das membranas de CB obtidas em meios HS e MSH75 com (+) e sem (-) suplementação com etanol.....	69
Tabela 11 - Propriedades mecânicas das membranas de CB obtidas nos meios HS e MSH75 com (+) e sem (-) suplementação com etanol.....	70
Tabela 12 - Estimativa de custo para obtenção de 1 litro de meio HS.....	72
Tabela 13 - Estimativa de custo para obtenção de 1 litro de meio à base de melaço de soja hidrolisado e suplementado com etanol.....	73
Tabela 14 - Produção de CB em meio à base de melaço de soja e HS com custos do meio de produção.....	74

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	OBJETIVO GERAL.....	17
2.1	Objetivos específicos	17
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1	Celulose: aspectos gerais.....	18
3.2	Celulose bacteriana.....	19
3.3	Biossíntese da celulose bacteriana.....	20
3.4	Propriedades e aplicações.....	22
3.5	Meios de fermentação e condições de cultivo para produção de celulose bacteriana.....	23
3.6	Soja.....	28
3.7	Melaço de soja.....	28
3.8	Hidrólise dos açúcares do melaço de soja.....	30
3.9	Suplementação com etanol.....	30
3.10	Técnicas para caracterização do biopolímero.....	32
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	34
4.1	Caracterização do melaço de soja.....	34
4.2	Hidrólise ácida do melaço de soja.....	34
4.2.1	<i>Influência do ácido sulfúrico na hidrólise.....</i>	35
4.2.2	<i>Influência da concentração de melaço de soja.....</i>	35
4.2.3	<i>Planejamento experimental para otimizar a hidrólise.....</i>	37
4.3	Produção de celulose bacteriana.....	39
4.3.1	<i>Microrganismo.....</i>	39
4.3.2	<i>Preparo do inóculo para fermentação.....</i>	39
4.3.3	<i>Preparo dos meios e produção da celulose bacteriana.....</i>	40
4.3.4	<i>Caracterização dos meios de fermentação.....</i>	40
4.3.5	<i>Purificação e neutralização.....</i>	41
4.4	Determinações analíticas.....	41
4.5	Perfil da fermentação na síntese de celulose bacteriana.....	41

4.6	Caracterização das membranas de celulose bacteriana.....	42
4.7	Estimativa de custo do meio de fermentação em escala laboratorial.....	43
4.8	Análise estatística.....	43
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
5.1	Caracterização do melaço de soja.....	44
5.2	Hidrólise ácida do melaço de soja	45
5.2.1	<i>Influência do ácido sulfúrico na hidrólise.....</i>	45
5.2.2	<i>Influência da concentração de melaço de soja.....</i>	47
5.2.3	<i>Planejamento experimental para otimizar a hidrólise.....</i>	49
5.3	Caracterização dos meios de cultivo.....	52
5.4	Produção da celulose bacteriana.....	54
5.4.2	<i>Produção de celulose bacteriana em melaço de soja hidrolisado e HS.</i>	55
5.4.3	<i>Produção de celulose bacteriana com suplementação com etanol.....</i>	56
5.5	Perfil da fermentação na síntese de celulose bacteriana.....	58
5.6	Caracterização da celulose bacteriana.....	62
5.6.1	<i>Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)</i>	62
5.6.2	<i>Análise Termogravimétrica (TGA)</i>	63
5.6.3	<i>Difração de Raios X (DRX)</i>	66
5.6.4	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i>	68
5.6.5	<i>Ensaio mecânicos.....</i>	70
5.7	Estimativa de custo do meio de fermentação em escala laboratorial.....	71
6	CONCLUSÕES	74
	REFERÊNCIAS.....	75

1. INTRODUÇÃO

Celulose bacteriana (CB) é um biopolímero sintetizado por diversos gêneros de microrganismos. O gênero *Komagataeibacter*, anteriormente *Gluconacetobacter* (YAMADA *et al.*, 2012), apresenta capacidade superior de produção de CB e seu rendimento pode ser potencializado dependendo da fonte de carbono e nitrogênio usada no meio de cultivo (LIN *et al.*, 2013; SANTOS; CARBAJO; VILLAR, 2013). Além disso, a produção do biopolímero depende da temperatura, pH e suplementação (CHAWLA *et al.*, 2009). Variando esses parâmetros, a CB obtida pode apresentar composição, morfologia e propriedades diferentes (HU *et al.*, 2014).

A CB possui propriedades mecânicas únicas relacionadas às características intrínsecas da macromolécula de celulose, é sintetizada com elevada pureza, pois não possui lignina e hemicelulose como a celulose das plantas, tornando-se uma fonte de celulose pura (MOHITE; PATIL, 2014). Além disso, apresenta alta porosidade, excelente poder de absorção, elevada cristalinidade, biodegradabilidade e biocompatibilidade (SHAH *et al.*, 2013). Essas características a tornam promissora para ser utilizada em diferentes aplicações na indústria biomédica, alimentícia, cosmética, têxtil e eletrônica (GALLEGOS *et al.*, 2016).

Atualmente aplicação da CB é limitada devido ao alto custo de produção, incluindo o meio de cultura. O meio sintético HS (HESTRIN; SCHRAMM, 1954), composto por glicose, extrato de levedura, peptona, ácido cítrico e fosfato de sódio bibásico, é tradicionalmente utilizado como meio de cultivo para produção de CB. A glicose como única fonte de carbono atua não só como uma fonte de energia, mas também como um precursor de celulose (CAMPANO *et al.*, 2016). A formulação do meio HS apresenta elevado custo, dessa forma, estratégias como a formulação de meios de fermentação de baixo custo estão sendo propostas visando reduzir os custos deste processo.

Vários substratos têm sido avaliados quanto ao seu potencial na obtenção de CB. Dentre esses substratos incluem a utilização e aproveitamento de subprodutos agroindustriais como meio de cultura alternativo para a síntese do biopolímero como, líquido de sisal (LIMA *et al.*, 2017), extrato de algaroba (NASCIMENTO *et al.*, 2016), glicerol (VAZQUEZ *et al.*, 2013) entre outros. Esses subprodutos são ricos em açúcares (glicose, frutose, galactose e sacarose) e podem ser promissores para a produção industrial do biopolímero. Contudo, ainda há uma demanda por novos substratos alternativos, de baixo custo, que já apresentem fonte de carbono e nitrogênio para o desenvolvimento microbiano, tendo em vista reduzir gastos com suplementação de elevado custo.

O melaço de soja (MS) é o principal subproduto gerado no processamento industrial da soja para produzir o concentrado proteico. Apresenta elevado teor de carboidratos, proteínas, lipídios e minerais podendo ser utilizado como meio de fermentação para o crescimento microbiano (KARP *et al.*, 2016). O MS também é utilizado para alimentação animal, fertilizantes e aplicação industrial (siderurgia, refrataria e briquetes). Apresenta em sua composição química elevado teor de oligossacarídeo e baixo teor de monossacarídeos (SIQUEIRA *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2012). Devido à baixa concentração de açúcares simples, a hidrólise dos oligossacarídeos presentes no MS, pode ser uma alternativa para aumentar o rendimento do processo, pois eleva a concentração de açúcares fermentescíveis (KARP *et al.*, 2016).

Para elevar a síntese de CB, é importante otimizar o meio de fermentação. Para tal, podem ser adicionados suplementos ao meio de cultivo como o etanol que é utilizado como fonte de carbono e fonte de energia para a geração de ATP. Este último, inibi a atividade enzimática da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) favorecendo a via metabólica para síntese do biopolímero (KIM *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2012). Desse modo, o aumento da produção de CB pela adição de etanol ao meio de cultivo tem sido relatado em alguns estudos (LI *et al.*, 2012; SON *et al.*, 2003; GOMES, 2017; GULLO, 2017).

As condições de fermentação influenciam na estrutura química da CB podendo afetar as propriedades do biopolímero (SHEZAD *et al.*, 2010). Assim, torna-se necessário investigar as possíveis modificações nas propriedades físico-químicas das membranas de CB produzidas a partir de um meio alternativo. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi produzir celulose bacteriana em cultivo estático utilizando melaço de soja como substrato alternativo de fermentação e caracterizar o biopolímero sintetizado por *Komagataeibacter xylinus* ATCC 53582.

2. OBJETIVO GERAL

Produzir celulose bacteriana em cultivo estático utilizando melaço de soja como meio alternativo de fermentação para cepa *Komagataeibacter xylinus* ATCC 53582 e caracterizar o biopolímero produzido.

2.1 Objetivos específicos

- Definir as melhores condições para hidrólise ácida do melaço de soja.
- Produzir celulose bacteriana em meio de fermentação à base de melaço de soja hidrolisado.
- Determinar o efeito da suplementação do meio com etanol na produção de celulose bacteriana.
- Caracterizar o biopolímero por Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Análise Termogravimétrica (TGA), Difração de Raios-X (DRX), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e ensaios mecânicos.
- Estimar o custo para formulação, em escala laboratorial, do meio à base de melaço de soja hidrolisado suplementado com etanol e meio de referência.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

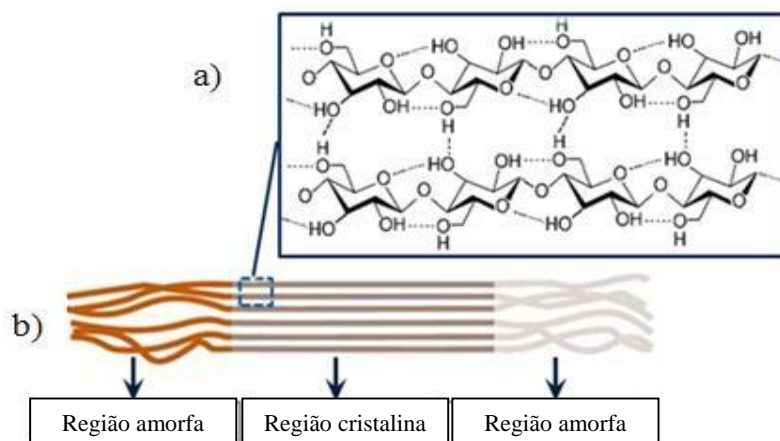
3.1 Celulose: aspectos gerais

A celulose ($C_6H_{10}O_5$)_n é o polímero mais abundante na natureza, podendo ser encontrada em plantas ou sintetizada por algas marinhas, musgos e bactérias. Independentemente da fonte, é um homopolissacarídeo linear composto por unidades D-glicopirranose ligadas entre si por ligações β-1-4 glicosídica. A ligação glicosídica ocorre entre o oxigênio ligado covalentemente ao átomo de carbono 1 de uma molécula de glicose e o átomo de carbono 4 da molécula de glicose adjacente (EICHORN *et al.*, 2010; ABDUL; BHAT; IREANA, 2012). Os grupos hidroxilas livres nas moléculas formam ligações de hidrogênio intramoleculares entre grupos hidroxila da mesma molécula e intermoleculares, entre grupos hidroxilas de cadeias adjacentes. Essas ligações são responsáveis pela rigidez do polímero e pela formação das estruturas tridimensionais (Figura 1a) (SHEN; GNANAKARAN, 2009).

As cadeias formadas pela ligação dos monômeros de glicose são denominadas fibrilas elementares. As fibrilas se agregam através das ligações de hidrogênio na forma de microfibrilas. A reunião das microfibrilas origina as microfibras e estas se agrupam gerando as fibras celulósicas. No processo de formação das microfibrilas são originadas regiões onde as cadeias de celulose estão dispostas numa estrutura altamente ordenada (cristalinas) e regiões que são desordenadas (amorfas) (MOON *et al.*, 2011) (Figura 1b). A proporção entre as regiões cristalina e amorfa determina o índice de cristalinidade (IC) do polímero, visto que o domínio cristalino e amorfo afetam as propriedades mecânicas das fibras de celulose. A fase cristalina tende a aumentar a rigidez e a resistência à tração (VIEILLE; AUCHER; TALEB, 2012).

A celulose é um dos materiais naturais mais utilizados e tem sido tradicionalmente usada para fabricação de papel, além de outras aplicações. A celulose vegetal é bastante conhecida, entretanto, algumas bactérias ganharam atenção como fonte alternativa e sustentável de celulose, denominada celulose bacteriana (CB). A celulose vegetal e a CB apresentam mesma fórmula molecular, mas a segunda tem vantagens competitivas que atraíram atenção para sua produção. Em comparação com a celulose vegetal, a CB apresenta excelentes propriedades físicas em relação a estabilidade mecânica, resistência à tração, termoestabilidade, cristalinidade, pureza e biocompatibilidade (BARUD *et al.*, 2011; CACICEDO *et al.*, 2016).

Figura 1 – Esquema (a) das ligações de hidrogênio intramoleculares e intermoleculares que estão presentes na celulose e (b) da interação entre as fibrilas na formação da região cristalina e amorfa das microfibrilas de celulose.



Fonte: Adaptado ZHOU; WU (2012).

3.2 Celulose bacteriana

A CB foi inicialmente descrita por Brown em 1886, quando foi observada a formação de uma manta gelatinosa na superfície do caldo de fermentação do vinagre. A estrutura identificada era quimicamente semelhante à celulose vegetal e por análise microscópica evidenciou-se que havia presença de bactérias distribuídas por toda área superficial da película (BROWN, 1886).

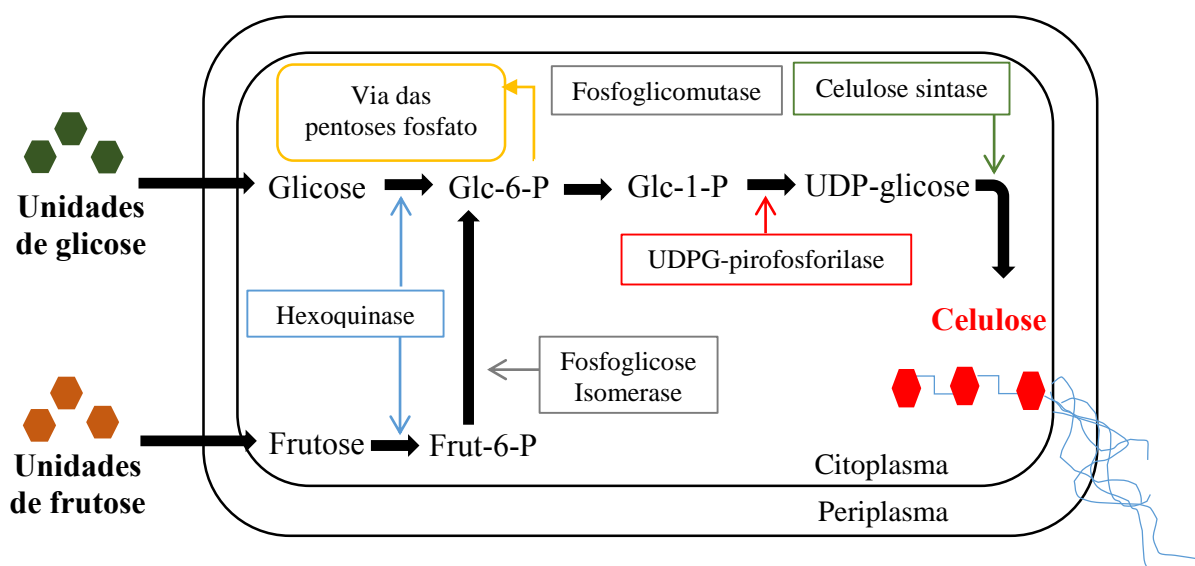
O biopolímero pode ser sintetizado por diversos gêneros de microrganismos como: *Komagataeibacter* (LIMA *et al.*, 2017; UZYOL; SAÇAN, 2017), *Aerobacter* (CANNON; ANDERSON, 1991), *Achromobacter* (FARAG *et al.*, 2016), *Agrobacterium* (BARNHART *et al.*, 2013), *Alcaligenes* (FIEDLER *et al.*, 1989), *Pseudomonas* (UDE *et al.*, 2006), *Rhizobium* (ROBLEDO *et al.*, 2012), *Sarcina* (YANG *et al.*, 2013a) e *Salmonella* (GARCIA *et al.*, 2004).

O gênero *Komagataeibacter* é o mais estudado devido sua produção de celulose ser significativamente elevada e por sintetizar celulose a partir de diferentes fontes de carbono (glicose, frutose, melaço, glicerol ou outros substratos orgânicos) e nitrogênio, tornando-se de grande interesse econômico (CHAWLA *et al.*, 2009). Esse gênero de microrganismo pode ser encontrado na natureza em frutas, vegetais e em produtos fermentados como vinagre e bebidas alcoólicas (HUANG *et al.*, 2014; NEERA; RAMANA; BATRA, 2015).

3.3 Biossíntese da celulose bacteriana

A biossíntese da CB é uma reação que envolve várias etapas enzimáticas, complexos catalíticos e proteínas reguladoras. Dependendo da fonte de carbono utilizada o microrganismo segue vias metabólicas distintas para produção de CB. Quando a glicose é utilizada como substrato envolve quatro etapas enzimáticas. Inicialmente a glicose é transportada para o interior do citoplasma bacteriano onde ocorre a fosforilação de glicose para glicose-6-fosfato pela enzima hexoquinase (1); isomerização de glicose-6-fosfato a glicose-1-fosfato pela fosfoglicomutase (2); síntese de UDP-glicose pela UDPG-pirofosforilase (3) e produção de celulose a partir de UDP-glicose pela celulose sintase (4) (LEE *et al.*, 2014). O esquema geral da biossíntese da CB pode ser representado conforme a Figura 2.

Figura 2 - Esquema da via metabólica para síntese de celulose bacteriana por *Komagataeibacter xylinus*.



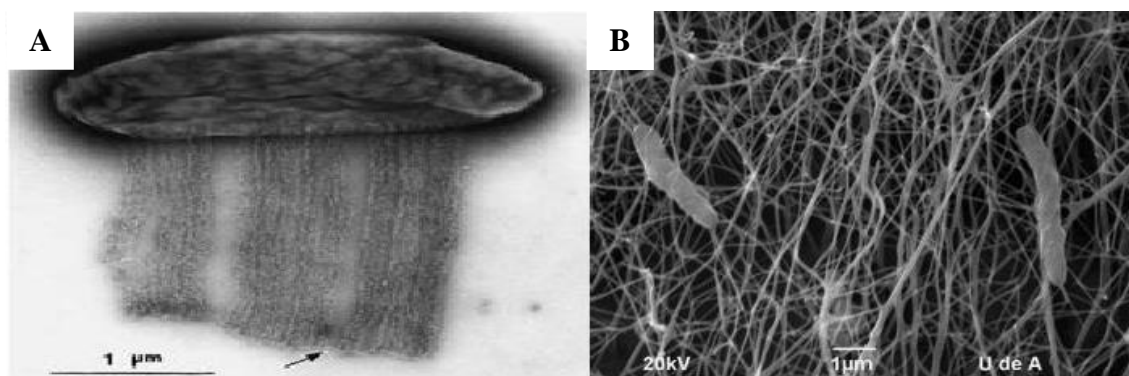
Fonte: Adaptado LEE *et al.* (2014) e NARITOMI *et al.* (1998).

A produção de CB a partir da frutose envolve a enzima hexoquinase que fosforila a frutose para frutose-6-fosfato e, posteriormente, a isomerização da frutose-6-fosfato para glicose-6-fosfato pela enzima fosfoglicose isomerase. A partir desse ponto a via metabólica para produção de CB segue o mesmo caminho da síntese do biopolímero utilizando de glicose. Já para produção de CB a partir de dissacarídeos, tal como a sacarose, a biossíntese do biopolímero inicia-se no periplasma da célula com a hidrólise dos dissacarídeos em monossacarídeos, como glicose e frutose (LEE *et al.*, 2014). Assim, a adequação de um determinado substrato pode ser entendida em termos de duas vias anfibólicas operativas por

bactérias produtoras de CB: o ciclo das pentoses para a oxidação de carboidratos e o ciclo de Krebs para a oxidação de ácidos orgânicos e compostos relacionados. A síntese de CB é fortemente associada ao catabolismo pelos processos de oxidação e consome até 10% de energia derivada de reações catabólicas. A produção do biopolímero não interfere nos outros processos, como na síntese de proteínas. Portanto, segue ciclo pentose fosfato ou o ciclo de Krebs juntamente com a gliconeogênese (ROSS *et al.*, 1991).

Após a polimerização de monômeros de glicose em cadeias 1→4 glucanas, ocorre a excreção extracelular das cadeias lineares e organização e cristalização das cadeias de glucanas dispostas em tiras. A bactéria excreta as fibrilas elementares, cerca de 1,5 nm de largura, por meio dos complexos terminais que são associados com os poros superficiais das células (Figura 3a) (ROSS *et al.*, 1991). A organização e a cristalização são realizadas a partir dos grupos hidroxilas livres dispostos nas cadeias de celulose que através de ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals formam uma rede de nanofibras com diâmetro entre 20-90 nm (Figura 3b) (LIN; DUFRESNE, 2014; SHI *et al.*, 2014).

Figura 3 – Microscopia explicativa da formação da celulose bacteriana a) *Komagataeibacter xylinus* excretando fibrilas elementares; b) rede tridimensional formada pela bactéria.



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

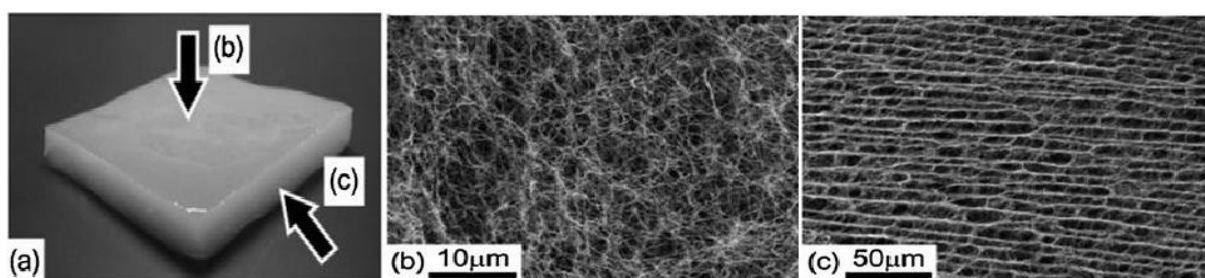
A razão pela qual as bactérias geram celulose não está bem estabelecida, pois é parte de seu metabolismo, mas tem sido sugerido que a membrana formada na interface ar/líquido permite as bactérias aeróbias moverem-se para a superfície possibilitando obter oxigênio com maior facilidade para seu crescimento. Além disso, o mecanismo de flotação previne a desidratação do substrato, serve como proteção contra a luz ultravioleta e atua como uma barreira contra o crescimento de outros microrganismos não produtores do biopolímero (CASTRO *et al.*, 2011; RAJWADE; PAKNIKAR; KUMBHAR, 2015).

3.4 Propriedades e aplicações

A CB possui a mesma fórmula molecular da celulose vegetal (CV); contudo, apresenta propriedades físicas e químicas diferentes. As propriedades físicas superiores são atribuídas, principalmente, ao tamanho das fibras que são de caráter nanométrico contra o micrométrico da vegetal e ao elevado grau de polimerização (2000-8000) (TABUCHI, 2007). Apresenta atributos como elevada resistência mecânica, grande capacidade de retenção de água, biocompatibilidade, biodegradabilidade, além de ser atóxica. Possui alto grau de pureza, livre de lignina, hemicelulose e pectina, que precisam ser removidos durante a purificação da CV (CHAWLA *et al.*, 2009; BARUD *et al.*, 2011). As redes de nanofibras de CB conferem grande área superficial e elevada porosidade. A Figura 4 apresenta as imagens da membrana de CB de diferentes ângulos possibilitando observar a estrutura do biopolímero. Além disso, a cristalinidade e a resistência mecânica da CB são superiores aos da CV (SHAH *et al.*, 2013).

As propriedades da CB são afetadas por fatores como as condições de fermentação, o microrganismo e os meios de fermentação empregados. Esse biopolímero oferece capacidade de modificação superficial, fácil manuseio e nenhum risco para a saúde, enquanto que a maioria dos polímeros sintéticos apresentam riscos significativos para a saúde, como irritação da pele e doenças respiratórias (IQBAL *et al.*, 2014).

Figura 4 - Imagens da película de CB. (a) imagem óptica da CB mostrando direcionalidade para as imagens b e c. Imagem MEV de emissão de campo mostrando a (b) a rede CB de baixa densidade no plano e (c) a estrutura transversal.



Fonte: MOON *et al.* (2011).

Em função de suas propriedades, a CB é considerada um material com grande potencial de aplicação, sendo utilizada na área de alimentos, farmacêutica, têxtil, eletrônica, engenharia de tecidos, cosmética, odontologia e medicina (WANG; CHEN, 2011; MOHITE; PATIL, 2014; RAJWADE; PAKNIKAR; KUMBHAR, 2015). Segundo Gallegos *et al.* (2016), CB é um material de fonte sustentável que oferece diversas utilizações na área de biotecnologia industrial e setores biomédicos para produzir produtos de valor agregado.

Inicialmente a CB foi utilizada no sudeste asiático como fibra dietética denominada nata de coco, uma sobremesa servida em cubos (PHISALAPHONG; CHIAOPRAKOBKIJ, 2012). Atualmente algumas aplicações vem sendo investigadas como na elaboração de curativo para feridas (LIN *et al.*, 2013; CHANG; CHEN, 2016; QIU *et al.*, 2016), dispositivos de liberação de fármacos (ABEER; MOHD AMIN; MARTIN, 2014), regeneração de tecidos (AHN *et al.*, 2015; BARUD *et al.*, 2015; DUARTE *et al.*, 2015), lentes de contato terapêuticas para regeneração da córnea (BARUD *et al.*, 2016), estabilizante de alimentos (SHI *et al.*, 2014), cosméticos (HASAN; BIAK; KAMARUDIN, 2012; NUMATA; MAZZARINO; BORSALI, 2015), embalagens (ZHU *et al.*, 2010), implantes dentários (SHAH *et al.*, 2013), dispositivos eletricamente condutores (PINEDA; MESA; RIASCOS, 2012), sensores, eletrodos e monitores flexíveis (HU *et al.*, 2011; SHI *et al.*, 2012).

Embora a CB apresente aplicações em diferentes áreas sua produção em grande escala é limitada devido ao custo do processo e às limitações do cultivo estático. O cultivo sob condições estáticas requer grande área da superfície da cultura, isto é, quanto maior a área da superfície, maior a produção de CB, que é inadequado para culturas de grande escala (SHODA; SUGANO, 2005). Além disso, requer um longo período de cultivo resultando em baixa produtividade (CHAWLA *et al.*, 2009; TYAGI; SURESH, 2016). Já a produção de CB em cultivo agitado, apesar de fornecer taxas de produção mais altas de CB, apresenta o desenvolvimento de cepas mutantes não produtoras de CB que frequentemente aparecem espontaneamente em culturas agitadas de bactérias; além disso, o biopolímero sintetizado em cultura agitada, devido ao estresse resultante do cisalhamento, apresenta resistência mecânica, grau de polimerização, índice de cristalinidade e módulo de elasticidade inferior à CB produzida em cultivo estático (BRANDES *et al.*, 2017; KRYSTYNOWICZ *et al.*, 2002). Assim, a CB sintetizada em cultivo estático apresenta melhores propriedades que às do cultivo agitado. Desse modo, estudos visam aprimorar o processo de produção de CB em cultivo estático com o objetivo de alcançar maiores rendimentos com redução de custos através do uso de meios de fermentação alternativos.

3.5 Meios de fermentação e condições de cultivo para produção de celulose bacteriana

O meio sintético HS tem sido o meio de fermentação mais utilizado na produção de CB, sendo considerado como referência para a síntese desse biopolímero. Esse meio é composto de glicose, extrato de levedura, peptona, além de ácido cítrico e fosfato de sódio, pois, para produção da CB o microrganismo requer, especialmente, fonte de carbono e

nitrogênio. Apesar de suas inúmeras aplicações industriais da CB, o elevado custo do processo e do meio tem limitado a produção de CB em maior escala, no qual o meio de cultivo é responsável por até 65% do custo da fermentação, o que corresponde a 30% do custo total do processo produtivo (RIVAS *et al.*, 2004; JOZALA *et al.*, 2015). Isso vem impulsionando a busca de novas fontes de carbono como meio fermentativo em substituição ao meio sintético. A utilização de subproduto agroindustriais é uma alternativa, pois favorece a produção da CB com custo reduzido, possibilitando a produção de polímeros de carboidratos de alto valor (CB) e reduzindo o impacto ambiental (HUANG *et al.*, 2014).

A utilização de algumas fontes alternativas para fermentação pode provocar alterações nas características do biopolímero, pois sua produção pode ser afetada pelas condições de cultivo, tais como a composição do meio de cultura, pH, temperatura, cepa utilizada, tipo de cultivo (estático ou agitado), proporção de inóculo, volume de meio (relação área/volume) e oxigênio dissolvido no meio de fermentação (CAMPANO *et al.*, 2016; RUKA *et al.*, 2012).

O meio de fermentação deve apresentar fonte de carbono, nitrogênio e outros macro e micronutrientes necessários para o crescimento microbiano. Usualmente, a fonte de carbono mais utilizada é a glicose, porém, podem ser utilizadas outras fontes de carbono como sacarose, frutose, manitol, glicerol e xilose (RANI; APPAIAH, 2011; RUKA *et al.*, 2012; RAGHUNATHAN, 2013; SINGHSA *et al.*, 2018). A fonte de nitrogênio é importante para a produção de CB, pois pode fornecer não só aminoácidos, mas também vitaminas e sais minerais para as bactérias. Extrato de levedura e peptona, que são os componentes básicos do meio de referência HS são as fontes de nitrogênio preferencialmente utilizadas para síntese do biopolímero (CAMPANO *et al.*, 2016). A Tabela 1 apresenta várias fontes de carbono e nitrogênio obtidas a partir de substratos alternativos, tais como, extratos vegetais, melaços, xarope, hidrolisados de biomassa vegetal, suco de fruta, dentre outros, utilizadas para produção de CB em cultivo estático.

Fontes de carbono (monossacarídeos, dissacarídeos e polissacarídeos) e nitrogênio (orgânico e inorgânico) foram avaliadas para produção de CB por *K. hansenii* UAC09 e observou-se que glicose e peptona foi a melhor fonte de carbono e nitrogênio, respectivamente (RANI; APPAIAH, 2011). O efeito da concentração inicial de glicose na produção de CB também é importante, pois o ácido glucônico é formado como um subproduto durante o cultivo quando a glicose é utilizada e, portanto, diminui o pH do meio de cultura, que por sua vez afeta a síntese de CB (KESHK, 2014).

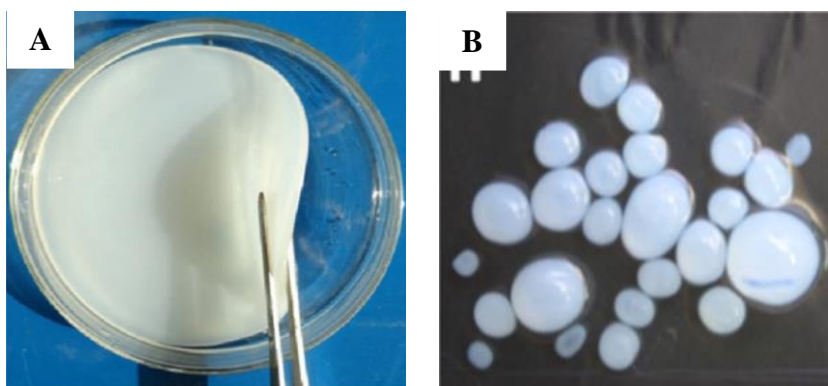
O pH ótimo para o crescimento de bactérias e produção de BC depende em

particular da cepa usada, mas geralmente está na faixa de 4-7 (LEE *et al.*, 2014). Os valores ótimos de pH variam de 4,5 a 7,5 com a maior eficiência localizada em torno de 6,5, enquanto abaixo do valor de 3,5 a síntese de celulose é inibida (ÇOBAN; BIYIK, 2011; SON *et al.*, 2001). O pH do meio de cultura pode diminuir em função do tempo devido ao acúmulo de metabólitos secundários, como ácidos glucônico, acético ou láctico que são produzidos durante o consumo de açúcares e fontes de nitrogênio (RAGHUNATHAN, 2013). Desse modo, é importante a escolha de um pH ideal do meio de cultura para obtenção de uma maior produção de CB.

A temperatura é um parâmetro fundamental, pois afeta o crescimento e a produção de celulose. Na maioria dos estudos a produção máxima de celulose foi observada entre 28 e 30 °C (Tabela 1). A temperatura ideal para síntese do biopolímero é de 30 °C, enquanto que, o aumento para 35 °C reduz a produção da CB (SON *et al.*, 2001).

A síntese de CB pode ocorrer em cultivo estático e agitado. No estático é formada uma película gelatinosa na interface ar-líquido, enquanto que, no agitado há produção de esferas de celulose (*pellets*) dispersas no meio (Figura 5). A celulose produzida em sistemas agitados apresenta um menor grau de polimerização (DP), cristalinidade e módulo de elasticidade quando comparada a celulose produzida sob cultivo estático (BRANDES *et al.*, 2017). A redução da cristalinidade pode ser atribuída ao esforço de cisalhamento durante a agitação. A cultura agitada resulta em estrutura reticulada tridimensional altamente ramificada, enquanto que a cultura estática produz uma película de celulose com uma estrutura lamelar e com menos ramificações (KESHK, 2014; SHI *et al.*, 2014).

Figura 5 – Celulose bacteriana formada na fermentação em cultivo a) estático e b) agitado produzida por *Komagataeibacter xylinus* K975.



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

Tabela 1 – Produção de celulose bacterina em diferentes subprodutos em cultivo estático.

Substratos	Cepa	Fonte de carbono	Suplementação	pH	Temperatura (°C)	Dias de fermentação	Produção (g/L)	Literatura
Águas residuais de jujuba cristalizada (hidrolisado)	<i>K. xylinus</i> CGMCC 2955	Glicose	Citrato de amônio, fosfato de sódio, carbonato de cálcio	-	30	6	2,3	Li <i>et al.</i> (2015)
Casca e bagaço de frutas cítricas	<i>K. xylinus</i> CICC 10529	Glicose e xilose	Extrato de levedura, etanol e peptona	5,0	30	8	5,7	Fan <i>et al.</i> (2016)
Efluente de destilaria	<i>K. oboediens</i>	Frutose, glicose e sacarose	-	4,7	30	8	8,5	Jahan <i>et al.</i> (2018)
Extrato de açúcares da madeira extraídos com água quente	<i>K. hansenii</i> ATCC 23769	Glicose e xilose	-	8,0	28	10	0,2	Kiziltas <i>et al.</i> (2015)
Extrato de algaroba	<i>K. hansenii</i> ATCC 23769	Glicose, frutose e celobiose	Extrato de levedura	4,0	30	5	1,2	Nascimento <i>et al.</i> (2016)
Extrato de lichia	<i>K. xylinus</i> CH001	Frutose	-	3,8	28	14	2,5	Yang <i>et al.</i> (2016)
Extrato hidrolisado de alfarroba e feijão branco	<i>K. xylinus</i> ATCC 700178	Sacarose, glicose e frutose	Ácido cítrico e fosfato de sódio	5,5	30	9	1,8	Bilgi <i>et al.</i> (2016)
Frutas apodrecidas	<i>K. xylinus</i> ATCC 53582	Frutose	-	3,8	30	3	6,0	Jozala <i>et al.</i> (2015)

Glicerol subproduto da produção de biodiesel	<i>K. xylinus</i> NRRL B-42	Glicerol	Licor íngreme do milho	5,0	28	14	10,0	Vazquez <i>et al.</i> (2013)
Hidrolisado ácido da espiga de milho	<i>K. xylinus</i> CH001	Glicose	-	6,0	28	14	4,0	Huang <i>et al.</i> (2015)
Líquido de sisal	<i>K. hansenii</i> ATCC 23769	Glicose, sacarose e frutose	Extrato de levedura	5,0	30	10	3,4	Lima <i>et al.</i> (2017)
Melaço cinta preta	<i>K. hansenii</i> ATCC 23769	Glicose	-	6,0	30	9	2,9	Khattak <i>et al.</i> (2015)
Melaço de cana	<i>K. hansenii</i> UCP1619	Sacarose, glicose e frutose	Ácido cítrico, fosfato de sódio e licor de milho	5,0	30	10	0,9	Costa <i>et al.</i> (2017)
Melaço de cana hidrolisado	<i>K. xylinus</i> FC01	Glicose, sacarose e frutose	-	6,0	30	10	1,0	Çakar <i>et al.</i> (2014b)
Melaço de soja	Cepa isolada da indústria de vinagre	Sacarose, glicose, frutose e xilose	Etanol	5,5	30	14	10,0	Gomes (2017)
Água residuária de fermentação lipídica	<i>K. xylinus</i> CH001	Glicose, xilose e arabinose	-	6,0	28	5	0,7	Huang <i>et al.</i> (2016)
Resíduos de levedura de cerveja	<i>K. hansenii</i> CGMCC 3917	Glicose e frutose	-	5,0	30	14	7,0	Lin <i>et al.</i> (2014)
Suco de abacaxi	<i>K. xylinus</i> DFBT	Frutose	-	5,5	30	14	9,1	Neera <i>et al.</i> (2015)

Fonte: Elaborada pelo auto

O desenvolvimento de bactérias produtoras de celulose e a síntese do polímero são mais lentos sob cultivo estático devido à dificuldade na transferência de oxigênio e de nutrientes para o interior da membrana o que demanda longo tempo de cultivo (LEE *et al.*, 2014). Sob cultivo agitado, a bactéria tem um crescimento mais rápido; contudo, produz menos celulose, pois a agitação promove a mutação das cepas produtoras de celulose em mutantes não produtoras do biopolímero (KIM *et al.*, 2007).

3.6 Soja

A soja (*Glycine max* L.), oleaginosa originária da região da China, é considerada um alimento nutricional que contém em sua composição aproximadamente 40% de proteínas, 34% de carboidratos, 20% de lipídios e 5% de minerais (LOKURUKA, 2014; NISHINARI *et al.*, 2014). Esse grão é rico em óleo e proteína, pode ser utilizado para consumo humano e animal, bem como para fins industriais (SINGH, 2007). Essa leguminosa tem sido empregada na produção de óleo, biodiesel, ração animal, alimentos integrais, dentre outros (HARTMAN; WEST; HERMAN, 2011).

A produção de soja cresceu nas últimas três décadas correspondendo a 49% da área plantada em grãos no Brasil. Esse aumento é atribuído aos avanços tecnológicos, ao manuseio e eficiência dos produtores (MAPA, 2017). A estimativa do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) é de que em 2018 o Brasil continue como o segundo maior produtor de soja do mundo, com 113,02 milhões de toneladas de soja em grãos (CONAB, 2018). O grão é responsável pelo crescimento econômico e agrícola do país devido sua versatilidade, aceitabilidade, funcionalidade e facilidade de adaptação a solos e climas diversos (GUEDES, 2015).

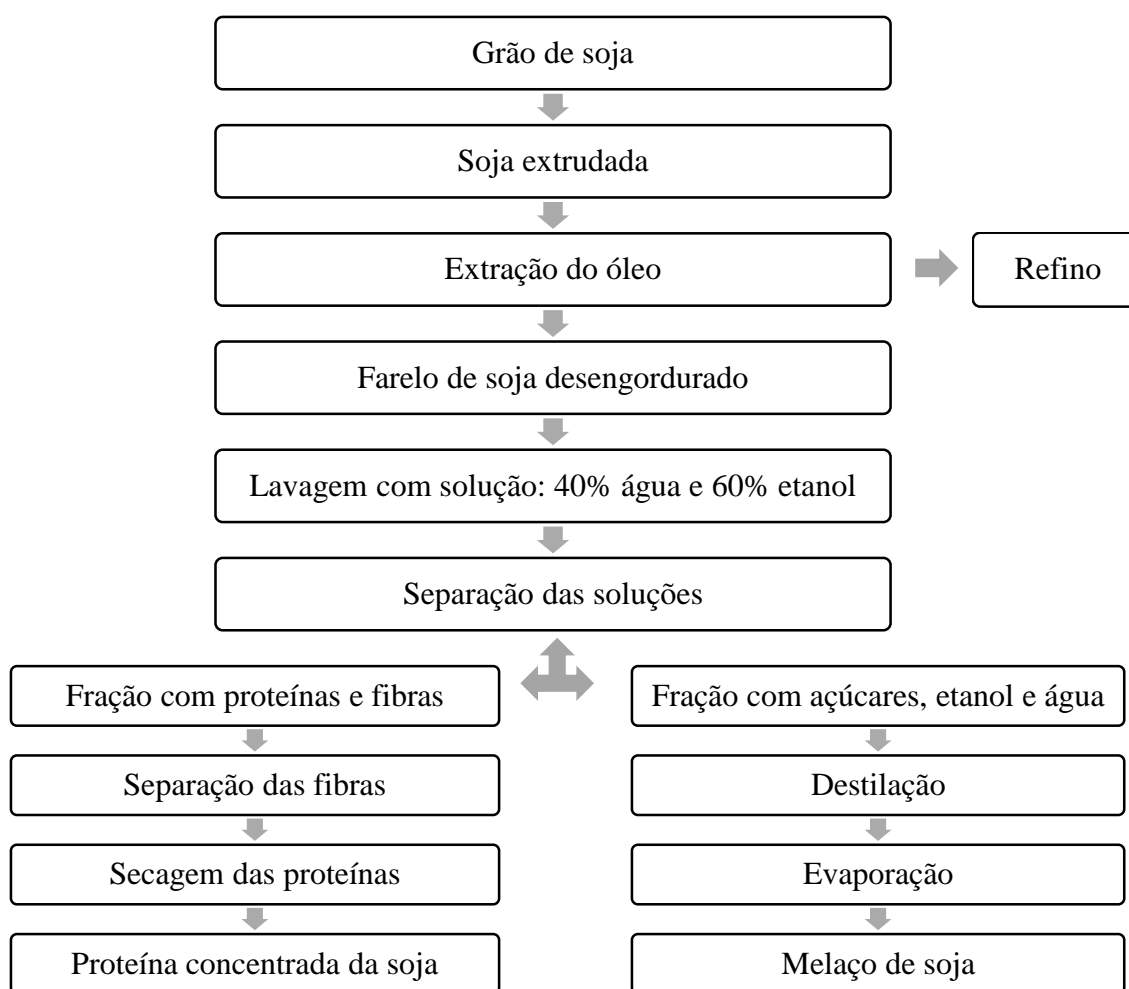
O grão de soja é utilizado, principalmente, na fabricação do óleo e do concentrado proteico de soja e a partir desses produtos é gerado um subproduto rico em açúcares denominado melaço de soja. Este produto secundário proveniente do beneficiamento da soja vem sendo valorizado pois pode ser utilizado na indústria química, siderúrgica e nutrição animal.

3.7 Melaço de soja

O melaço de soja (MS) é um subproduto obtido da evaporação de líquidos durante a secagem do concentrado proteico de soja. A obtenção do melaço inicia-se a partir dos resíduos

gerados da extração do óleo da soja, no qual o farelo de soja desengordurado remanescente é submetido à lavagem com solução de álcool etílico e água. A mistura hidroalcoólica (40% água e 60% etanol) insolubiliza as proteínas e fibras da soja que são extraídas após secagem, obtendo-se a proteína concentrada da soja, restando uma fração líquida composta de açúcares da soja, etanol e água. Por destilação e evaporação, o álcool é totalmente recuperado da fração líquida. Os sólidos concentrados remanescentes formam o melaço de soja (GUEDES, 2015). As etapas que antecedem a obtenção do MS são apresentadas na Figura 6. O rendimento médio do MS é de aproximadamente 156 Kg/ton de soja (BITENCOURT, 2012).

Figura 6 - Fluxograma da produção do melaço da soja.



Fonte: Adaptado GUEDES (2015).

O MS apresenta em sua composição química carboidratos, proteínas, lipídeos, fibras e cinzas (SIQUEIRA *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2012; GOMES, 2017). Os carboidratos presentes no MS são divididos basicamente em três grandes grupos: oligossacarídeos de

rafinose, dissacarídeo e monossacarídeos com porcentagens variadas (MANTOVANI, 2013). Esse subproduto industrial é bastante promissor devido ao seu baixo custo e por ser uma matéria-prima altamente estável, podendo ser facilmente estocada e transportada. O MS é amplamente estudado como substrato para fermentação (ROMÃO *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2012; LUJÁN-RHENALS *et al.*, 2015) pois é um composto biodegradável que apresenta naturalmente açúcares juntamente com nitrogênio que podem ser destinados ao desenvolvimento microbiano.

O MS pode ser convertido em ingrediente calórico de baixo valor econômico para nutrição animal, fonte de carbono para processos de fermentativos, combustível renovável e fonte de lecitina residual (SIQUEIRA *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2012). A literatura apresenta diversos estudos sobre o uso do MS na produção de enzimas (SANADA *et al.*, 2009; MORAIS JÚNIOR *et al.*, 2016), etanol (SIQUEIRA *et al.*, 2008; LETTI *et al.*, 2012; ROMÃO *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2012; LUJÁN-RHENALS *et al.*, 2015), ácido láctico (KARP *et al.*, 2011), goma xantana (CANUTO, 2009), fertilizante no cultivo de camarão (ESPÍRITO SANTO *et al.*, 2016) e produção de CB (GOMES, 2017). Vale salientar que este último, é o único trabalho, até o presente momento, que produziu CB a partir de MS suplementado com etanol.

Dentre os carboidratos que constituem o melaço, os mais abundantes são sacarose, estaquiase e rafinose que diferem entre si pelo número de moléculas de galactose. Para elevar o teor de açúcares fermentáveis é necessário realizar uma hidrólise para aumentar a disponibilidade de monossacarídeos. A hidrólise da estaquiase e rafinose fornece frutose, glicose e galactose (FERNANDES; MIGUEL, 2012).

3.8 Hidrólise dos açúcares do melaço de soja

A quebra dos oligossacarídeos presentes no MS pode ser realizada através da hidrólise ácida (processo químico) ou hidrólise enzimática (processo bioquímico). A enzima α -galactosidase catalisa a hidrólise de ligações α -(1,6)-galactosídicas, liberando a α -D-galactose. A hidrólise ácida fornece açúcares fermentescíveis, é mais rápida e tem menor custo quando comparada ao custo das enzimas. Contudo, o tratamento ácido pode gerar problemas na corrosão de equipamentos e necessidade de ajuste do pH da solução (TASIĆ *et al.*, 2009; HASHEM; DARWISH, 2010). Diversos fatores influenciam na hidrólise de oligossacarídeos como temperatura, pH, configuração da molécula, forma e tamanho do anel (RIBEIRO; SERAVALLI, 2007).

A hidrólise ácida pode ser realizada de duas formas: ácido concentrado e ácido

diluído. O tratamento com ácido concentrado, concentração acima de 5% (m/v), eleva o custo do processo devido ao custo do ácido, dificulta a recuperação do ácido utilizado e requer equipamento de elevado custo devido a problemas de corrosão. A hidrólise com ácido diluído, concentração abaixo de 5% (m/v), acarreta menos problemas com corrosão quando comparado ao ácido concentrado (OLSSON, 2005).

A hidrólise com ácido diluído motiva um maior interesse, devido ao seu benefício econômico, pois proporciona redução dos custos do processo por apresentar menor consumo de ácido e gastos com equipamentos (GURGEL, 2011). O ácido mais utilizado é o H_2SO_4 , em virtude de seu baixo custo e poucos problemas com corrosão quando comparado ao HCl , por exemplo, (OGEDA; PETRI; OTHERS, 2010). Para elevar a eficiência da hidrólise ácida são necessárias quantidades apropriadas de água, pois em meio aquoso o ácido dissocia-se formando íon hidrônio (agente de hidrólise) que promove a quebra das ligações glicosídicas (GURGEL, 2011).

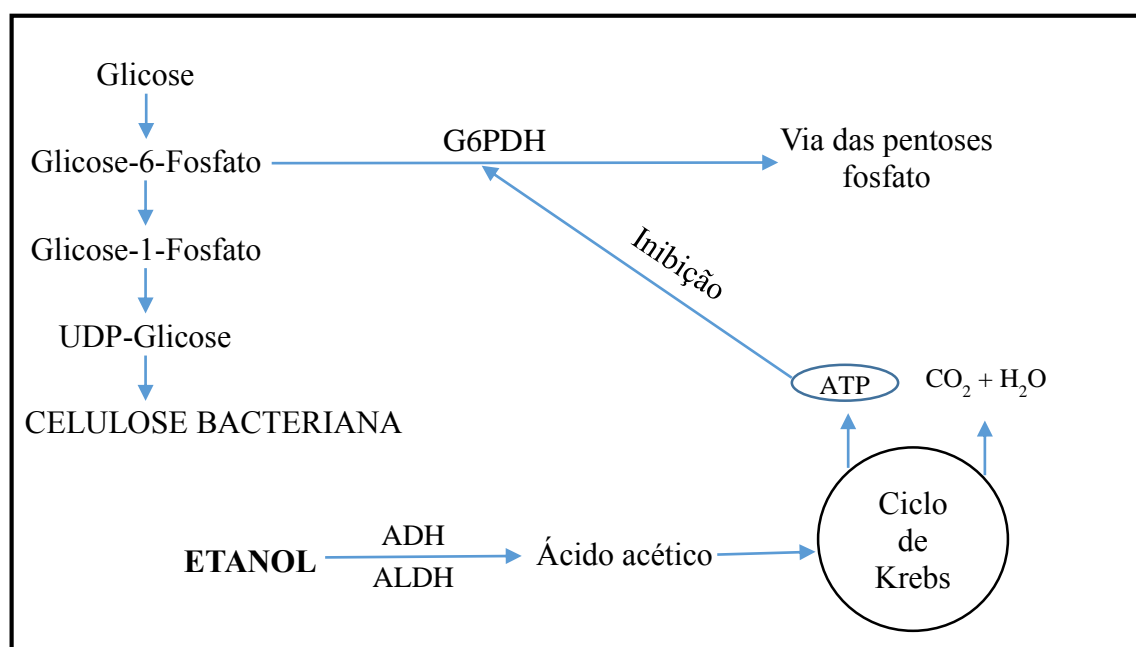
3.9 Suplementação com etanol

A suplementação com etanol desempenha um papel na melhoria na síntese de CB, pois atua como fonte de carbono e de energia para a geração de ATP no estágio inicial da fermentação (LI *et al.*, 2012). As bactérias do gênero *Komagataeibacter* apresentam a capacidade de oxidar o etanol a ácido acético (KONGRUANG, 2008). Assim, o etanol é convertido para acetaldeído pela enzima álcool desidrogenase (ADH) e, posteriormente, o acetaldeído é convertido para ácido acético pela enzima aldeído desidrogenase (ALDH). O ácido acético produzido é metabolizado no ciclo de Krebs gerando ATP para crescimento de células bacterianas e síntese de celulose. Em função do aumento dos níveis de ATP ocorre uma redução da atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) que resulta na inibição da via das pentoses fosfato e, conseqüentemente, aumenta o fluxo de glicose-6-fosfato (G6P) na via metabólica para síntese de CB (NARITOMI *et al.*, 1998). O esquema geral da utilização do etanol para elevar a síntese de CB pode ser observado na Figura 7.

A adição de etanol (0,5 a 2,0% v/v) ao meio de fermentação para elevar a produção do biopolímero, tem sido relatada na literatura utilizando frutose (NARITOMI *et al.*, 1998) e glicose (LI *et al.*, 2012, ÇAKAR *et al.*, 2014a; KRYSTYNOWICZ *et al.*, 2002; MOHAMMADKAZEMI; DOOSTHOSEINI; AZIN, 2015; PARK *et al.*, 2003) como fontes de carbono. As bactérias acéticas podem tolerar até no máximo 15% (v/v) de etanol (DRYSDALE; FLEET, 1988). Porém, para produção de CB são adicionadas baixas concentrações (v/v) de

etanol ao meio de cultivo, pois aumento do volume de etanol adicionado ao meio cultivo eleva os níveis de ácido acético residual, que inibe o crescimento do microrganismo e consequentemente reduz a síntese do biopolímero (NARITOMI *et al.*, 1998). Embora as bactérias acéticas sejam tolerantes ao ácido acético em concentrações que são prejudiciais à maioria dos microrganismos, uma quantidade elevada de ácido acético (produzido por etanol) seria tóxico para as células bacterianas (GULLO *et al.*, 2014). Até o momento, não está claro como o etanol está envolvido em diferentes estágios de fermentação, como quando é usado como fonte de energia e quando é usado como fonte de carbono durante o processo de produção de CB (LI *et al.*, 2012).

Figura 7 - Influência do etanol na via metabólica para a produção de celulose bacteriana.



Fonte: Adaptado LI *et al.*, (2012).

3.10 Técnicas para caracterização do biopolímero

As características da membrana de CB podem ser afetadas por vários fatores, como meio de cultivo, condição de fermentação e fonte de carbono (MOHITE, KAMALJA, PATIL, 2012; MOHITE, SALUNKE PATIL, 2013). Portanto, faz-se necessária a caracterização do biopolímero quando sua produção é realizada por meio de fontes alternativas de carbono, sobretudo para correlacionar estrutura com propriedades.

As principais caracterizações realizadas são: espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), análise termogravimétrica (TGA), difração de raios x (DRX), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e ensaios mecânicos.

A espectroscopia de absorção no infravermelho (FTIR) identifica e/ou determina as características estruturais dos polímeros, como grupos funcionais e ligações presentes na amostra. É uma ferramenta utilizada para estimar o tipo de impurezas residuais na CB, ou seja, presença de substâncias não celulósicas no biopolímero. Também pode ser útil para a medição de níveis de biomoléculas adicionadas à CB para vários fins (FULLER; ANDAYA; MCCLAY, 2017).

A análise termogravimétrica (TGA) mede a variação da massa de um material (perda ou ganho) em função da temperatura e tempo em atmosfera de nitrogênio, hélio, ar, outros gases ou no vácuo que determina a mudança de peso e temperatura das reações de decomposição (DENARI; CAVALHEIRO, 2012). Assim, a análise termogravimétrica avalia a estabilidade térmica do polímero.

A difração de raios-X (DRX) é uma técnica que caracteriza materiais cristalinos. Fornece informações sobre estrutura do cristal, orientação preferida do cristal (textura) e outros parâmetros estruturais, como o tamanho médio de grão, cristalinidade, deformação e defeitos de cristal. DRX é a técnica mais utilizada para investigar o índice de cristalinidade (IC) e o tamanho do cristalito de materiais celulósicos (AGARWAL *et al.*, 2017).

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é frequentemente utilizada na ciência dos materiais poliméricos para elucidar sua estrutura microscópica, devido à sua alta resolução lateral e grande profundidade de foco que possibilita visualizar as estruturas superficiais ou subsuperficiais de amostras com dimensões relativamente grandes (CANEVAROLO, 2003). Dessa forma, a microscopia avalia a microestrutura e caracteriza morfologicamente as nanofibras da CB.

Para estabelecer as propriedades mecânicas do polímero pode-se recorrer a ensaios de tração, que fornecem dados quantitativos das características mecânicas dos materiais (tensão de ruptura, módulo de elasticidade e elongação na ruptura).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Caracterização do melaço de soja

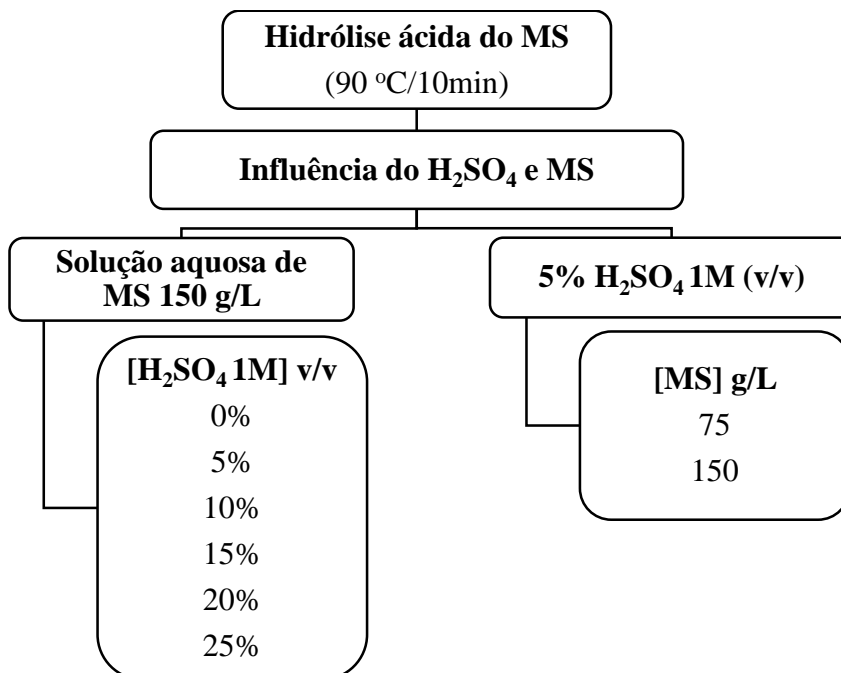
O MS foi cedido pela empresa Selecta sediada na região metropolitana de Goiânia. A matéria-prima foi acondicionada em recipiente plástico e estocada sob congelamento a -18 °C. O melaço foi caracterizado quanto aos teores de umidade, cinzas, pH, nitrogênio total, proteínas e açúcar redutor (AR). O teor de umidade, cinzas e pH foi realizado conforme descrito no manual de métodos físico-químicos para análise de alimentos, Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008). O nitrogênio total foi determinado em analisador de carbono orgânico total elementar (Shimadzu, modelo TOC – V CPN, Kyoto, Japão), tendo o oxigênio como gás de arraste em uma velocidade de 150 mL/min. O teor de proteínas foi definido através do fator de conversão para transformação de nitrogênio para proteína que é de 6,25 (IAL, 2008). O teor de açúcares redutores (AR) do MS foi quantificado pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959).

Em trabalho em parceria com a Universidade Estadual de Londrina, o mesmo lote do MS utilizado neste estudo, foi utilizado na pesquisa de Gomes (2017) que quantificou os açúcares presentes no MS por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. O referido autor constatou a presença de sacarose (30,5%), rafinose (14,2%), estaquiose (19,0%) glicose (1,5%), frutose (1,8%), galactose (0,5%) e xilose (2,9%), totalizando 70,4% de açúcares totais.

4.2 Hidrólise ácida do melaço de soja

O intuito deste trabalho foi produzir um meio que apresentasse composição de AR, independente do AR, similar ao meio de referência HS. Assim, foi avaliada a influência da proporção do ácido sulfúrico e da concentração do MS na hidrólise dos oligossacarídeos para obter uma concentração de AR em torno de 20 g/L. Desse modo, foram realizados ensaios conforme o esquema apresentado na Figura 8. Considerando que a proposta do trabalho é reduzir os custos da fermentação, foi estabelecido neste estudo um tratamento mais brando utilizando hidrólise com ácido diluído e temperatura a 90 °C por 10 minutos, visando diminuir gastos com ácido e energia.

Figura 8 - Esquema da avaliação da influência da concentração de ácido sulfúrico e de MS no tratamento de hidrólise.



Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2.1 Influência do ácido sulfúrico na hidrólise

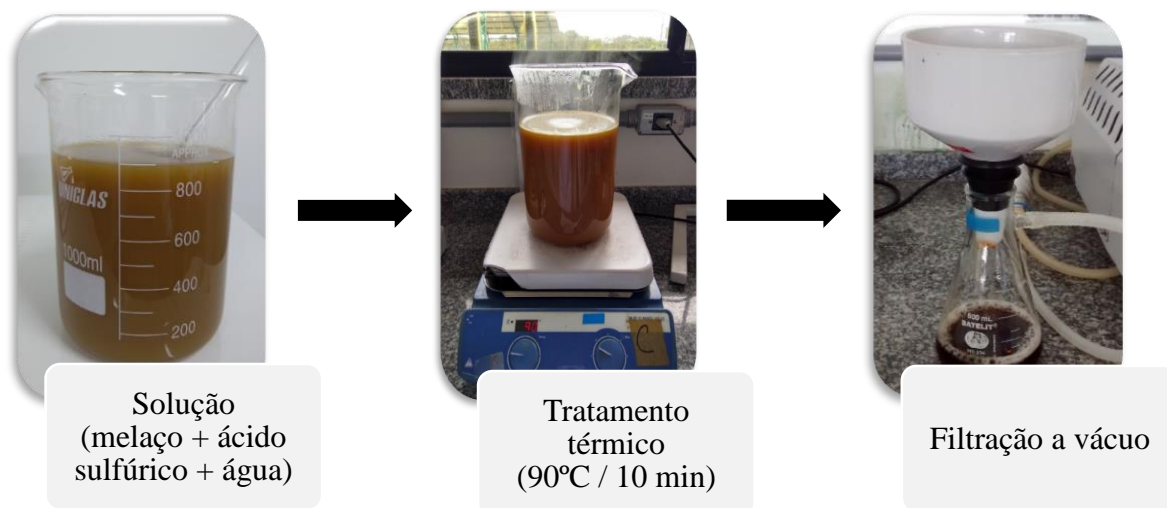
Inicialmente foi avaliada a influência da adição de diferentes volumes de ácido sulfúrico na hidrólise dos oligossacarídeos presentes no MS. Para 100 mL de volume reacional foram pesados em frascos Erlenmeyer 15 g de MS, aos frascos foram adicionados 0 (controle), 5, 10, 15, 20 e 25 mL de ácido sulfúrico 1M (correspondente a 0 (controle), 5, 10, 15, 20 e 25% v/v, respectivamente) e o volume foi aferido para 100 mL com água destilada. A hidrólise foi conduzida em chapa aquecedora com agitação (IKA®, modelo C-MAG HS10, Staufen, Alemanha) a 90 °C por 10 minutos.

4.2.2 Influência da concentração de melão de soja

Após a definição da proporção adequada de ácido sulfúrico, foi avaliada a influência das concentrações 75 g/L e 150 g/L de MS no processo de hidrólise. Foram pesados 75 g e 150 g de MS em frascos Erlenmeyer, aos frascos foram adicionados 5 mL (5% v/v) de ácido sulfúrico 1M e o volume foi aferido para 100 mL com água destilada. Em seguida,

procedeu-se ao tratamento térmico em chapa aquecedora com agitação a 90 °C por 10 minutos. O esquema geral do processo de hidrólise pode ser observado na Figura 9.

Figura 9 - Hidrólise do melaço de soja com H₂SO₄ 1M.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Posterior às hidrólises relatadas nos itens 4.2.1 e 4.2.2, as soluções foram filtradas em bomba à vácuo (Marconi, Piracicaba, Brasil), utilizando papel de filtro qualitativo (filtração lenta) para retirada dos precipitados formados durante o tratamento de hidrólise. As soluções filtradas foram avaliadas quanto aos teores de açúcar redutor (AR) pelo método DNS, açúcares totais (AT) pelo método da antrona (YEMN; WILLIS, 1954) e quantificação de glicose por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) utilizando um cromatógrafo a líquido (Shimadzu, Quioto, Japão) acoplado com sistema de detecção por índice de refração RID-10A e gerenciado pelo software LC Solutions (Shimadzu, Quioto, Japão). As amostras foram diluídas e passadas em filtro 0,45 µm de porosidade (Millipore Millex - GV, Irlanda). A eluição foi realizada em coluna analítica Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm, Bio-Rad, EUA) mantida a temperatura constante de 65 °C. Solução de 5 mM de ácido sulfúrico foi utilizado como fase móvel a uma vazão de 0,6 mL/min. A glicose foi quantificada com o intuito de compara as soluções hidrolisadas de MS com o meio HS que contém apenas glicose como fonte de carbono.

A conversão dos oligossacarídeos em AR e glicose foram calculados com base na concentração de AT presentes nas soluções de melaço, conforme a Equação 1 e 2, respectivamente.

$$AR_{\text{conversão}} (\%) = \frac{AR_{g/L}}{AT_{g/L}} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{Glicose}_{\text{convers\~ao}} (\%) = \frac{\text{Glicose}_{\text{g/L}}}{\text{AT}_{\text{g/L}}} \times 100 \quad (2)$$

4.2.3 Planejamento experimental para otimizar a hidrólise

Considerando que o MS está sendo uma nova fonte de nutrientes para produção de CB, não se sabia decerto, a concentração de açúcar inicial necessária para a síntese do biopolímero. Assim, após os ensaios de influência da proporção de ácido sulfúrico e da concentração de MS na hidrólise dos oligossacarídeos, procedeu-se com um planejamento experimental visando otimizar a hidrólise. Através do software Protimiza Experimental 'Design' foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR) ²², para otimizar a concentração de açúcares redutores (AR) no hidrolisado. O efeito da aplicação de diferentes concentrações de solução aquosa de MS e ácido sulfúrico foi estudado através de um planejamento DCCR contendo 11 pontos (4 fatoriais + 4 axiais + 3 centrais). O delineamento adotado é apresentado na Tabela 2.

Conforme os pontos definidos pelo DCCR, foram realizadas hidrólises a partir de soluções aquosas de melaço de soja adicionadas de diferentes alíquotas de ácido sulfúrico 1M (Tabela 3). As soluções foram aquecidas a 90 °C durante 10 minutos. Após as hidrólises, realizou-se a determinação de açúcar redutor pelo método DNS. Posteriormente, foram realizadas análises estatísticas para verificar a significância das variáveis independentes do sistema e avaliar a significância dos coeficientes de regressão, para obter um modelo matemático, estatisticamente válido, para prever a variável resposta concentração de AR (g/L). Através do modelo matemático, foi plotado o gráfico de superfície de resposta obtido para definir as faixas ótimas operacionais de cada variável.

Tabela 2 - Níveis e parâmetros utilizados no planejamento do estudo da hidrólise do melaço de soja.

Variáveis independentes	Níveis codificados e reais das variáveis independentes					Intervalo (+ α , - α)	
	-1,41	-1	0	1	1,41	Mín.	Máx.
(X ₁) H ₂ SO ₄ M (%)	1,5	2,5	5,0	7,5	8,5	1,5	8,5
(X ₂) Melaço (g/L)	50,0	57,32	75,0	92,68	100,0	50,0	100,0

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 3 - Ensaios do planejamento experimental DCCR com valores originais e codificados das variáveis no estudo da hidrólise dos oligossacarídeos presentes no melaço de soja.

Pontos	Ácido sulfúrico (%)	Melaço (g/L)
1	2,5 (-1)	57,32 (-1)
2	7,5 (+1)	57,32 (-1)
3	2,5 (-1)	92,68 (+1)
4	7,5 (+1)	92,68 (+1)
5	1,5 (-1,41)	75,0 (0)
6	8,5(+1,41)	75,0 (0)
7	5,0 (0)	50,0 (-1,41)
8	5,0 (0)	100,0 (+1,41)
9 (C*)	5,0 (0)	75,0 (0)
10 (C*)	5,0 (0)	75,0 (0)
11 (C*)	5,0 (0)	75,0 (0)

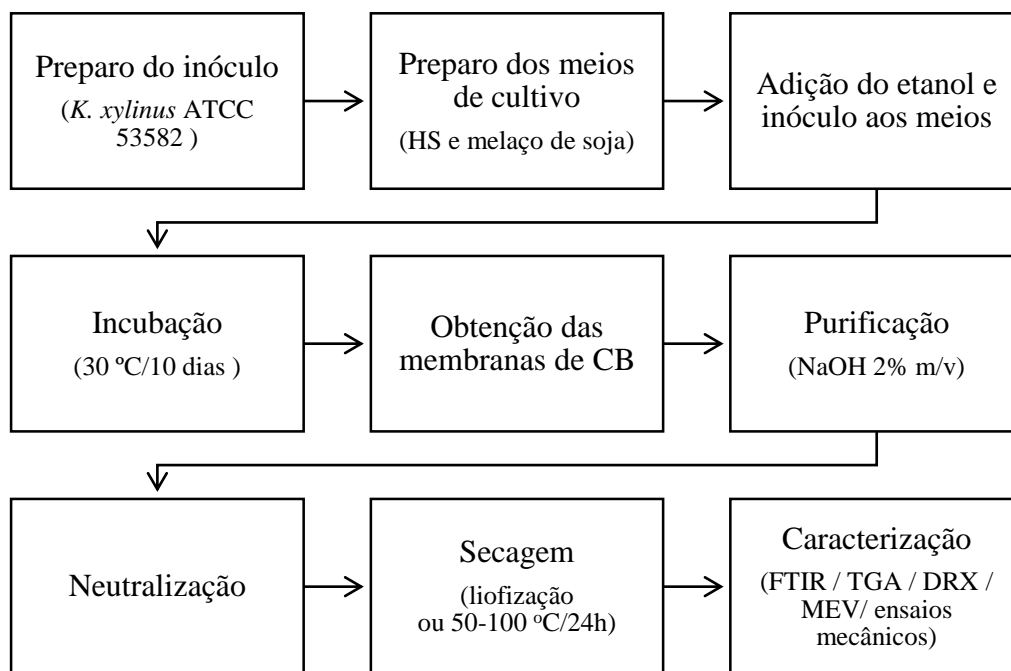
Fonte: Elaborada pelo autor.

* Ponto central

4.3 Produção de Celulose Bacteriana

A Figura 10 apresenta a esquematização geral para produção de CB e as etapas preliminares à caracterização.

Figura 10 - Resumo esquemático para obtenção de CB e preparação das membranas para caracterização.



Fonte: Elaborada pelo autor.

4.3.1 Microrganismo

O microrganismo empregado neste estudo para produção de CB foi a cepa *K. xylinus* ATCC 53582. A bactéria foi repicada quinzenalmente e mantida sob refrigeração (4 a 6 °C) em meio HS (HESTRIN; SCHRAMM, 1954) contendo glicose (20 g/L), extrato de levedura (5 g/L), peptona (5 g/L), ácido cítrico (1,5 g/L), fosfato de sódio dibásico anidro (2,7 g/L) e ágar (20 g/L). O pH do meio HS é aproximadamente 6,0. Para preservação a cepa foi mantida sob congelamento em freezer (-20 °C) e ultrafreezer (-80 °C) em 20% (v/v) de glicerol.

4.3.2 Preparo do inóculo para fermentação

Para obtenção do inóculo transferiu-se (raspagem) a cultura do tubo Falcon de 15 mL sob refrigeração, para tubo Falcon de 50 mL contendo ágar HS inclinado e incubou-se a 30

°C por 72 h. Após o período de incubação a cultura foi transferida (raspagem) para frasco Schott contendo 100 mL de caldo HS e incubado a 30 °C por um período de 72 h.

4.3.3 Preparo dos meios e produção da celulose bacteriana

A partir dos resultados obtidos dos ensaios de influência do ácido sulfúrico, da concentração de MS e do planejamento experimental foram elaborados dois meios de fermentação à base de MS hidrolisado. Desse modo, foram formulados os meios: MSH75 (solução aquosa de 75 g/L de MS adicionada de 5% (v/v) H₂SO₄ 1M) e MSH100 (solução aquosa de 100 g/L de MS adicionada de 10% (v/v) H₂SO₄ 1M). As soluções foram aquecidas a 90 °C/10 min e, posteriormente, o pH foi ajustado para 6,0 com NaOH a 30% (m/v). Após o ajuste do pH filtrou-se a solução hidrolisadas em bomba à vácuo. Também foram formuladas soluções controle nas quais não se adicionou ácido sulfúrico, denominadas MS75 (solução aquosa de MS com 75 g/L) e MS100 (solução aquosa de MS com 100 g/L). Meio HS foi utilizado como meio de referência para produção de CB. Os meios à base de melaço de soja e HS foram distribuídos em frascos Schott (250 mL) com 50 mL de meio e esterilizados em autoclave (Phoenix Luferco, modelo AV Plus Digital, Araraquara, Brasil) a 121°C por 15 minutos. Após a esterilização, os meios foram adicionados de diferentes concentrações de etanol (0,0; 1,0; 1,5 e 2,0% v/v). Para a síntese de CB os meios foram inoculados com 10% (v/v) de *K. xylinus* ATCC 53582 e incubados a 30 °C/10 dias sob condição estática. As condições de fermentação (temperatura e tempo) foram baseadas na metodologia descrita por Costa *et al.* (2017).

4.3.4 Caracterização dos meios de fermentação

Os meios de fermentação utilizados foram avaliados quanto ao teor de carbono e nitrogênio. Desse modo, foi determinado o teor de açúcar redutor pelo método DNS, açúcares totais pelo método da antrona, glicose por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e nitrogênio total determinado em analisador de carbono orgânico total elementar. Os açúcares redutores e totais foram determinados, pois os meios à base de MS são complexos e apresentam vários açúcares (monossacarídeos e oligossacarídeos). Já a glicose foi quantificada para comparar os meios hidrolisados de MS com o meio padrão HS, uma vez que, este último apresenta apenas glicose em sua composição.

4.3.5 Purificação e neutralização

As películas obtidas na superfície dos meios de cultivos foram purificadas conforme a metodologia descrita por CARREIRA *et al.* (2011) com algumas modificações. Inicialmente, as membranas foram lavadas em água corrente, seguida de duas imersões em água a 90 °C/40 min e uma última imersão em solução de hidróxido de sódio 2% (m/v) a 90 °C por 1 hora. Posteriormente, as membranas foram lavadas, sucessivas vezes, em água corrente até neutralização do pH. A neutralidade da membrana foi determinada em fita indicadora de pH.

4.4 Determinações analíticas

Para determinar a produção de CB (g/L), as películas obtidas foram secas (100 °C/24h) e pesadas em balança analítica. A produção foi calculada conforme a Equação (3):

$$\text{Produção CB (g/L)} = \left(\frac{m_s}{V_m} \right) * 1000 \quad (3)$$

Onde m_s é a massa seca da CB (g) e V_m é o volume do meio de cultivo utilizado na fermentação (mL).

4.5 Perfil da fermentação na síntese de celulose bacteriana

A partir dos resultados obtidos da produção de CB (g/L), constatou-se que, dentre os meios à base de MS, a maior produção do biopolímero foi observada no meio MSH75 suplementado com 2% (v/v) de etanol (MSH75+). Portanto, o meio MSH75+ e HS foram selecionados para verificação do perfil de fermentação. O perfil do processo de fermentação foi determinado pelo rendimento sobre os açúcares consumidos, produtividade, pH, produção de CB e consumo de glicose. Além disso, para o meio MSH75+, também foi determinado o consumo de açúcares redutores e açúcares totais. Alíquotas de 20 mL dos diferentes meios foram distribuídas em frascos Schott (100 mL) e esterilizadas a 121 °C por 15 minutos. Os meios foram inoculados com 10% (v/v) de cultura de *K. xylinus* ATCC 53582 e a fermentação foi conduzida a 30 °C/15 dias, sob condição estática. O tempo de fermentação foi prolongado para 15 dias com finalidade de verificar se havia alguma mudança significativa na produção de CB a partir do décimo de cultivo. A intervalos de 72 horas três frascos de cada meio foram retirados para avaliação dos parâmetros de fermentação. Para determinação dos açúcares os

meios fermentados foram filtrados em membrana de 0,22 µm. O rendimento sobre os açúcares consumidos e a produtividade foi determinado conforme a Equação 4 e 5, respectivamente (CARREIRA *et al.*, 2011):

$$\text{Rendimento sobre os açúcares consumidos (\%)} = \frac{m_{CB}/V}{S_i - S_f} \times 100 \quad (4)$$

$$\text{Produtividade (g/L.d)} = \frac{m_{CB}}{V \times t} \quad (5)$$

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

4.6 Caracterização das membranas de celulose bacteriana

Para caracterização, as membranas de CB obtidas do meio MSH75 sem suplementação com etanol (MSH75-), MSH75 suplementado com 2% (v/v) de etanol (MSH75+), HS sem suplementação com etanol (HS-) e HS suplementado com 2% (v/v) de etanol (HS+) foram liofilizadas por 24 horas, exceto para os ensaios mecânicos nos quais as películas foram secas em estufa (ACB Labor, São Paulo, Brasil) a 50 °C/24h. As caracterizações realizadas foram: espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), análise termogravimétrica (TGA), difração de raios-X (DRX), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e ensaios mecânicos.

A análise de FTIR foi obtida por um espectrômetro Varian 620-IR (Varian, Inc., Palo Alto, USA) utilizando refletância total atenuada (ATR). Os espectros das amostras foram registrados em uma faixa de 4000-400 cm⁻¹, com resolução de 4 cm⁻¹ e acúmulo de 15 varreduras. As medidas de TGA foram realizadas em um analisador térmico simultâneo STA 6000 (PerkinElmer, Waltham, EUA). No ensaio foi utilizado atmosfera de nitrogênio com fluxo de 40 mL/min e taxa de aquecimento de 10 °C/min. Utilizou-se uma faixa de aquecimento da temperatura ambiente de 25 °C até 700 °C. Procurou-se uniformizar o peso das amostras em 7,5 mg.

A análise de DRX foi realizada utilizando difratômetro de RX/Xpert Pro MPD (PANalytical, Almelo, Holanda) empregando-se tubo de cobre. O equipamento operou na faixa angular em 2θ de 10 a 70 graus, com uma velocidade de varredura de 0,5 °C/min. O índice de cristalinidade (I_c) foi calculado utilizando-se o método descrito por Segal *et al.* (1959) conforme a Equação (6).

$$\text{Cristalinidade (\%)} = \left(\frac{I_{002} - I_{am}}{I_{002}} \right) \times 100 \quad (6)$$

onde:

I_{002} - intensidade da celulose cristalina em $2\theta \sim 23^\circ$;

I_{am} - intensidade da celulose amorfa em $2\theta \sim 17^\circ$.

As análises de MEV foram realizadas na Central Analítica da Universidade Federal do Ceará. As amostras foram montadas em suporte (*stubs*) e metalizadas com ouro. Posteriormente, foram visualizadas em Microscópio Eletrônico de Varredura Quanta 450 FEG (FEI, Hillsboro, EUA), e visualizadas sob uma aceleração de voltagem de 20 kV em diferentes aumentos.

Para os ensaios mecânicos as amostras foram secas e acondicionadas em dessecador por 48 horas. O ensaio de tração foi realizado em uma máquina de ensaio universal EMIC linha DL (EMIC, São José dos Pinhais, Brasil). As propriedades de tração foram determinadas seguindo metodologia baseada na norma ASTM D882 para filmes finos. As amostras foram cortadas nas dimensões de 12,6 cm de comprimento e 1,2 cm de largura e ajustadas às garras pneumáticas do equipamento. A distância inicial entre as garras foi de 10 cm, a velocidade de tração de 12,5 mm/min e a célula de carga empregada de 500N. Para cada amostra foram utilizados cinco corpos-de-prova. As propriedades de tração determinadas foram: resistência máxima a tração (MPa), alongamento na ruptura (%) e módulo de elasticidade (MPa).

4.7 Estimativa de custo do meio de fermentação em escala laboratorial

A estimativa de custo do meio de MS hidrolisado suplementado com etanol e HS foi realizada com propósito de comparar os gastos necessários para elaboração dos meios. Desse modo, foram solicitados orçamentos dos componentes dos meios pela empresa CEQUIMICA LTDA e do melaço de soja pela empresa Selecta no período de fevereiro de 2018. A partir dos valores obtidos foi realizado o cálculo pra produção de 1 litro de meio à base de MS e HS.

4.8 Análise estatística

Os resultados da influência da proporção de ácido e concentração de MS, concentração de açúcares totais, produção de CB nos meios formulados e do perfil da

fermentação na síntese de CB foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey com significância de 5 % de probabilidade por meio do programa estatístico Sisvar versão 5.6.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do melaço de soja

A composição centesimal do MS apresenta entre 50-70% de açúcares totais, 6-10% de proteínas, 7-21% de lipídeos, 4-6% de fibras e 6-8% de cinzas (SIQUEIRA *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2012; GOMES, 2017). Os valores dos componentes encontrados para o MS neste estudo foram similares aos reportados pela literatura, entretanto, o valor para cinzas foi abaixo quando comparado aos das bibliografias consultadas (Tabela 4). Essas variações são normais pois a composição química da soja depende do cultivar plantado e de fatores climáticos (HOECK *et al.*, 2000).

O MS apresentou umidade intermediária (23,9%), elevado teor de proteína (8,0%), baixa concentração de açúcar redutor (4,2%) e cinzas (3,8%) (Tabela 4). Em função de sua umidade intermediária, o MS apresenta boa estabilidade microbiológica durante armazenamento e transporte, pois contém elevadas concentrações de açúcares e, portanto, tem baixa atividade de água. O elevado teor de proteína indica que esse subproduto é uma boa fonte de nitrogênio para o desenvolvimento microbiano. A baixa concentração de AR sugere a necessidade de tratamento para elevar o teor de açúcares fermentáveis. As cinzas contêm minerais como potássio, cálcio, fósforo e magnésio que são importantes para o desenvolvimento de microrganismos em processos fermentativos (GOMES, 2017).

Tabela 4 - Caracterização físico-química do melaço de soja.

Componente	Teores (g/100g em base úmida)
Açúcares totais	54,3 ± 4,2
Umidade	23,9 ± 1,0
Proteínas	8,0 ± 0,6
pH	5,9 ± 0,2
Açúcar redutor	4,2 ± 0,3
Cinzas	3,8 ± 0,2
Nitrogênio	1,3 ± 0,1

Fonte: Elaborada pelo autor.

Em função do seu teor de carboidratos e proteínas, o MS pode ser considerado um meio de fermentação promissor para a produção de CB; contudo, apresenta alta viscosidade e parte dos carboidratos presentes são oligossacarídeos como sacarose, rafinose e estaquiose (GOMES, 2017). A maioria dos microrganismos não metabolizam rafinose e estaquiose pois não produzem a enzima α -galactosidase, e para utilização da sacarose por bactérias produtoras de CB, é necessária uma etapa metabólica adicional para converter a sacarose em glicose e frutose e, posteriormente, iniciar a síntese do biopolímero (RUKA *et al.*, 2012). Então, é necessário proceder a diluição para diminuir a viscosidade do MS e a hidrólise para aumentar o teor de açúcares facilmente metabolizados pelo microrganismo e estimular a produção de CB. A hidrólise ácida de melaços, em geral, é uma estratégia bastante recorrente quando utilizado como substrato para produção de CB (BAE; SHODA, 2005; ÇAKAR *et al.*, 2014b) e etanol (SIQUEIRA *et al.*, 2008; ROMÃO *et al.*, 2012).

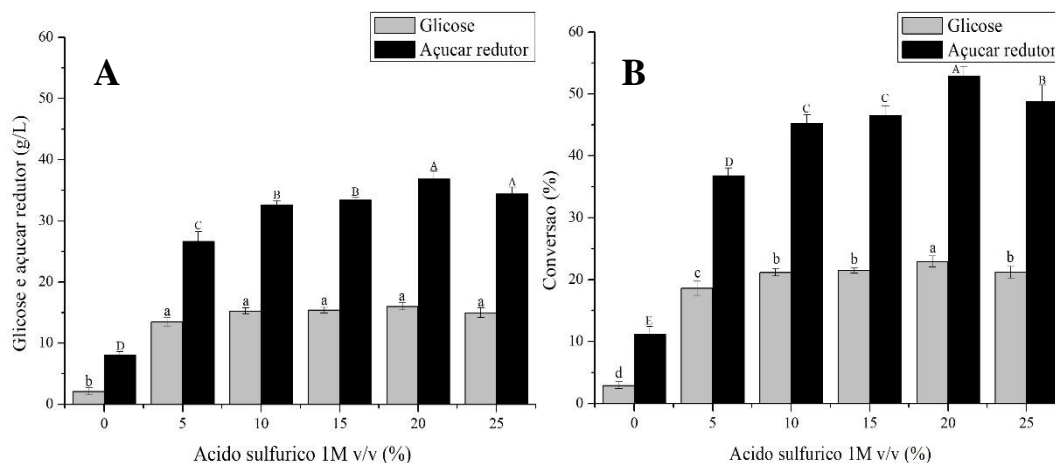
5.2 Hidrólise ácida do melaço de soja

O intuito do tratamento de hidrólise foi obter uma solução aquosa de MS com, aproximadamente, 20 g/L de AR que é a quantidade de açúcar redutor presente no meio de referência HS. Assim, foram realizados ensaios para alcançar essa concentração de açúcares fermentáveis.

5.2.1 Influência do ácido sulfúrico na hidrólise

Nesta etapa, avaliaram-se diferentes proporções de ácido sulfúrico (0, 5, 10, 15, 20 e 25% v/v) em solução aquosa com 150 g/L de MS. A concentração de glicose (quantificada apenas para comparar com o meio HS) e AR e conversão dos açúcares totais em glicose e AR são apresentados na Figura 11. A adição de diferentes volumes de H₂SO₄ na solução de MS aumentou a disponibilidade de AR e glicose. O teor de AR variou de 8,0 g/L a 36,9 g/L (Figura 11a). A maior liberação de AR (36,9 g/L) foi observada na concentração de 20% (v/v) de H₂SO₄ 1M. As concentrações de 10 e 15% (v/v) de ácido não apresentaram diferença significativa, a nível de 95% de confiança, no incremento de AR e o mesmo comportamento foi observado nas concentrações de 20 e 25% (v/v). Foi observado um aumento de aproximadamente 70% no teor de AR (8,0 a 26,6 g/L) quando o MS foi hidrolisado com 5% (v/v) de H₂SO₄ 1M. As demais concentrações de ácido avaliadas não apresentaram incremento de AR proporcional à adição de ácido com variação de 32,6 g/L a 36,9 g/L.

Figura 11 – Concentração de glicose e açúcares redutores (A) e conversão dos açúcares totais em glicose e açúcares redutores (B) em solução aquosa com 150 g/L de melaço de soja após hidrólise ácida (90 °C/10 min) com diferentes volumes de ácido sulfúrico.



Fonte: Elaborada pelo autor.

O teor de glicose nas soluções aquosa de MS variou de 2,1 g/L a 15,89 g/L sendo a maior concentração verificada na solução hidrolisada com 20% (v/v) de H₂SO₄ 1M. Baseado na análise de variância, com nível de 5% de confiança, observou-se que não houve diferença significativa entre os resultados com adição de ácido. Todavia, esses valores foram superiores ao controle (sem adição ácido) e significativamente diferentes. Portanto, não se observou aumento significativo na concentração de glicose com o aumento da adição de ácido (Figura 11a).

A conversão dos açúcares totais em glicose e AR (Figura 11b) apresentou tendência bastante similar a concentração de glicose e AR disponibilizada após a hidrólise ácida. Foi observada conversão de 37% de AT em AR na hidrólise com 5% v/v de H₂SO₄ 1M e a partir da adição de 10% v/v de H₂SO₄ 1M não houve aumento da conversão de AT em AR proporcional ao volume de ácido adicionado com média de conversão de 48%. A hidrólise com diferentes volumes de ácido, a partir de 5% v/v de H₂SO₄ 1M, exibiu pequena variação na conversão de AT em glicose (média de 21%), possivelmente devido à escassez de oligossacarídeos mais simples, como a sacarose, que o ácido é capaz de hidrolisar facilmente.

O teor de AT nas soluções hidrolisadas variaram entre 70 g/L a 72 g/L, não apresentando diferença significativa entre os valores ao nível de 95% de confiança. Este resultado já era esperado, uma vez que, todas as soluções apresentavam a mesma quantidade de melaço (150 g) diferenciando apenas na quantidade de ácido adicionada.

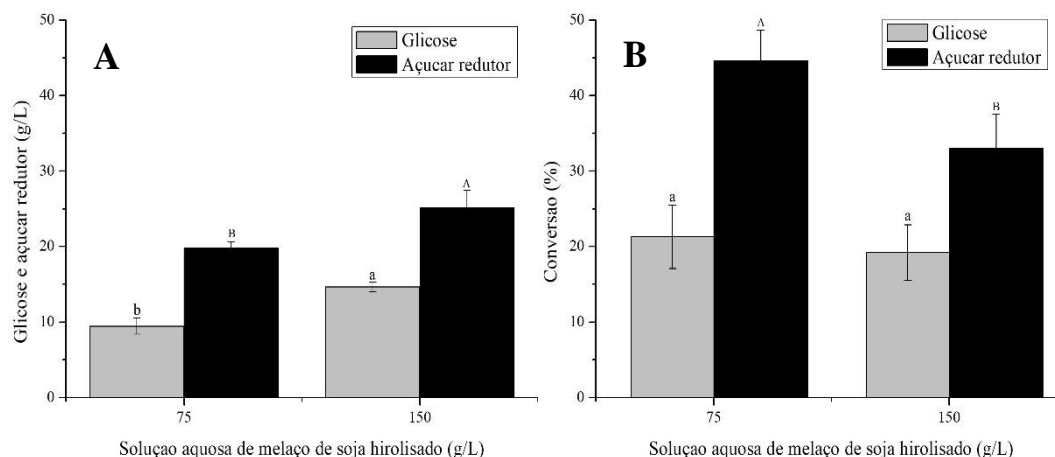
Os oligossacarídeos formam-se através de ligações glicosídicas de um pequeno número de monossacarídeos. Na hidrólise, o ácido age liberando prótons que quebram as ligações entre os monômeros de açúcar (AGUILAR *et al.*, 2012). A quebra dos oligossacarídeos do MS libera açúcares como, glicose e frutose. Neste estudo, o ácido sulfúrico apresentou influência significativa na disponibilidade de açúcares fermentáveis. No entanto, observou-se que o aumento da adição de ácido (a partir de 10%) não apresentou incremento proporcional de AR e de glicose. Comportamento similar foi observado em melaço de cana utilizado como fonte de carbono em um processo biológico de remoção de nitrogênio. O melaço foi hidrolisado com diferentes quantidades (0% a 8,0%) de H_2SO_4 3,1 M, e apresentou aumento da concentração de AR até a incorporação de 2% de ácido na solução. A partir da adição de 4% a 8% (v/v) de H_2SO_4 não foi observada a elevação do teor de AR proporcional à concentração de ácido adicionado (QUAN *et al.*, 2005).

A ideia deste trabalho foi formular uma solução aquosa à base de MS com aproximadamente 20 g/L de AR que é a concentração de açúcar do meio HS. Assim, a hidrólise com adição de 5% (v/v) de ácido apresentou concentração de AR adequada para o processo fermentativo e implicou em menor gasto com ácido. Portanto, a proporção de 5% (v/v) de ácido foi selecionada para a hidrólise, pois proporcionou aumento satisfatório no teor de açúcares fermentescíveis (26,6 g/L).

5.2.2 Influência da concentração melaço de soja

Após a determinação da proporção adequada de H_2SO_4 1M (5% v/v) para hidrólise, avaliou-se a influência da concentração de MS, nas soluções aquosas com 75 g/L e 150 g/L de MS, sobre o aumento do teor de AR e glicose. A concentração de glicose e AR e conversão dos açúcares totais em glicose e AR são apresentados na Figura 12. A concentração de AR variou de 19,8 g/L a 25,2 g/L e a glicose de 9,45 g/L a 14,6 g/L, nas soluções aquosas com 75 g/L e 150 g/L de MS, respectivamente (Figura12a). Apesar de conter metade da glicose presente no meio HS, a solução aquosa com 75 g/L de MS apresentou concentração de AR (19,8 g/L) satisfatória para o processo fermentativo, considerando que o meio de referência contém 20 g/L de AR (glicose).

Figura 12 – Concentração de glicose e açúcares redutores (A) e conversão dos açúcares totais em glicose e açúcares redutores (B) em diferentes concentrações de soluções aquosa de melaço de soja após hidrólise ácida (5% v/v de H_2SO_4 1M) submetido a tratamento térmico a 90 °C por 10 minutos.



Fonte: Elaborada pelo autor.

A solução aquosa de MS com 75 g/L apresentou a maior conversão de AT em AR (45%) e conversão de AT em glicose similar à concentração 150 g/L de MS (média 20%) (Figura 12b). Após a adição de ácido as concentrações 75 g/L e 150 g/L de MS apresentaram pH de 2,3 e 3,1, respectivamente. A solução com 75 g/L de MS apresentou maior conversão de AR e glicose, possivelmente devido à menor concentração de sólidos no interior da solução e ao pH mais baixo do que a solução aquosa com 150 g/L de MS, o que tornou a hidrólise mais eficiente. Na hidrólise, o ácido dissocia-se em meio aquoso formando o íon hidroxônio, o qual é um agente de hidrólise que promove a quebra das ligações glicosídicas (GURGEL, 2011; HAMELINCK, 2005). Dessa forma, quanto maior a concentração de melaço na solução, maior a escassez de água e menor formação de íon hidroxônio, o que acarreta uma perda de eficiência da capacidade hidrolítica.

Em relação aos açúcares totais, as soluções apresentaram teores de 44,4 g/L e 76,2 g/L, nas soluções aquosas com 75 g/L e 150 g/L de MS, respectivamente. Tal resultado já era previsto, pois quanto maior a concentração de MS na solução maior a concentração de AT.

A solução aquosa com 75 g/L de MS hidrolisada com 5% (v/v) de ácido sulfúrico 1M, foi selecionada como um meio de fermentação, pois apresentou concentração de AR similar ao meio de referência HS. Além disso, essa solução foi utilizada como ponto central no planejamento experimental para otimizar a hidrólise, uma vez que, não se conhecia por certo, quanto de AR seria necessário na solução MS hidrolisado para satisfatória produção do biopolímero.

5.2.3 Planejamento experimental para otimizar a hidrólise

O planejamento experimental foi realizado para aumentar a disponibilidade de AR nas soluções de MS, visando incrementar a produção de CB em meio de fermentação à base de melaço. Conforme os níveis e variáveis estabelecidas no planejamento foram realizados 11 experimentos. As soluções foram analisadas quanto à disponibilidade de açúcar redutor e os resultados são apresentados na Tabela 6.

A concentração de AR variou de 2,53 (experimento 1) a 26,63 g/L (experimento 4). Os pontos centrais apresentaram uma pequena variação em suas respostas com média de 19,8 g/L de AR. A maior disponibilidade de açúcares fermentescíveis (26,6 g/L) foi observada na solução que apresentava elevada proporção de ácido (7,5% v/v) e melaço (92,7 g/L). Os resultados obtidos na matriz experimental (Tabela 5) foram submetidos à análise de regressão que permitiu avaliar os efeitos das variáveis estudadas (concentração de ácido e concentração de melaço) considerando diferentes tipos de interação entre as variáveis para concentração de AR.

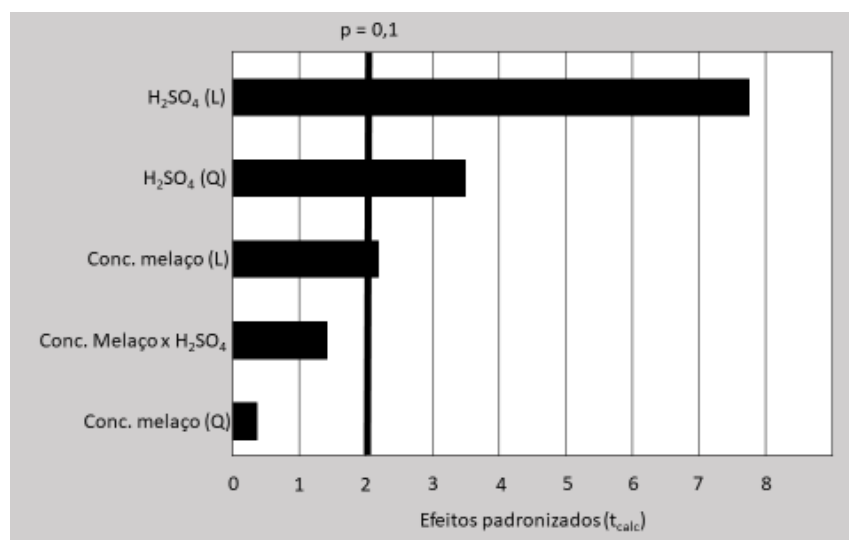
Tabela 5 - Condições experimentais do planejamento e variável de resposta.

Experimento	H ₂ SO ₄ M (%)	Melaço (g/L)	Açúcar redutor (g/L)	Conversão de açúcares em AR (%)
1	2,5	57,3	2,53 ± 0,11	7,35 ± 0,06
2	7,5	57,3	17,76 ± 0,24	51,65 ± 0,17
3	2,5	92,7	3,57 ± 0,16	6,41 ± 0,12
4	7,5	92,7	26,63 ± 0,59	47,87 ± 0,45
5	1,5	75,0	2,66 ± 0,07	5,91 ± 0,09
6	8,5	75,0	22,14 ± 0,42	29,52 ± 0,33
7	5,0	50,0	16,93 ± 0,48	33,86 ± 0,35
8	5,0	100,0	24,36 ± 0,23	40,6 ± 0,19
9	5,0	75,0	20,04 ± 0,33	44,53 ± 0,27
10	5,0	75,0	19,54 ± 0,38	43,42 ± 0,30
11	5,0	75,0	19,71 ± 0,51	43,80 ± 0,38

Fonte: Elaborada pelo autor.

No planejamento foram considerados estatisticamente significativos os termos em que $p < 0,1$, ou seja, a 10% de significância. Assim não foram significativos o termo quadrático da concentração de melaço e o termo linear da interação da entre concentração de melaço e proporção de ácido. A significância das variáveis independentes em relação a variável resposta da concentração de AR pode ser observada no gráfico de Pareto na Figura 13. Nota-se que o teor de ácido é o que mais influência no processo na hidrólise dos oligossacarídeos do melaço. Além disso, observa-se que quanto maior o teor de ácido e melaço maior a disponibilidade de AR.

Figura 13 - Gráfico de Pareto para os termos lineares e quadráticos de açúcar redutor, gerado a partir do planejamento experimental.



Fonte: Elaborada pelo autor.

A partir das variáveis significativas foi gerado um modelo matemático que representou o comportamento dos resultados experimentais apresentado na Equação 7.

$$Y_1 = 18,28 + 7,62 X_1 - 3,69 X_1^2 + 2,15 X_2 \quad (7)$$

Onde:

X_1 = volume de H₂SO₄ 1M (%)

X_2 = concentração de melaço (g/L)

Para avaliar o modelo adquirido, efetuou-se uma análise de variância (ANOVA) (Tabela 6). O valor obtido para o R^2 foi de 0,9159, indicando assim que 91,59% da variabilidade na resposta podem ser explicadas pelo modelo. Este valor é considerado satisfatório para

obtenção de um modelo válido e útil para fins preditivos. O valor do F_{calc} (19,1) obtido foi maior do que F_{tab} (2,96) indicando que há relação significativa entre as variáveis sendo possível a construção da superfície de resposta para a análise dos resultados (Figura 14).

Através da superfície de resposta gerada pode-se obter as condições que resultam em maior disponibilidade de AR. É possível observar através da superfície e curvas de contorno que para o ácido a faixa ótima é de 7% a 10% v/v para proporção de ácido e entre 90 g/L a 100g/L em solução aquosa de MS (Figura14). Desse modo observa-se que, empregando maiores concentrações de melão e volumes de ácido obtém-se elevada concentração de AR. O *software* definiu como ponto ótimo experimental utilizar uma solução com 100g/L de MS adicionada de 10% (v/v) de H_2SO_4 1M, no qual, nessas condições experimentais seria obtida uma concentração de AR de 29 g/L. Dessa forma, foi efetuada a validação experimental do resultado obtido pelo *software* realizando um ensaio na condição otimizada. A concentração de AR obtida foi de 29,2 g/L, existindo uma pequena diferença de 0,75 % com relação à concentração de AR predita pelo programa. Assim, a partir dessa condição otimizada foi formulado um meio de cultivo para produção de CB.

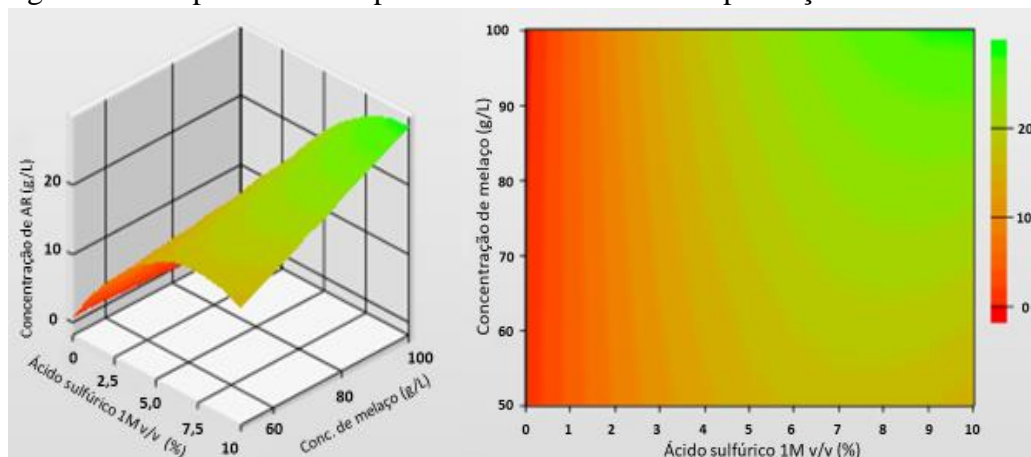
Tabela 6 - Análise de variância para a variável concentração de açúcar redutor.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	F_{cal}	p-valor
Regressão	605,9	4	151,5	19,1	0,00072
Resíduos	55,6	7	7,9		
Falta de Ajuste	49,7	4	12,4	6,3	0,08090
Erro Puro	5,9	3	2,0		
Total	661,6	11			

Fonte: Elaborada pelo autor.

% variação explicada (R^2) = 91,59%; $F_{4; 7; 0,10} = 2,96$

Figura 14 - Superfície de resposta e curvas de contorno para açúcares redutores.



Fonte: Elaborada pelo autor.

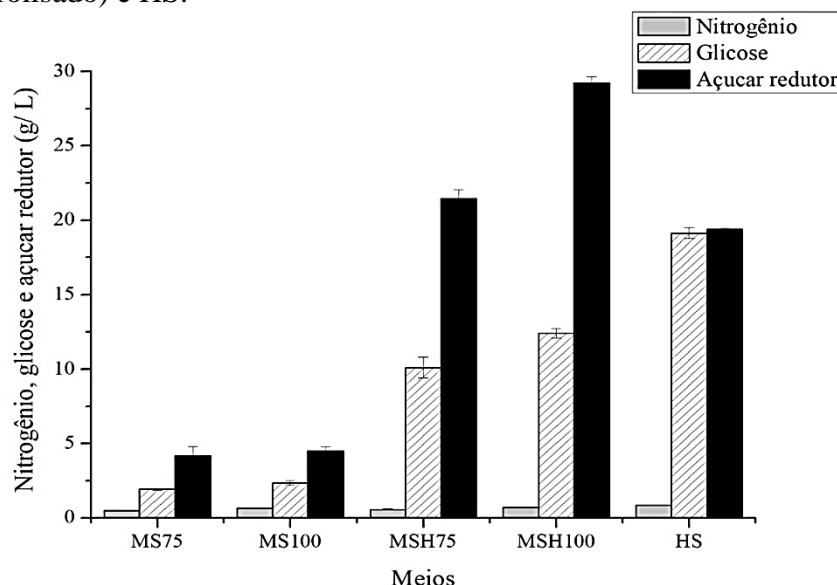
Através da superfície de resposta gerada pode-se obter as condições que resultam em maior disponibilidade de AR. É possível observar através da superfície e curvas de contorno que para o ácido a faixa ótima é de 7% a 10% v/v e para a concentração de ácido entre 90 g/L a 100g/L (Figura14). Desse modo observa-se que, empregando maiores concentrações de melação e volumes de ácido obtém-se elevada concentração de AR. O *software* definiu como ponto ótimo experimental utilizar uma solução com 100g/L de MS adicionada de 10% (v/v) de H₂SO₄ 1M, no qual, nessas condições experimentais seria obtida uma concentração de AR de 29 g/L. Dessa forma, foi efetuada a validação experimental do resultado obtido pelo *software* realizando um ensaio na condição otimizada. A concentração de AR obtida foi de 29,2 g/L, existindo uma pequena diferença de 0,75 % com relação à concentração de AR predita pelo programa. Assim, a partir dessa condição otimizada foi formulado um meio de cultivo para produção de CB.

5.3 Caracterização dos meios de fermentação

Para a fermentação foram elaborados dois meios à base de MS hidrolisado nas concentrações de, aproximadamente, 20g/L e 30 g/L de AR. Esses meios foram formulados com o intuito de avaliar em qual deles haveria melhor produção de CB. A fermentação foi realizada nos meios formulados à base de MS descritos a seguir: MSH75 (solução aquosa de 75 g/L de MS hidrolisada com 5% (v/v) H₂SO₄ 1M), MSH100 (solução aquosa de 100 g/L de MS hidrolisada com 10% (v/v) H₂SO₄ 1M), MS75 (solução aquosa de MS a 75 g/L) e MS100 (solução aquosa de MS a 100 g/L). O meio de referência HS foi utilizado como controle do processo de fermentação. As concentrações das fontes de carbono e nitrogênio são apresentadas na Figura 15.

A concentração de nitrogênio nos meios variou de 0,5 g/L a 0,9 g/L, a glicose de 1,9 g/L a 19,1 g/L e o teor de açúcar redutor de 4,2 g/L a 29,2 g/L. Os meios apresentaram baixo teor de nitrogênio nos quais a maior concentração foi observada no meio HS (0,9 g/L), seguida dos meios à base de MS hidrolisado (média 0,6 g/L) e não hidrolisado (média 0,5 g/L). A produção de CB pode ser aumentada com fontes particulares de nitrogênio, pois a fonte de nitrogênio que irá fornecer o maior rendimento de celulose varia dependendo da cepa bacteriana utilizada (SANTOS *et al.*, 2013), tendo como exemplo, licor de milho para *K. hansenii* UAC09 (RANI; APPAIAH, 2011), extrato de levedura para *K. hansenii* ATCC 23769 (LIMA *et al.*, 2017) e peptona para *Acetobacter* sp.DR-1 (RAGHUNATHAN, 2013).

Figura 15 - Concentração de nitrogênio, glicose e açúcar redutor presentes nos meios de fermentação à base de melaço de soja (hidrolisado e não hidrolisado) e HS.



Fonte: Elaborada pelo autor.

A produção do biopolímero, normalmente, apresenta maior rendimento quando são fornecidos elevada fonte de carbono e baixas concentrações de fonte de nitrogênio (RAMANA *et al.*, 2000). A influência da razão carbono/nitrogênio (C/N) foi avaliada em diferentes meios para síntese de CB por *K. xylinus* ATCC 53582 e observou-se que numa razão de C/N entre 6,9 a 57,6, a melhor produção do biopolímero foi verificada na maior relação C/N de 57,6 (JOZALA *et al.*, 2015). A relação C/N para os meios de fermentação utilizada neste estudo foi de 7,5 (MS100), 8,4 (MS100), 21,5 (HS), 35,8 (MSH75) e 41,7 (MSH100).

Em relação a fonte de carbono, os meios à base de MS não hidrolisados apresentaram baixa concentração de açúcares facilmente metabolizados pela bactéria (AR). Os meios hidrolisados demonstraram um aumento significativo na concentração de AR (83%) e glicose (81%), quando comparado com o não hidrolisado. Esse resultado era esperado, pois o tratamento de hidrólise foi realizado para elevar a concentração de açúcares fermentescíveis no meio para produção de CB. Os meios hidrolisados MSH75 e MSH100 apresentaram 21,5 e 29,2 g/L de AR e 10,1 e 12,4 g/L de glicose, respectivamente. Aumento no teor de AR, após a hidrólise de melaços, também tem sido relatado em outros estudos (BAE; SHODA, 2004; ROMÃO *et al.*, 2011). A concentração de AR e glicose do meio HS são similares ($\cong 20$ g/L), pois o único açúcar presente na composição do meio é a glicose (AR).

A concentração inicial de AR em meios de fermentação formulados a partir de fonte de nutrientes alternativas para produção de CB, relatados na literatura, varia em função do

substrato. Em meio à base de casca e bagaço de frutas o teor inicial de AR foi de 42,0 g/L (FAN *et al.*, 2016), em resíduos de levedura de cerveja de 30 g/L (LIN *et al.*, 2014), em extrato de açúcares da madeira extraídos com água quente de 20 g/L (KIZILTAS *et al.*, 2015) e em águas residuais de jujuba cristalizada de 9,5 g/L (LI *et al.*, 2015).

Os meios à base de MS apresentaram concentração de açúcares totais superior ao meio HS. Apesar da menor concentração de açúcares totais, o meio padrão contém apenas glicose como açúcar fermentescível o que o torna favorável para produção de CB pelo microrganismo. Diferentes fontes de carboidratos foram avaliadas para a produção de CB e observou-se que *K. xylinus* metaboliza, preferencialmente, monossacarídeos tais como glicose e frutose (MIKKELSEN *et al.*, 2009). As concentrações de açúcares totais dos meios de fermentação são apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7 - Concentração de açúcares totais nos meios à base de melaço de soja e HS.

Meios de cultivo	Açúcares totais (g/L)
MS75	43,2 ± 3,9
MS100	53,8 ± 3,1
MSH75	42,3 ± 4,4
MSH100	54,6 ± 2,9
HS	19,8 ± 1,5

Fonte: Elaborada pelo autor.

A composição do meio de cultura, bem como as condições de cultivo são fatores fundamentais que afetam a produção de CB e o rendimento do processo fermentativo. A hidrólise ácida do MS eleva o teor de glicose e frutose na composição do meio devido, principalmente, a hidrólise da molécula de sacarose. Além da glicose e frutose os meios à base de MS hidrolisado ainda podem apresentar açúcares como sacarose, rafinose e estaquiose (ROMÃO *et al.*, 2011).

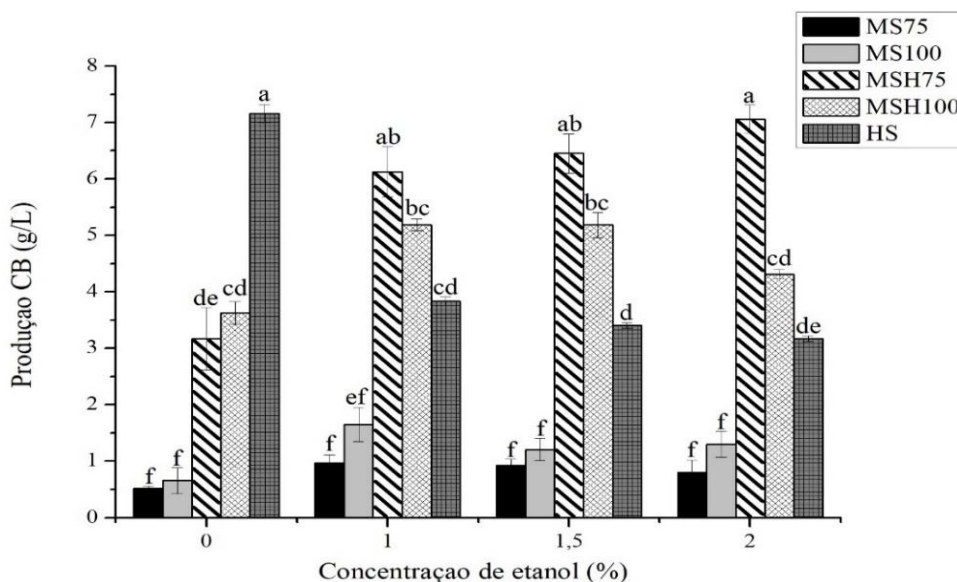
5.4 Produção da celulose bacteriana

A biossíntese de CB variou em função do meio de fermentação e da suplementação com etanol. A produção de CB nos diferentes meios de fermentação com e sem adição de etanol é apresentada na Figura 16.

5.4.2 Produção de celulose bacteriana em melaço de soja hidrolisado e HS

Nos meios sem adição de etanol a maior produção de CB foi observada no meio HS, seguida dos meios MSH100, MSH75, MS100 e MS75. Em relação aos meios à base de MS tratados com ácido, a maior produção de CB (3,6 g/L) foi observada no meio MSH100 (\cong 30 g/L AR), possivelmente, devido à maior concentração de AR presente no meio quando comparado com o meio MSH75 (\cong 20 g/L). Já os meios de melaço não hidrolisados (MS75 e MS100) não apresentaram diferença significativa, com nível de 95% de confiança, para a produção do biopolímero tendo uma produção em torno de 1,0 g/L. Comportamento similar foi verificado quando o melaço cana foi empregado, sem tratamento ácido, para síntese de CB com produção de 1,86 g/L por *A. xylinum* ATCC 10245 (KESHK; RAZER; SAMESHIMA, 2006), de 1,51 g/L por *Acetobacter* sp. V6 (JUNG *et al.*, 2010) e de 0,5 g/L por *K. xylinus* FC01 (ÇAKAR *et al.*, 2014b).

Figura 16 - Produção de CB por *K. xylinus* em meio à base de melaço de soja e HS suplementados com diferentes concentrações de etanol, após 10 dias de fermentação a 30 °C.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Nos meios hidrolisados foi observado um aumento na produção de CB, cerca de 57%, quando comparado com os meios à base de MS não tratados com ácido. Resultados similares foram observados quando utilizou-se melaço de cana hidrolisado, nos quais constatou-se que a hidrólise proporcionou um aumento na síntese de CB de 43% por *A. xylinum* BPR2001 (BAE; SHODA, 2005), de 33% por *Acromobacter* sp. (FARAG *et al.*, 2016) e de

22% por *Acetobacter* sp. V6 (JUNG *et al.*, 2010). Apesar do aumento, a biossíntese do biopolímero foi inferior à do meio de referência HS, indicando necessidade de suplementação, como adição de etanol, para elevar sua produção.

5.4.2 Produção de celulose bacteriana com suplementação com etanol

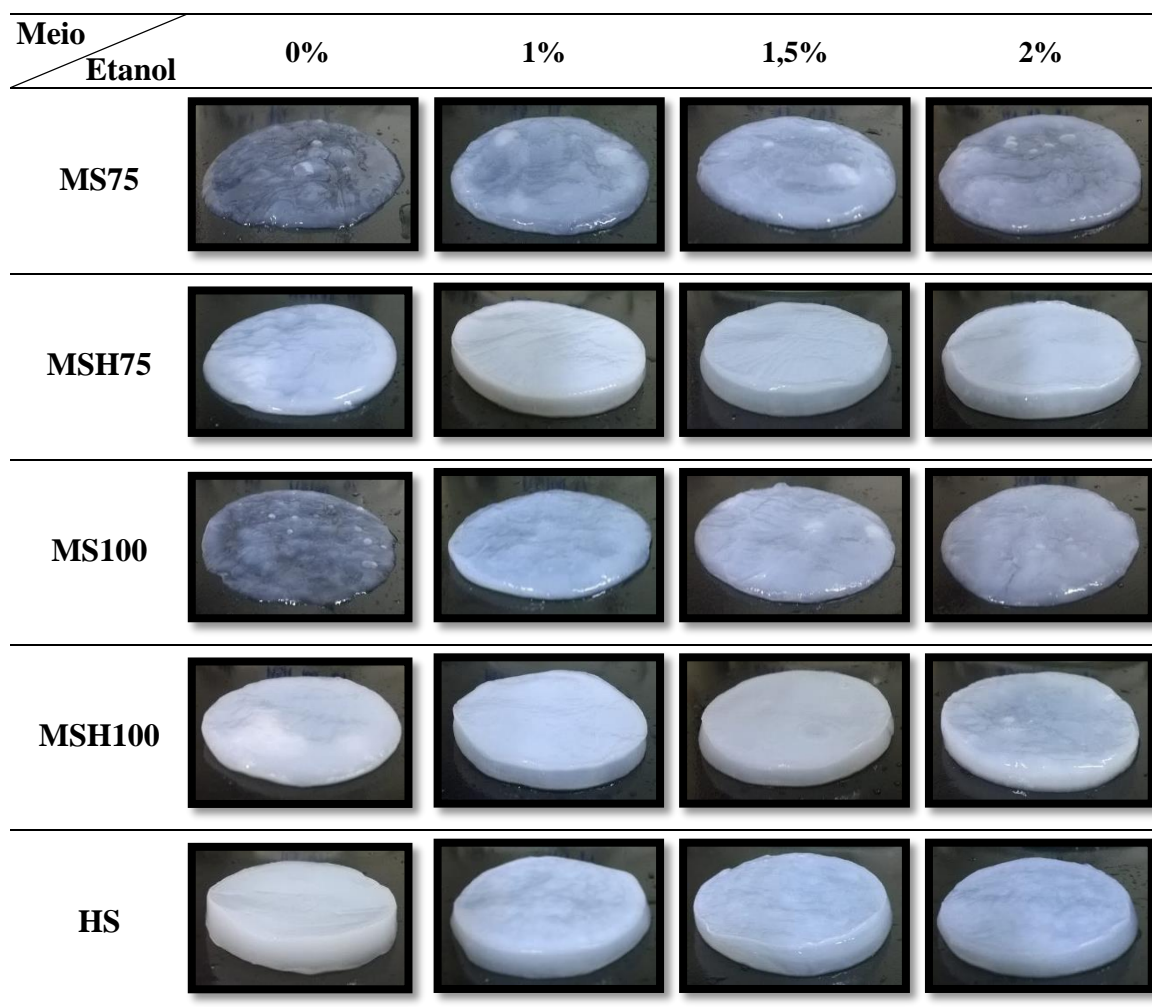
A suplementação com etanol nos meios à base de MS promoveu um incremento na síntese do biopolímero (Figura 16). As maiores produções de CB, nos meios adicionados de etanol, foram observadas no meio MSH75, na qual a maior produção foi obtida na suplementação com 2% (v/v) de etanol (7,0 g/L de CB), seguida da concentração de 1,5% (6,5 g/L) e 1% (6,1 g/L) de etanol. Em relação ao meio MSH100 a maior produção foi verificada na suplementação com 1 e 1,5% (v/v) de etanol com produção similar de 5,2 g/L de CB. O aumento da produção de CB a partir da adição de etanol pode ser atribuído à síntese de ATP, pois *K. xylinus* oxida o etanol à ácido acético que por meio do ciclo de Krebs gera ATP para o metabolismo celular. O ATP acelera a via de síntese do biopolímero devido à redução da atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase provocando inibição da via pentose fosfato e, consequentemente, aumentando a atividade da via metabólica da síntese de CB (LI *et al.*, 2012). Assim, adição de etanol aumenta a produção do biopolímero porque o microrganismo usa preferencialmente etanol como fonte de energia e glicose para formação do biopolímero (GULLO *et al.*, 2017).

Os meios à base de melaço não hidrolisado MS75 e MS100, suplementados com etanol, apesar do aumento quando comparado com os meios não adicionados de etanol, apresentaram baixa produção de CB (aproximadamente 1,15 g/L). Esse resultado indica que apenas a suplementação com etanol não foi suficiente para elevar a síntese do biopolímero de forma satisfatória, confirmando a necessidade de proceder com a hidrólise ácida do melaço para aumentar a disponibilidade de açúcares fermentáveis no meio e consequentemente melhorar a produção de CB. As imagens das membranas de CB obtidas em nos diferentes meios de fermentação utilizados são apresentadas na Figura 17.

Em relação ao meio HS a suplementação com etanol não apresentou aumento na produção de CB, pois observou-se que à medida que o etanol foi adicionado ao meio de fermentação ocorreu uma redução, cerca de 50%, na síntese do biopolímero (Fig. 16). Durante o crescimento o metabolismo respiratório de *K. xylinus*, oxida etanol a ácido acético e converte a glicose em ácido glucônico. Todas essas formações ácidas causam diminuição do pH do meio de cultura durante o processo fermentativo e afetam o desenvolvimento microbiano (HA *et al.*,

2011; KONGRUANG, 2008; LIN *et al.*, 2013). Ao final de 10 dias cultivo foi observado que em meio HS houve redução no pH proporcional a adição de etanol. O pH final no meio HS foi em torno de 6,0, enquanto que, o HS adicionado de 1%, 1,5% e 2% v/v de etanol apresentaram pH 4,2, 4,0 e 3,9, respectivamente, o caráter ácido do meio de fermentação pode ter interferido no desenvolvimento do microrganismo causando uma diminuição na produção de CB. A cepa utilizada é outro fator que pode ter influenciado nesse resultado, pois em outros estudos a suplementação com 1% (v/v) de etanol ao meio HS proporcionou um aumento na síntese do biopolímero produzido por *A. xylinum* ATCC 10245 (YUNOKI *et al.*, 2004) e *A. xylinum* E25 (KRYSTYNOWICZ *et al.*, 2002).

Figura 17 – Membranas de celulose bacteriana produzidas em meios HS e MS (hidrolisado e não hidrolisado) com e sem suplementação com etanol (v/v) após 10 dias de fermentação em cultivo estático a 30 °C.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Na literatura tem sido relatado melhoria na produção de CB pela suplementação em diferentes meios de fermentação com concentração de etanol entre 0,5 a 2% (v/v) (ÇAKAR *et al.*, 2014a; KRYSTYNOWICZ *et al.*, 2002; LI *et al.*, 2012; MOHAMMADKAZEMI; DOOSTHOSEINI; AZIN, 2015; PARK *et al.*, 2003; SON *et al.*, 2001; SON *et al.* 2003). Segundo Li *et al.* (2012) a adição de etanol melhora a produção de CB, pois aumenta a energia do metabolismo e reduz a formação de metabolitos que podem inibir a síntese do biopolímero.

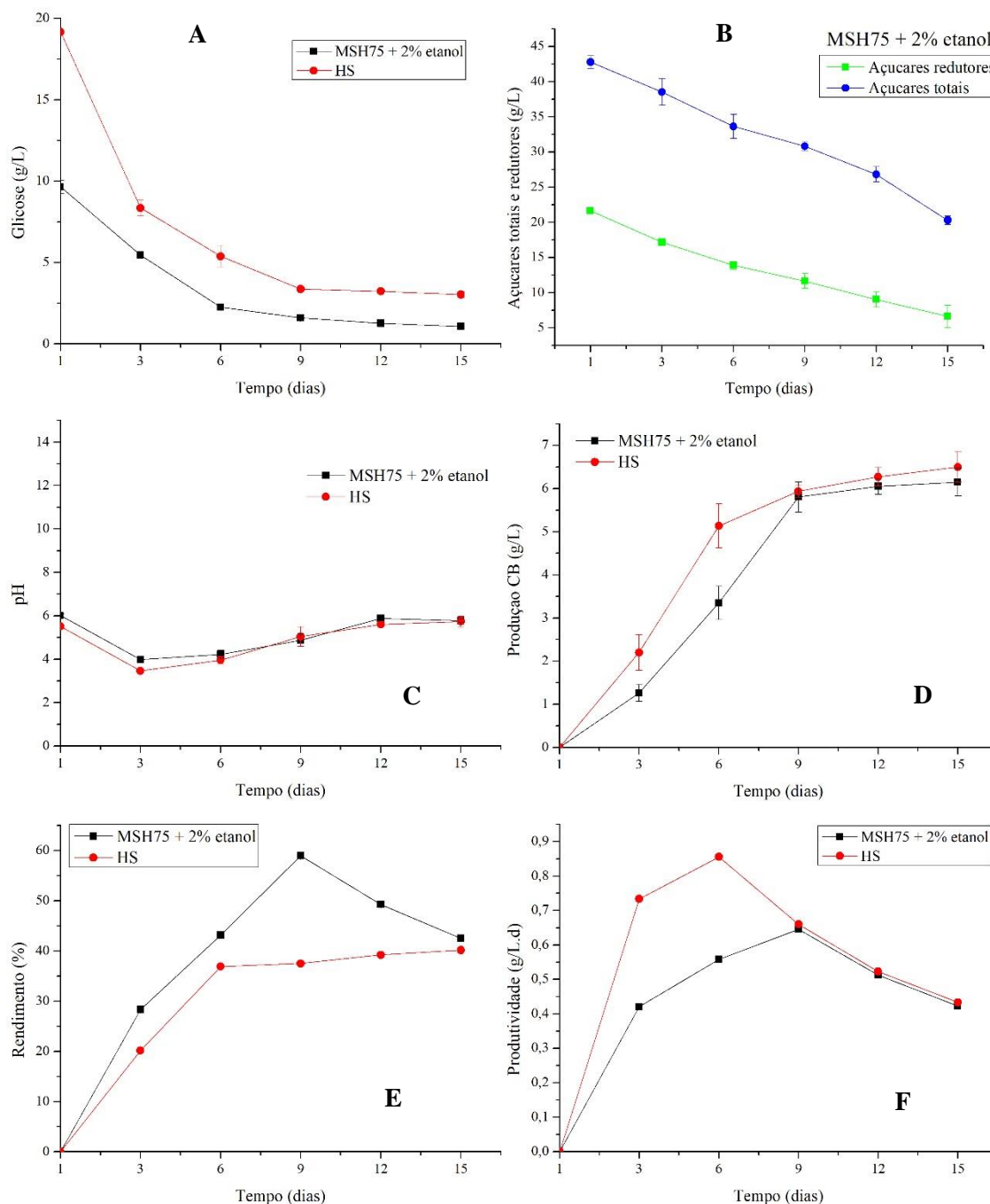
Além do baixo custo do MS e do etanol, outra vantagem obtida no meio formulado à base de MS foi que não houve a necessidade de suplementação com fonte de nitrogênio, como extrato de levedura (FAN *et al.*, 2016; NASCIMENTO *et al.*, 2016; LIMA *et al.*, 2017) e licor de milho (COSTA *et al.*, 2017; VAZQUEZ *et al.*, 2013) para elevar a produção do biopolímero.

5.5 Perfil da fermentação na síntese de celulose bacteriana

O meio de cultivo MSH75 suplementado com 2% (v/v) de etanol foi selecionado como o mais promissor para a produção de CB; portanto, foi usado para comparar com a cinética de produção em meio HS. A cinética foi realizada avaliando os perfis de produção de CB (g/L), glicose (g/L), pH, rendimento sobre os açúcares consumidos (%) e produtividade (g/L.h) em função do tempo de fermentação. Especialmente para o meio MSH75 suplementado com 2% de etanol por apresentar outros açúcares, além da glicose, foi verificado o perfil do consumo de açúcar redutor (g/L) e açúcares totais (g/L) durante o processo fermentativo. O perfil da fermentação dos meios MSH75 suplementado com 2% de etanol e HS são apresentados na Figura 18; e as imagens das membranas obtidas periodicamente a cada três dias em meio MSH75 suplementado com 2% (v/v) de etanol (A) e HS (B) são apresentados nas Figura 19.

No início da fermentação ambos os meios apresentaram um elevado consumo de glicose no qual observou-se que, aproximadamente, metade da glicose 5,5 g/L e 10,8 g/L, presente nos meios MSH75 suplementado com 2% (v/v) de etanol e HS, respectivamente, foi consumida nos três primeiros dias de cultivo e empregada para produção do biopolímero. A contar de sexto dia fermentação foi verificado um consumo gradativo até o 9º dia de cultivo, a partir desse dia houve uma estabilização no consumo de glicose até o último dia do processo fermentativo. No final dos 15 dias de fermentação verificou-se baixas concentrações de glicose restando apenas 1,1 g/L no meio MSH75 suplementado com 2% (v/v) de etanol e 3,0 g/L no meio HS (Figura18a).

Figura 18 – Perfil da fermentação por *K. xylinus* no meio MSH75 suplementado com 2% (v/v) de etanol (■) e HS (●) sob condição estática durante 15 dias de cultivo a 30 °C. (A) Consumo de glicose; (B) Consumo de AR (■) e AT (●) no meio MSH75 suplementado com 2% (v/v) de etanol; (C) pH; (D) Produção CB; (E) Rendimento sobre os açúcares consumidos e (F) Produtividade.

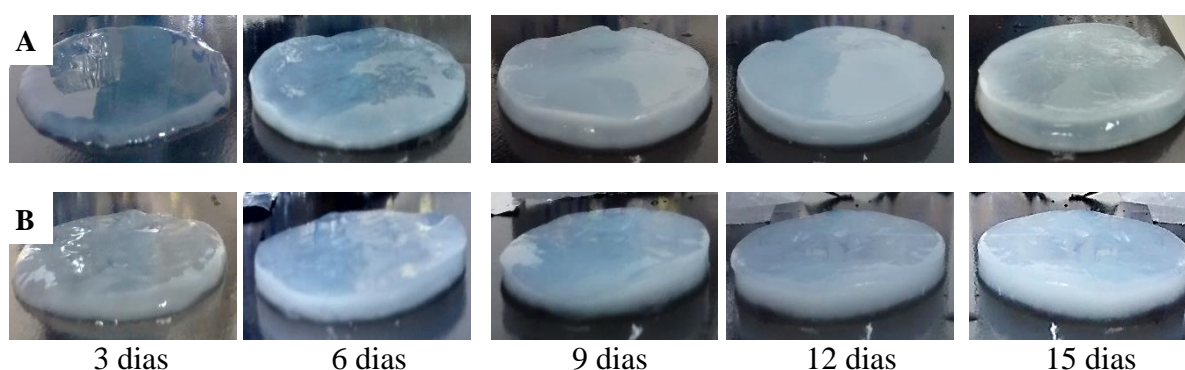


Fonte: Elaborada pelo autor.

O meio MSH75 suplementado com 2% (v/v) de etanol continha aproximadamente 20,0 g/L de AR e 43,0 g/L de açúcares totais que foi sendo consumido progressivamente com tempo de cultivo para produção do biopolímero. Ao final do processo fermentativo restaram

6,62 g/L de AR e 22,2 g/L de açúcares totais (Figura18b). Pelo perfil do consumo da fonte de carbono no meio MSH75 suplementado com 2% (v/v) de etanol, confirma-se preferência do microrganismo por monossacarídeos no qual para síntese de CB a bactéria consumiu 89% da glicose, 72% de AR e 52% de açúcares totais. Como metade dos AT presente no meio de melaço é AR, conclui-se que a bactéria pouco consumiu os oligossacarídeos presentes no meio de cultivo.

Figura 19 - Membranas de CB em meio MSH75 suplementado com 2% (v/v) de etanol (A) e HS (B) obtidas em diferentes intervalos de fermentação durante 15 dias de cultivo estático a 30 °C.



Fonte: Elaborada pelo autor.

O consumo acelerado de açúcar nos primeiros três dias de fermentação provocou uma redução média do pH de 5,8 para 3,9 (Figura18c). Os principais metabólitos da cepa *K. xylinus* contribuem para o aumento de ácidos orgânicos, principalmente, devido a glucose-desidrogenase, ligada à membrana de *G. xylinus*, converter a glicose extracelular em ácido glucônico (SHIGEMATSU *et al.*, 2005). Similarmente Yang *et al.* (2013b) observaram que o pH do meio diminuiu (5 para 2) e atingiu seu valor mais baixo durante os primeiros 3 dias de fermentação durante a produção de CB a partir de *Pennisetum purpureum* (capim) hidrolisado com ácido sulfúrico. A partir do sexto dia de cultivo o pH começou a ter um aumento vindo a se estabilizar em torno de 5,7 no final do período de fermentação. Desse modo, o consumo de glicose acarreta a diminuição do pH devido a produção de metabólitos de caráter ácido. Os ácidos orgânicos produzidos serão ainda utilizados para o crescimento celular e produção de CB quando o açúcar disponível diminuir para um nível mais baixo (WU *et al.*, 2012).

Observou-se nos meios um comportamento similar na síntese do biopolímero com crescente produção de biocelulose até o 6º dia de cultivo, entretanto, o meio HS apresentou desempenho superior na produção de CB quando comparado com o meio de melaço

hidrolisado. Esta menor produção inicial em meio MSH75 pode ser atribuído a adaptação da cepa ao meio de melaço, uma vez que, o inóculo é mantido em meio HS. Apesar disso, a contar do 9º dia de cultivo, ambos os meios apresentaram produção de CB semelhantes. Também foi observado que a partir do 9º dia não houve aumento significativo com nível de 95% de confiança na síntese do biopolímero até o 15º dia de cultivo, esta estabilização na produção de CB provavelmente está relacionada ao esgotamento dos nutrientes do meio de fermentação (Figura 18d). Na cinética da síntese de CB em meio à base de melaço de cana-de-açúcar hidrolisado, observa-se que depois de 7 dias de incubação a produção de CB aumentou consideravelmente, entretanto, a partir do décimo dia de incubação observou-se uma estabilização da produção do biopolímero até o último dia de fermentação (15 dias) (ÇAKAR *et al.*, 2014b).

O maior rendimento sobre os açúcares consumidos e produtividade em meio à base de MS hidrolisado foram observados no 9º dia com 59,0% e 0,648 g/L.d, respectivamente. Já para o meio HS, o maior rendimento sobre o substrato de 37,0% e produtividade de 0,840 g/L.d foram verificados no 6º dia de cultivo (Figura 18e, f). Em outros estudos diferentes espécies do gênero *Komagataeibacter* apresentaram produtividade de 0,168 g/L.d obtida a partir de águas residuais de fermentação (HUANG *et al.*, 2015), 0,360 g/L.d a partir de águas residuais de jujuba cristalizada (LI *et al.*, 2015), 0,696 g/L.d a partir de bagaço de uva (VAZQUEZ *et al.*, 2013) e 1,176 g/L.d a partir de palha de trigo hidrolisada (CHEN *et al.*, 2013). Verifica-se que, a produtividade encontrada neste estudo foi razoável quando comparado com outros meios alternativos relatados na literatura. Observa-se que, os melhores resultados de rendimento e produtividade foram inicialmente verificados em meio HS e, posteriormente, em meio MSH75 devido à provável aclimação da cepa ao meio de fermentação alternativo. Acredita-se que o tempo para maior produtividade, em meio à base de MS, pode ser diminuído se for utilizado inóculo de *K. xylinus* já em meio de MS promovendo a adaptação da cepa antes do período de fermentação.

O perfil de fermentação do meio à base de MS apresentou algumas similaridades e diferenças quando comparado com o meio HS. Apesar do meio HS ter demonstrado desempenho superior na produção de CB nos seis primeiros dias de fermentação, a partir no 9º dia de cultivo ambos os meios apresentaram produção de CB semelhantes. Além disso, confirmou-se que tempo de cultivo utilizado neste estudo (10 dias) foi adequado para síntese do biopolímero, pois a partir no 9º dia de fermentação não foi observado diferença significativa, ao nível de 95% de confiança, na produção de CB.

5.6 Caracterização da celulose bacteriana

O meio de cultivo MSH75 adicionado de 2% (v/v) de etanol (MSH75 +) apresentou a melhor produção de CB. Assim as membranas obtidas desse meio e de seu controle MSH75 sem adição de etanol (MSH75-), foram submetidas à caracterização para comparar com as características das membranas obtidas de HS (HS-) e HS suplementado com 2% (v/v) de etanol (HS+).

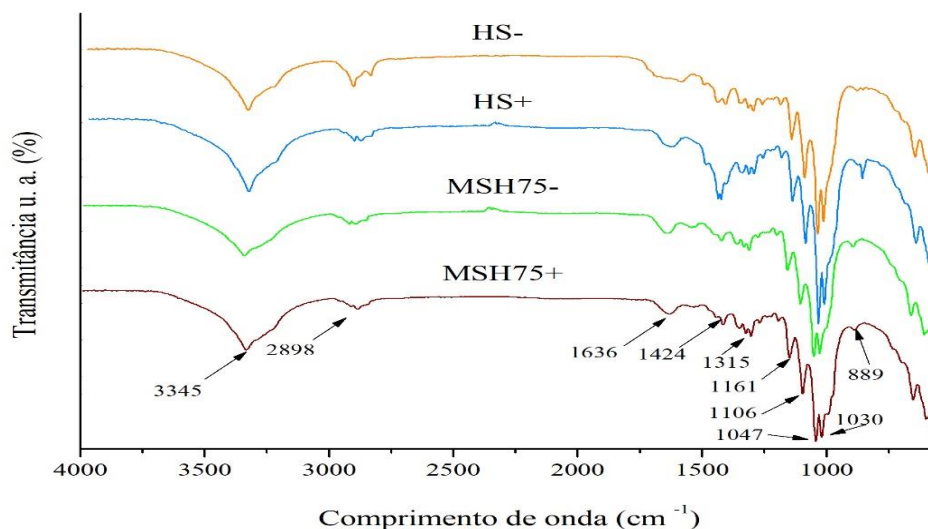
5.6.1 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR das películas obtidas dos meios HS e MSH75 com (+) e sem (-) 2% (v/v) de etanol estão apresentados na Figura 20. Essa análise possibilitou verificar se houve alterações nos grupos funcionais presentes nas membranas de CB, devido à composição dos diferentes meios de cultura, permitindo concluir que ocorreram modificações químicas na estrutura do biopolímero.

A região com o comprimento de onda em torno de 3345 cm^{-1} corresponde ao estiramento dos grupos O-H presentes na celulose tipo I. A banda em 2898 cm^{-1} referente ao estiramento C-H e estiramento assimétrico de CH_2 . Os picos em 1636 cm^{-1} são atribuídos às vibrações de deformação do O-H provenientes de moléculas de água adsorvida. Bandas de absorção nas regiões perto de 1424 cm^{-1} e 1315 cm^{-1} são atribuídas às deformações de CH_2 e O-H, respectivamente. Bandas típicas de celulose também são observadas em 1161 e 1106 cm^{-1} correspondente ao estiramento antissimétrico de C-O-C e estiramento simétrico de C-O, respectivamente. As frequências observadas em 1047 e 1030 cm^{-1} são referentes às deformações C-O de C-OH de carboidratos e em 889 cm^{-1} são atribuídas às vibrações de C-H (Figura18) (GEA *et al.*, 2011; PECORARO *et al.*, 2008). A região com o comprimento de onda em torno de 2350 cm^{-1} (HS+ e MSH75-) evidencia a absorção de CO_2 devido à interferência do ambiente no momento da análise.

As películas apresentaram bandas características de CB, sem a presença de bandas 1538 , 1730 - 1735 , 3150 - 3220 referentes a nitrogênio, estruturas proteicas, ou possíveis contaminantes (MOVASAGHI *et al.*, 2008), indicando a eficiência da etapa de purificação com NaOH 2% (m/v). Vale salientar que a metodologia aplicada na purificação foi simples, com apenas NaOH, e eficaz sem a necessidade de outros agentes de branqueamento tais como lauril sulfato de sódio para purificação de CB obtida em melão de beterraba (KESHK *et al.*, 2006) e peróxido de hidrogênio (LIMA *et al.*, 2017) para membranas obtidas de suco de sisal.

Figura 20 - Espectros de FTIR de CB obtida nos meios HS e MSH75 com (+) /sem (-) suplementação com 2% de etanol.



Fonte: Elaborada pelo autor.

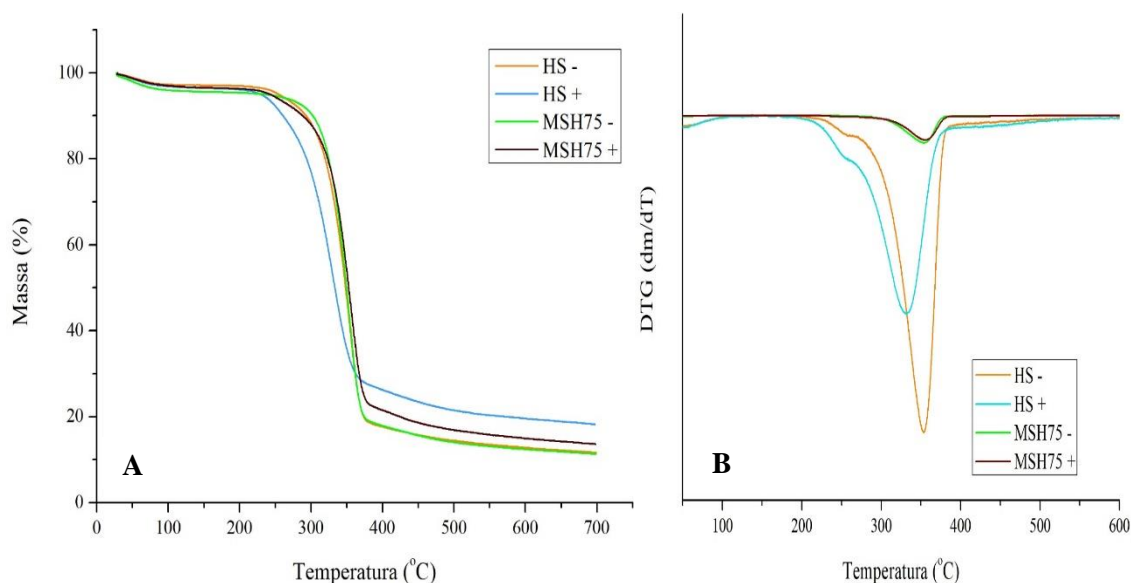
Os espectros de FTIR das membranas obtidas dos diferentes meios de cultivo foram semelhantes às do meio HS constatando que o MS e o etanol não afetaram estrutura química da CB. Comparando os espectros de celulose padrão (HS) com o de celulose produzida em meio de melaço de cana hidrolisado verifica-se que as membranas obtidas, independente do meio, apresenta bandas semelhantes a celulose produzida em meio HS indicando que a composição dos meios não modifica a estrutura química do biopolímero (ÇAKAR *et al.*, 2014b; TYAGI, SURESH, 2016). Outros meios alternativos utilizados para produção de CB como melaço de beterraba (KESHK *et al.*, 2006), extrato de lichia (YANG *et al.*, 2016), bagaço de uva (VAZQUEZ *et al.*, 2013) e alfarroba (BILGI *et al.*, 2016) também não alteraram as propriedades estruturais do biopolímero.

5.6.2 Análise Termogravimétrica (TGA)

A Figura 21 apresenta o comportamento de decomposição térmica das membranas de CB, em percentagem da massa em função da temperatura, que permiti estabelecer a faixa de temperatura que as membranas começam a se decompor. Observa-se nas curvas termogravimétricas que as membranas de CB obtidas, independente do meio, apresentaram um processo de decomposição térmica aproximados. As curvas de TGA obtidas para as membranas de CB exibiram, inicialmente, uma pequena perda de massa (3-5%) em torno de 100 °C devido

à perda de água, como também foi observado por Gea *et al.* (2011) e Mohammadkazemi, Azin e Ashori (2015).

Figura 21 - Curvas termogravimétricas (A) e DTG (B) das membranas de CB obtida nos meios HS e MSH75 com (+) e sem (-) suplementação com 2% de etanol.



Fonte: Elaborada pelo autor.

O segundo evento de perda de massa foi atribuído ao início do processo de decomposição das membranas nas temperaturas em torno de 312 °C (Figura 21a e Tabela 8). A degradação da celulose compreende a desidratação e decomposição das unidades de glicose (BARUD *et al.*, 2008; VAZQUEZ *et al.*, 2013; CHANG *et al.*, 2010). As membranas de CB produzidas a partir do meio HS+ demonstraram uma menor estabilidade térmica em comparação com outros meios de cultura podendo ser verificada pela menor temperatura inicial de degradação (*Tonset*) 276 °C. A temperatura inicial de perda de massa do meio HS+ indica que a adição de etanol ao meio HS reduziu, aproximadamente 11%, a estabilidade térmica da membrana quando comparado ao seu controle HS-.

A degradação térmica é afetada por fatores estruturais variáveis, como massa molecular, cristalinidade e arranjo das fibras (VAZQUEZ *et al.*, 2013). No caso da CB obtida do meio HS+, os resultados de DRX mostraram uma ligeira redução da cristalinidade (Tabela 9) e apresentou menor dimensão das nanofibrilas (Tabela 10) que poderia ser a razão para o comportamento térmico observado. Portanto, a CB obtida dos meios HS-, MSH75- e MSH75+ apresentaram-se mais estáveis termicamente que a membrana obtida no meio HS+ verificadas pelas maiores *Tonset*. As maiores *Tonset* indicam que o meio forma um biopolímero com

interações químicas mais eficazes (como ligações de hidrogênio) com os grupos hidroxílicos da CB que acarreta um aumento em sua estabilidade térmica (SALVI *et al.*, 2014).

Tabela 8 – Temperaturas e perdas de massa da CB obtida nos meios HS e MSH75 com (+) e sem (-) suplementação com 2% de etanol.

CB	Tonset (°C)	Tendset (°C)	Perda de massa (%)	Temperatura máxima de degradação (°C)
HS -	312	376	82	352
HS +	276	356	73	329
MSH75 -	313	376	81	355
MSH75 +	312	378	76	357

Fonte: Elaborada pelo autor.

A temperatura final de decomposição térmica (*Tendset*) das membranas dos diferentes meios foi em torno de 376 °C, exceto para as membranas do meio HS+ que apresentaram *Tendset* mais baixa em 356 °C. O processo de degradação das cadeias glicosídicas que compõem a celulose ocorre a um intervalo de temperatura de 200 a 400 °C (GEA *et al.*, 2011; PACHECO *et al.*, 2017; TYAGI, SURESH, 2016; VAZQUEZ, *et al.*, 2013). Após a *Tendset* ocorre a degradação termo-oxidativa da celulose que corresponde a formação de resíduo carbonoso e é conhecida como fase de carbono (EL-SAIED *et al.*, 2008).

Por meio das curvas de DTG observou-se que as temperaturas de decomposição máxima (Tmax) das membranas ocorreram entre 352-357 °C com perda significativa de massa 76-82%, exceto para CB do meio HS+ a 329 °C e 73%, respectivamente (Figura 21b e Tabela 8). A Tmax pode variar dependendo do meio de cultivo e cepa utilizada, desse modo, segundo alguns autores a Tmax ocorreu em 310 °C para CB produzida em meio de licor de milho por *K. hansenii* UCP1619 (COSTA *et al.*, 2017), de 343 °C em casca de frutas por *K. hansenii* MCMB-967 (KUMBHAR *et al.*, 2015) e de 360 - 390 °C em HS modificado *K. xylinus* PTCC 1734 (MOHAMMADKAZEMI DOOSTHOSEINI; AZIN, 2015).

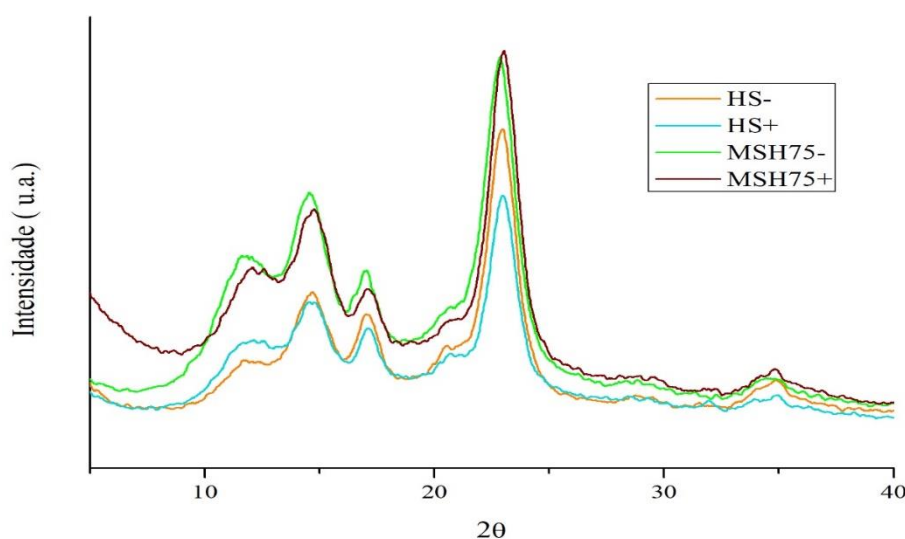
A temperatura máxima de degradação é um critério de estabilidade térmica, portanto, quanto maior a Tmax maior a estabilidade térmica do biopolímero. Verificou-se que meios de MS exibiram, ligeiramente, maior temperatura de decomposição máxima e menor velocidade de decomposição que às do meio HS, indicando maior estabilidade térmica. Este resultado pode ser associado às características das nanofibrilas do meio MS que apresentaram dimensões aproximadas, e agregadas considerando o meio MSH75+, frente às do meio padrão

(Figura23). Os meios à base de melaço apresentaram comportamento de degradação térmica similar ao meio HS- (Figura19). Este resultado indica que o meio alternativo formulado à base de melaço não afeta as propriedades térmica da CB.

5.6.3 Difração de Raios X (DRX)

Para comparar as mudanças micro estruturais da CB obtida dos diferentes meios foi utilizada difração de raios X e seus difratogramas são apresentados na Figura 22. Os difratogramas de raios X das CB obtidas de diferentes meios apresentaram padrões típicos de celulose do tipo I e II com picos de difração 2θ em $12,1^\circ$, $14,5^\circ$, $16,7^\circ$, $22,6^\circ$ e $34,5^\circ$ (Figura22). Os picos das membranas de CB obtidas nos diferentes meios não apresentaram deslocamento significativo de celulose tipo I e II em 2θ . Os planos de cristal 101, 10-1 e 200 correspondem aos picos de $14,5^\circ$, $16,7^\circ$ e $22,6^\circ$, respectivamente (CASTRO *et al.*, 2011; SUN *et al.*, 2007).

Figura 22 - Difratogramas de raios X de CB obtidas em meios HS e MSH75 com (+) e sem (-) suplementação com etanol.



Fonte: Elaborada pelo autor.

O índice de cristalinidade (IC) apresentados na Tabela 9 foi estimado com base nos difratogramas. As películas obtidas a partir de MS apresentaram, ligeiramente, menor percentual de cristalinidade (74%) que as produzidas usando o meio HS- que foi caracterizada com um índice de cristalinidade de 80%. Esse resultado indica que a composição do meio de cultura induziu a pequenas diferenças no processo de cristalização de celulose. Em outros estudos a utilização de melaço de cana (JUNG *et al.*, 2010; KESHK, SAMESHIMA, 2006;

VAZQUEZ et al., 2013) e a utilização de substratos alternativos (HUANG et al., 2015; KIZILTAS et al., 2015; KHATTAK et al., 2015) em vez de glicose para síntese do biopolímero também diminuíram os valores do índice de cristalinidade da CB quando comparado com o meio padrão.

O valor de cristalinidade encontrado para as películas de CB em meio HS com adição de etanol apresentou-se inferior ao encontrado para as membranas obtidas no meio HS sem etanol, possivelmente devido a uma menor organização das cadeias de celulose. A adição de etanol ao meio HS acarretou uma redução no IC, entretanto, Mohammadkazemi, Doosthoseini e Azin (2015) relataram em seu estudo que a produção de CB por *K. xylinus* PTCC 1734 em meio HS suplementado com 1% de etanol elevou a produção de CB e apresentou maior IC (76,2%) que o meio HS sem adição de etanol (64,9%).

Tabela 9 - Índice de cristalinidade das membranas de CB obtidas em meios HS e MSH75 com (+) e sem (-) suplementação com etanol.

CB	Índice de cristalinidade (%)
HS -	80
HS +	73
MSH75 -	74
MSH75 +	75

Fonte: Elaborada pelo autor.

O valor de cristalinidade encontrado para as películas de CB em meio HS com adição de etanol apresentou-se inferior ao encontrado para as membranas obtidas no meio HS sem etanol, possivelmente devido a uma menor organização das cadeias de celulose. A adição de etanol ao meio HS acarretou uma redução no IC, entretanto, Mohammadkazemi, Doosthoseini e Azin (2015) relataram em seu estudo que a produção de CB por *K. xylinus* PTCC 1734 em meio HS suplementado com 1% de etanol elevou a produção de CB e apresentou maior IC (76,2%) que o meio HS sem adição de etanol (64,9%).

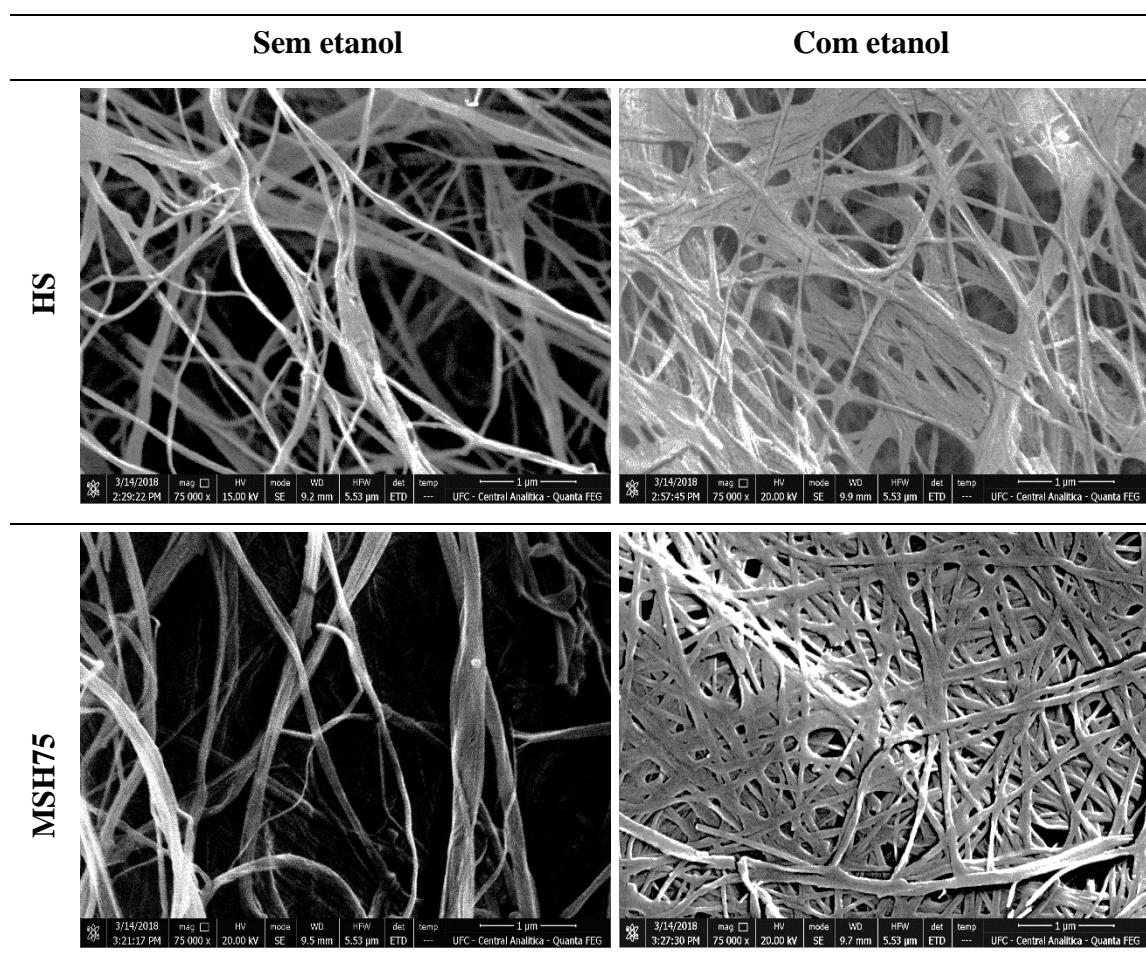
A cristalinidade da CB, em geral, encontra-se entre 60-90% (FANG, CATCHMARK, 2015; PECORARO *et al.*, 2008; TSOUKO *et al.*, 2015). A CB obtida dos meios à base MS apresentou menor cristalinidade que as do meio HS, contudo, essas membranas apresentaram IC típico de CB.

5.6.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A microscopia foi utilizada para examinar a morfologia da superfície de rede tridimensional da celulose produzida nos diferentes meios e suas micrografias são apresentadas na Figura 23.

As micrografias obtidas da CB produzida nos meios de melaço e HS- apresentaram estrutura nanofibrilada e entrelaçada (sem qualquer tipo específico de orientação) variando de 79 a 99 nm em diâmetro (Tabela 10), tais observações concordam com a morfologia típica do biopolímero (FANG; CATCHMARK, 2015; LEE *et al.*, 2014; PECORARO *et al.*, 2008).

Figura 23 – Micrografias das membranas de CB obtidas nos meios HS e MSH75 com (+) e sem (-) suplementação com 2% de etanol (aumento de 75000x).



Fonte: Elaborada pelo autor.

Foi detectada diferença morfológica entre as micrografias dos meios HS- e HS +, o meio com adição de etanol apresentou nanofibras mais finas e aglomeradas que acarretou uma redução na estabilidade térmica (Figura21), cristalinidade (Tabela 9) e propriedades mecânicas

(Tabela 11). As membranas do meio MSH75- apresentaram abundância de espaço entre as nanofibras e do meio MSH75+ exibiram nanofibras mais entrelaçadas e agregadas quando comparadas com meio HS sem adição de etanol (Figura23). Este resultado indica que a composição do meio modifica a estrutura da tridimensional do biopolímero. A literatura relata que a síntese de CB em meio à base de melaço de cana-de-açúcar apresenta rede de fibrila mais densa quando comparada com a micrografia do meio HS (ÇAKAR *et al.*, 2014a).

Tabela 10 - Dimensões das nanofibras das membranas de CB obtidas em meios HS e MSH75 com (+) e sem (-) suplementação com etanol.

Meios de cultivo	Dimensões (nm)
HS-	90 ± 7
HS+	79 ± 6
MSH75-	88 ± 8
MSH75+	99 ± 5

Fonte: Elaborada pelo autor.

Foi detectada diferença morfológica entre as micrografias dos meios HS- e HS +, o meio com adição de etanol apresentou nanofibras mais finas e aglomeradas que acarretou uma redução na estabilidade térmica (Figura21), cristalinidade (Tabela 10) e propriedades mecânicas (Tabela 12). As membranas do meio MSH75- apresentaram abundância de espaço entre as nanofibras e do meio MSH75+ exibiram nanofibras mais entrelaçadas e agregadas quando comparadas com meio HS sem adição de etanol (Figura23). Este resultado indica que a composição do meio modifica a estrutura da tridimensional do biopolímero. A literatura relata que a síntese de CB em meio à base de melaço de cana-de-açúcar apresenta rede de fibrila mais densa quando comparada com a micrografia do meio HS (ÇAKAR *et al.*, 2014a).

Comparando os meios de melaço observou-se a adição de etanol aumentou a densidade e agregação da rede de nanofibras, pois a adição de etanol tornou as películas de CB mais espessas. Estes resultados concordam com os encontrados por Mohammadkazemi, Doosthoseini e Azin (2015) que estudaram o efeito do meio e do etanol sobre a produção de CB por *K. xylinus* (PTCC 1734) e observaram que a adição de etanol alterou significativamente a morfologia da CB mostrando uma estrutura mais densa.

5.6.5 Ensaios mecânicos

Os resultados do ensaio de tração utilizado para caracterizar as propriedades mecânicas das películas de CB produzida com o meio à base de MS e com o HS são apresentados na Tabela 12. Os módulos de tensão de ruptura, alongamento na ruptura e módulo de elasticidade foram determinados através das curvas de tensão-deformação obtidas nos ensaios de tração (Figura 24). O biopolímero obtido dos diferentes meios de fermentação apresentou variação da tensão de ruptura de 99,0 a 137,6 MPa, da elongação na ruptura de 1,6 a 4,8 % e do módulo de elasticidade de 1424,7 a 2518,0 MPa. As membranas de CB obtidas em meio HS+ e MSH75- apresentaram menor resistência à tração em comparação ao meio HS- e MSH75+, respectivamente. Isto ocorreu provavelmente devido às diferenças morfológicas nos biopolímeros obtidos, nos quais nanofibras mais grossas resistem melhor contra a força aplicada para a sua deformação resultando em propriedades mecânicas superiores (HA *et al.*, 2011; UL-ISLAM *et al.*, 2011). Desse modo, os meios HS+ e MSH75- exibiram nanofibras mais finas quando comparado com HS- e MSH75+, respectivamente (Tabela 10). As membranas obtidas nos meios HS- e MSH75+ apresentaram maior resistência à tração com 137,6 e 134,1 MPa, respectivamente, pois apresentaram maiores dimensões de nanofibrilas

Tabela 11 - Propriedades mecânicas das membranas de CB obtidas nos meios HS e MSH75 com (+) e sem (-) suplementação com etanol.

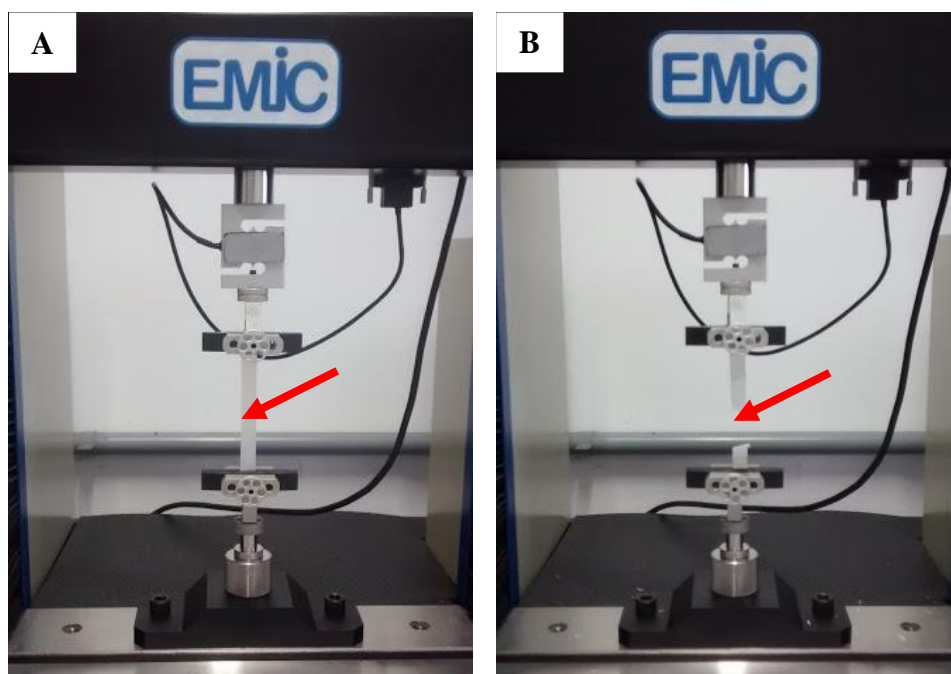
CB	Espessura (µm)	Tensão de ruptura (MPa)	Elongação na ruptura (%)	Módulo de elasticidade (MPa)
HS -	80,0 ± 3,0 ^a	137,6 ± 2,8 ^a	2,8 ± 0,2 ^{ab}	2504,7 ± 2,8 ^b
HS +	31,0 ± 1,0 ^d	106,6 ± 3,2 ^c	1,6 ± 0,3 ^b	2518,0 ± 4,4 ^a
MSH75 -	44,0 ± 4,0 ^c	99,0 ± 2,1 ^d	2,5 ± 0,3 ^b	1508,6 ± 1,5 ^c
MSH75 +	72,0 ± 3,0 ^b	134,1 ± 2,4 ^b	4,8 ± 1,7 ^a	1424,7 ± 1,4 ^d

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os valores de deformação para HS+ (1,6%) e MSH75- (2,5%) foram inferiores a HS- (2,8%) e MSH75+ (4,9%), respectivamente. As nanofibras de CB firmemente arranjadas apresentam dificuldade em expandir com a força aplicada e assim podem limitar o alongamento antes da ruptura (KHATTAK *et al.*, 2015). As membranas de HS apresentaram maior rigidez, ou seja, menor deformação elástica com 2504,7 e 2518,0 MPa para HS- e HS+, respectivamente. O Módulo de elasticidade é uma propriedade intrínseca usada como

parâmetro mecânico diretamente relacionado a rigidez do polímero (ALMEIDA *et al.*, 2013). Os resultados mecânicos podem ser considerados um indicador importante da dimensão e estado bem organizado das nanofibras de celulose, além de estar relacionado ao seu alto grau de emaranhamento por ligação de hidrogênio intra e intermolecular (ABEER; MOHD AMIN; MARTIN, 2014; BARUD *et al.*, 2015). Desse modo, observou-se pelas micrografias (Figura 23) que as membranas com nanofibrilas mais densas apresentaram propriedades mecânicas mais elevadas.

Figura 24 – Ensaio de tração da CB obtida em meio MSH75+ antes (a) e após (b) a ruptura completa da membrana.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Em relação aos resultados obtidos dos meios à base de MS, as membranas do meio MSH75+ apresentaram, de um modo geral, melhores propriedades mecânicas. Dessa forma, observou que o substrato à base de MS foi utilizado de forma eficiente para a produção da CB, indicando o meio MSH75+ como uma fonte de carbono promissora para produção de CB.

5.7 Estimativa de custo do meio de fermentação em escala laboratorial

Uma estimativa de custo foi realizada para o meio de fermentação HS e MSH75+ (Tabela 12 e 13). O HS é um meio de composição definida desenvolvido para o crescimento de bactérias produtoras de CB, cujo os constituintes são de custo elevado. A participação de custo

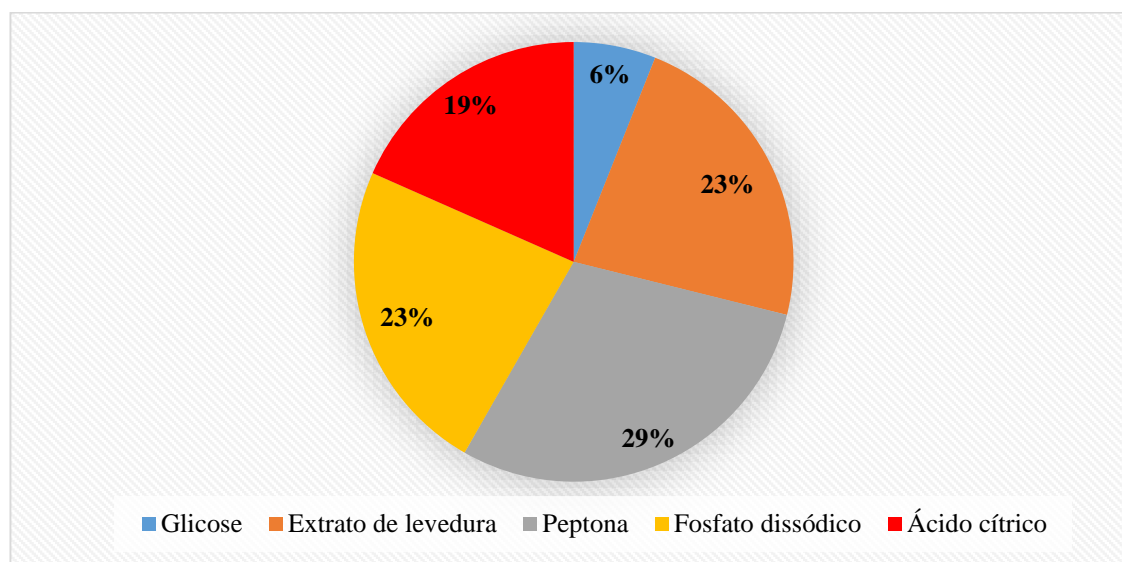
de cada componente do meio HS e MSH75+ pode ser observado na Figura 25 e 26. O meio MSH75+ foi promissor para produção de CB podendo ser alternativa ao uso do meio HS. Por ser constituído à base de MS, subproduto da agroindústria da soja relativamente barato, possibilitando redução de custo do processo de produção de CB. Entretanto, a etapa de hidrólise do melaço adiciona gastos com reagentes (ácido sulfúrico e hidróxido de sódio) e, principalmente, com energia, que podem elevar o custo do meio de fermentação (Tabela 13). Apesar dos gastos com a hidrólise do melaço, onde a energia foi um fator de custo significativo para o processo, a elaboração do meio MSH75+ foi mais econômica que a do meio HS, em escala laboratorial.

Tabela 12 - Estimativa de custo para obtenção de 1 litro de meio HS.

Descrição	Preço comercial (R\$)	Quantidade	Custo (R\$)
Glicose	36,00 (1 Kg)	20,0 g	0,72
Extrato de levedura	272,00 (500 g)	5,0 g	2,72
Peptona	350,00 (500 g)	5,0 g	3,50
Fosfato dissódico	1.033,00 (1 Kg)	2,7 g	2,78
Ácido cítrico	146,00 (100 g)	1,15 g	2,19
TOTAL (R\$) = 11,91			

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 25 - Participação de custo (%) dos diferentes componentes de meio HS.



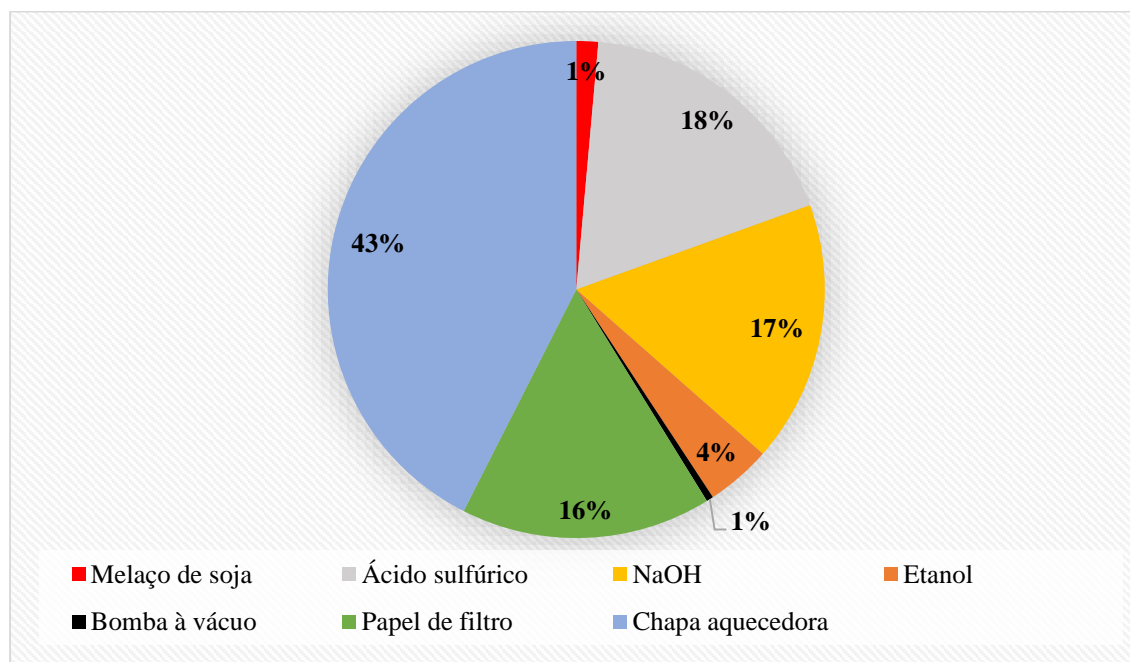
Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 13 - Estimativa de custo para obtenção de 1 litro de meio à base de melaço de soja hidrolisado e suplementado com etanol.

Descrição	Preço comercial (R\$)	Quantidade	Custo (R\$)	
Melaço de soja	500,00 (1 t)	75,0 g	0,04	
Ácido sulfúrico	192,00 (1L)	2,66 mL	0,51	
Hidróxido de sódio	140,00 (1Kg)	3,45 g	0,48	
Etanol	6,00 (1L)	20,0 mL	0,12	
Papel de filtro	46,00 (100 unid.)	1 unid.	0,46	
Hidrólise do melaço				
Equipamento	Potência (W)	Tempo de uso (h)	Consumo de energia (kWh)	Custo energia (R\$)
Chapa aquecedora	1500	1,0	1,5	1,2
Bomba à vácuo	80	0,2	0,016	< 0,02
TOTAL (R\$) = 2,82				

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 26 - Participação de custo (%) dos diferentes elementos no preparo do meio à base de melaço de soja hidrolisado e suplementado com etanol.



Fonte: Elaborada pelo autor.

O meio de fermentação à base de MS mostrou-se tecnicamente viável para produção de CB e apresentou bom prognóstico de viabilidade econômica, pois sua estimativa de custo, em escala laboratorial, foi 76% inferior ao meio de referência HS (Tabela 14). O uso de melaço

de cana hidrolisado como meio de fermentação para produção de CB também apresentou redução de custo de produção (57%) quando comparado ao meio HS (ÇAKAR *et al.*, 2014a). Considerando que o estudo foi realizado em escala de bancada o levantamento de preço dos componentes dos meios de fermentação também foi realizado nessa proporção. Desse modo, se for realizado uma estimativa de custo em escala industrial esses valores podem sofrer alterações, visto que, quando a aquisição dos componentes são em maiores quantidades há uma modificações nos preços.

Tabela 14 - Produção de CB em meio à base de melaço de soja e HS com custos do meio de produção.

Meio	CB (g/L)	Custo do meio de produção CB (R\$/Kg)
Melaço de soja hidrolisado suplementado com 2% etanol	7,05 ± 0,25	402,00
Meio de referência HS	7,15 ± 0,16	1.701,00

Fonte: Elaborada pelo autor.

6. CONCLUSÕES

A melhor condição de fermentação para produção de celulose em melaço de soja é obtida a partir de solução aquosa com 75 g/L de melaço de soja, hidrolisada com 5% (v/v) de ácido sulfúrico 1M, tratada termicamente a 90 °C/10min e suplementado com 2% de etanol. Assim, os resultados descritos neste trabalho, comparados com os resultados da literatura, demonstram o potencial do uso de melaço de soja hidrolisado e suplementado com etanol para produção de celulose bacteriana, pois o biopolímero obtido possui produção similar ao meio HS (7,0 g/L), demonstra características padrões de celulose bacteriana e, em escala laboratorial, apresenta redução de custo na sua elaboração (76%), tornando-o promissor para a produção de CB.

REFERÊNCIAS

- ABDUL KHALIL, H. P. S.; BHAT, A. H.; IREANA YUSRA, A. F. Green composites from sustainable cellulose nanofibrils: A review. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 87, n. 2, p. 963–979, jan. 2012.
- ABEER, M. M.; MOHD AMIN, M. C. I.; MARTIN, C. A review of bacterial cellulose based drug delivery systems: their biochemistry, current approaches and future prospects. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v. 66, n. 8, p. 1047–1061, aug. 2014.
- AGARWAL, U. P.; RALPH, S. A.; BAEZ, C.; REINER, R. S.; VERRILL, S. P. Effect of sample moisture content on XRD-estimated cellulose crystallinity index and crystallite size. **Cellulose**, Houten, v. 24, n. 5, p. 1971–1984, may. 2017.
- AGUILAR, R.; RAMÍREZ, J. A.; GARROTE, G.; VÁZQUEZ, M. Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse. **Journal of Food Engineering**, London, v. 55, p. 309–318, dec. 2002.
- AHN, S. J.; SHIN, Y. M.; KIM, S. E.; JEONG, S. I.; JEONG, J. O.; PARK, J. S.; GWON, H. J.; SEO, D. E.; NHO, Y. C.; KANG, S. S.; KIM, C. Y.; HUH, J. B.; LIM, Y. M. Characterization of hydroxyapatite-coated bacterial cellulose scaffold for bone tissue engineering. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, Seoul, v. 20, n. 5, p. 948–955, sept. 2015.
- ALMEIDA, L. R.; MARTINS, A. R.; FERNANDES, E. M.; OLIVEIRA, M. B.; CORRELO, V. M.; PASHKULEVA, I.; MARQUES, A. P.; RIBEIRO, A. S.; DURÃES, N. F.; SILVA, C. J.; BONIFÁCIO, G.; SOUSA, R. A.; OLIVEIRA, A. L.; REIS, R. L. New biotextiles for tissue engineering: development, characterization and in vitro cellular viability. **Acta Biomater**, Oxford, v. 9, n. 9, p. 8167–8181, sept. 2013.
- BAE, S.; SHODA, M. Bacterial cellulose production by fed- batch fermentation in molasses medium. **Biotechnology Progress**, Malden, v. 20, n. 5, p. 1366–1371, oct. 2004.
- BAE, S.; SHODA, M. Production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* BPR2001 using molasses medium in a jar fermentor. **Biotechnological Products and Process Engineering**, Berlin, v. 67, n. 1, p. 45–51, apr. 2005.
- BARNHART, D.M.; SU, S. C.; BACCARO, B. E.; BANTA, L. M.; FARRAND, S. K. CelR, an ortholog of the diguanylate cyclase PleD of *caulobacter*, regulates Cellulose synthesis in *Agrobacterium tumefaciens*. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 79, p. 7188–7202, dec. 2013.
- BARUD, H. G. O.; BARUD, H. S.; CAVICCHIOLI, M.; DO AMARAL, T. S.; JUNIOR, O. B. de O.; SANTOS, D. M.; PETERSEN, A. L. de O. A.; CELES, F.; BORGES, V. M.; DE OLIVEIRA, C. I.; DE OLIVEIRA, P. F.; FURTADO, R. A.; TAVARES, D. C.; RIBEIRO, S. J. L. Preparation and characterization of a bacterial cellulose/silk fibroin sponge scaffold for tissue regeneration. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 128, p. 41–51, sept. 2015.

BARUD, H. G. O.; SILVA, R. R. da; BARUD, H.S.; TERCJAK, A.; GUTIERREZ, J.; LUSTRI, W. R.; JUNIOR, O. B. de O.; RIBEIRO, S. J. A. Multipurpose natural and renewable polymer in medical applications: bacterial cellulose. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 153, p. 406–420, nov. 2016.

BARUD, H. S. **Materiais multifuncionais baseados em celulose bacteriana**. 2010. 172 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Presidente Prudente, 2010.

BARUD, H. S.; BARRIOS, C.; REGIANI, T.; MARQUES, R. F. C.; VERELST, M.; DEXPERT-GHYS, J.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L. Self-supported silver nanoparticles containing bacterial cellulose membranes. **Materials Science and Engineering: C**, Raleigh, v. 28, n. 4, p. 515-518, may. 2008.

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

BILGI, E.; BAYIRA, E.; SENDEMIR-URKMEZA, A.; HAMESC, E. E. Optimization of bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* using carob and haricot bean. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amsterdam, v. 90, p. 2–10, feb. 2016.

BITENCOURT, L.L. **Substituição de milho moído por milho reidratado e ensilado ou melaço de soja em vacas leiteiras**. 2012. Tese (Doutorado em Nutrição e Produção de Ruminantes) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

BRANDES, R.; CARMINATTI, C.; MIKOWSKI, A.; AL-QURESHI, H.; RECOUVREUX, D. A mini-review on the progress of spherical bacterial cellulose production. **Journal of Nano Research**, Zurique, v. 45, p. 142-154, jan. 2017.

BROWN, A. J. An acetic ferment which forms cellulose. **Journal of the Chemical Society**, London, v.49, p.432-439, 1886.

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

ÇAKAR, F.; KATI, A.; I.; DEMIRBAG, D. D.; SAHIN, F.; AYTEKIN, A. O. Newly developed medium and strategy for bacterial cellulose production. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v.92, p. 35-40, nov. 2014a.

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

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

CANEVAROLO, S. V. **Técnicas de caracterização de polímeros**. São Paulo: Artliber, 2003.

CANNON, R. E.; ANDERSON, S. M. Biogenesis of bacterial cellulose. **Critical reviews in microbiology**, London, v. 17, n. 6, p. 435-47, 1991.

CANUTO, A. P. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de goma xantana por fermentação no estado sólido a partir de resíduos e subprodutos agroindustriais**. 2009.105 f. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos)- Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

CARREIRA, P.; MENDES, J. A. S.; TROVATTI, E.; SERAFIM, L. S.; FREIRE, C. S. R.; SILVESTRE, A. J. D.; NETO, C. P. Utilization of residues from agro-forest industries in the production of high value bacterial cellulose. **Bioresource Technology, Barking**, v. 102, n. 15, p. 7354-7360, aug. 2011.

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

CHANG, C.; DUAN, B.; CAI, J.; ZHANG, L. Superabsorbent hydrogels based on cellulose for smart swelling and controllable delivery. **European Polymer Journal**, Oxford, v. 46, p. 92–100, jan. 2010.

CHANG, W. S.; CHEN, H. H. Physical properties of bacterial cellulose composites for wound dressings. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 53, p. 75–83, feb. 2016.

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

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

ÇOBAN, E.P.; BIYIK, H. Effect of various carbon and nitrogen sources on cellulose synthesis by *Acetobacter lovaniensis* HBB5. **African journal of biotechnology**, Nairobi, v. 10, n. 27, p. 5346–5354, 2011.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos - Safra 2017/2018**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/18_03_13_14_15_33_grao_marco_2018.pdf>. Acesso em: 13 mar. 2018.

COSTA, A. F. S.; ALMEIDA, F. C. G.; VINHAS, G. M.; SARUBBO, L. A. Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter hansenii* using corn steep liquor as nutrient sources. **Frontiers in microbiology**, Lausanne, v. 8, p. 2027, oct. 2017.

DENARI, G.B.; Cavaleiro, E. T. G.; **Princípios e Aplicações de Análise Térmica**. Instituto de química de São Carlos, UFSP, 2012.

DRYSDALE, G.S. FLEET, G.H. Acetic acid bacteria in winemaking: a review. **Proceedings. Annual open meeting - American Society of Enologists American journal of enology**, Davis, v. 39, p. 143-154, jan. 1988.

DUARTE, E. B.; CHAGAS, B. S.; ANDRADE, F. K.; BRÍGIDA, A. I. S.; BORGES, M. F.; MUNIZ, C. R.; FILHO, M. S. M. S.; MORAIS, J. P. S.; FEITOSA, J. P. A.; ROSA, M. F. Production of hydroxyapatite–bacterial cellulose nanocomposites from agroindustrial wastes. **Cellulose**, Houten, v. 22, n. 5, p. 3177-3187, oct. 2015.

EICHHORN, S. J.; DUFRESNE, A.; ARANGUREN, M.; MARCOVICH, N. E.; CAPADONA, J. R.; ROWAN, S. J.; WEDER, C.; THIELEMANS, W.; ROMAN, M.; RENNECKAR, S.; GINDL, W.; VEIGEL, S.; KECKES, J.; YANO, H.; ABE, K.; NOGI, M.; NAKAGAITO, A. N.; MANGALAM, A.; SIMONSEN, J.; BENIGHT, A. S.; BISMARCK, A.; BERGLUND, L. A.; PEIJS, T. Review: Current International Research into Cellulose Nanofibres and Nanocomposites. **Journal of Materials Science**, Norwell, v. 45, n. 1, p. 1, jan. 2010.

EL-SAIED, H.; EL-DIWANY, A. I.; BASTA, A. H.; ATWA, N. A.; EI-GHWAS, D. E. Production and characterization of economical bacterial cellulose. **BioResources**, Raleigh, v. 3, n. 4, p. 1196-1217, 2008.

ESPÍRITO SANTO, C. M.; PINHEIRO, I. C.; DE JESUS, G. F. A.; MOURIÑO, J. L. P.; VIEIRA, F. do N.; SEIFFERT, W. Q. Soybean molasses as an organic carbon source in the farming of *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) in a biofloc system. **Aquaculture Research**, San Diego, v. 48, n. 4, p. 1827–1835, apr. 2016.

FAN, X.; GAO, Y.; HE, W.; HU, H.; TIAN, M.; WANG, K.; PAN, S. Production of nano bacterial cellulose from beverage industrial waste of citrus peel and pomace using *Komagataeibacter xylinus*. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 151, p. 1068–1072, june 2016.

FANG, L.; CATCHMARK, J. M. Characterization of cellulose and other exopolysaccharides produced from *Gluconacetobacter* strains. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 115, p. 663–669, jan. 2015.

FARAG, S.; ASKER, M. M. S.; MAHMOUD, M. G.; IBRAHIM, H.; AMR, A. Comparative study for bacterial cellulose production using egyptian *Achromobacter* sp. **Research journal of pharmaceutical, biological and chemical sciences**, India, v. 7, n.6, p. 954-969, dec. 2016.

FERNANDES, G. R.; MIGUEL, D. P. Detecção dos açúcares da soja. **Cadernos de Pós-Graduação da FAZU**, v. 2, p.1-15, 2012. Disponível em: <<http://www.fazu.br/ojs/index.php/posfazu/article/view/406>>. Acesso em: 8 ago. 2017.

FIEDLER, S.; FUSSEL, M.; SATTTLER, K. Production and application of bacterial cellulose: I. A survey on state of research and investigations concerning fermentation kinetics. **Zentralblatt Fur Mikrobiologie**, Jena, v. 144, n. 7, p. 473-484, 1989.

FULLER, M. E.; ANDAYA, C.; MCCLAY, K. Evaluation of ATR-FTIR for analysis of bacterial cellulose impurities. **Journal of microbiological methods**, Amsterdam, v. 144, p. 145-151, nov. 2017.

GALLEGOS, A. M. A.; CARRERA, S. H.; PARRA, R.; KESHAVARZ, T.; IQBAL, H. M. Bacterial Cellulose: A sustainable source to develop value-added products—a review. **BioResources**, Raleigh, v. 11, n. 2, p. 5641–5655, 2016.

GARCIA, B.; LATASA, C.; SOLANO, C.; PORTILLO, F. G.; GAMAZO, C.; LASA, I. Role of the GGDEF protein family in *Salmonella* cellulose biosynthesis and biofilm formation. **Molecular microbiology**, Oxford, v. 54, n. 1, p. 264-267, oct. 2004.

GEA, S.; REYNOLDS, C. T.; ROOHPUR, N.; WIRJOSENTONO, B.; SOYKEABKAEW, N.; BILOTTI, E.; PEIJS, T. Investigation into the structural, morphological, mechanical and thermal behaviour of bacterial cellulose after a two- step purification process. **Bioresource Technology**, Barking, v. 102, n. 19, p. 9105-9110, oct. 2011.

GOMES, R. J. **Produção de celulose bacteriana e ácido acético, por bactérias do ácido acético – BAA isoladas de indústria vinagres, a partir de melaço de soja**. 2017. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

GUEDES, A. R. **Determinação e análise de propriedades termofísicas do melaço de soja**. 2015. 90 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

GULLO, M.; SOLA, A.; ZANICHELLI, G.; MONTORSI, M.; MESSORI, M.; GIUDICI, P. Increased production of bacterial cellulose as starting point for scaled-up applications. **Applied microbiology and biotechnology**, Berlin, v. 101, p. 8115–8127, sept. 2017.

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

GURGEL, L. V. A. **Hidrólise ácida de bagaço de cana-de-açúcar: estudo cinético de sacarificação de celulose para produção de etanol**. 2011. 315 f. Tese (Doutorado em Físico-Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

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

HAMELINCK, C. N.; VAN HOOIJDONK, G.; FAAIJ, A. P. C. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 28, p. 384-410, apr. 2005.

HARTMAN, G. L.; WEST, E. D.; HERMAN, T. K. Crops That Feed the World 2. Soybean—worldwide production, use, and constraints caused by pathogens and pests. **Food Security**, Dordrecht, v. 3, n. 1, p. 5–17, mar. 2011.

HASAN, N.; BIAK, D. R. A.; KAMARUDIN, S. Application of bacterial cellulose (BC) in natural facial scrub. **International Journal on Advanced Science, Engineering and Information Technology**, Indonesia, v. 2, n. 4, p. 272–275, 2012.

HASHEM, M.; DARWISH, S. M. I. Production of bioethanol and associated by-products from potato starch residue stream by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 34, n. 7, p. 953–959, july 2010.

HESTRIN, S.; SCHRAMM, M. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. Micromethod for the determination of celluloses. **Biochemical Journal**, London, v. 56, p. 163-166, 1954.

HOECK, J. A.; FEHR, W. R.; MUHRPHY, P. A.; WELKE, G. A. Influence of genotype and environment on isoflavone contents of soybean. **Crop Science**, Madison, v. 40, p. 48-51, 2000.

HU, W. L.; CHEN, S. Y.; YANG, J. X.; LI, Z.; WANG, H. P. Functionalized bacterial cellulose derivatives and nanocomposites. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 101, p. 1043–1060, jan. 2014.

HU, W.; CHEN, S.; YANG, Z.; LIU, L.; WANG, H. Flexible electrically conductive nanocomposite membrane based on bacterial cellulose and polyaniline. **The Journal of Physical Chemistry B**, Washington, v. 115, n. 26, p. 8453–8457, june 2011.

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

HUANG, C.; GUO, H.; XIONG, L.; WANG B.; SHI, S.; CHEN, X.; LIN, X.; WANG, C.; LUO, J.; CHEN, X. Using wastewater after lipid fermentation as substrate for bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus*. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 136, p. 198–202, jan. 2016.

HUANG, C.; YANG, X.; XIONG, L.; GUO, H.; LUO, J.; WANG, B.; ZHANG, H.; LIN, X.; CHEN, X. Utilization of corn cob acid hydrolysate for bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus*. **Applied biochemistry and biotechnology**, Clifton, v. 175, p. 1678–1688, feb. 2015.

IAL. Instituto Adolf Lutz. Normas Analíticas: métodos químicos e físicos para a análise de alimentos. São Paulo, 4 ed.: **Instituto Adolfo Lutz**, 2008.

IQBAL, H. M. N.; KYAZZE, G.; TRON, T.; KESHAVARZ, T. Laccase-assisted grafting of poly(3-hydroxybutyrate) onto the bacterial cellulose as backbone polymer: development and characterisation. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 113, p. 131–137, nov. 2014.

JAHAN, F.; KUMARA V.; SAXENA, R.K. Distillery effluent as a potential medium for bacterial cellulose production: A biopolymer of great commercial importance. **Bioresource Technology**, Barking, v. 250, p. 922–926, jan. 2018.

JOZALA, A. F.; PÉRTILE, R. A.; SANTOS, C. A.; CARVALHO SANTOS-EBINUMA, V.; SECKLER, M. M.; GAMA, F. M.; PESSOA, A. JR. Bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* by employing alternative culture media. **Applied microbiology and biotechnology**, Berlin, v. 99, n. 3, p. 1181-1190, feb. 2015.

JUNG, H. I.; LEE, O. M.; JEONG, J. H.; JEON, Y. D.; PARK, K. H.; KIM, H. S.; AN W.G.; SON, H. J. Production and characterization of cellulose by *Acetobacter* sp. V6 using a cost-effective molasses–corn steep liquor medium. **Applied biochemistry and biotechnology**, Clifton, v. 162, n. 2, p. 486-497, sept. 2010.

KARP S. G.; WOICIECHOWSKI A. L.; LETTI L. A. J.; SOCCOL, C. R. Bioethanol from Soybean Molasses. In: Soccol C., Brar S., Faulds C., Ramos L. (eds) Green Fuels Technology. **Green Energy and Technology**. Cham: Springer, 2016, p. 241-254.

KARP, S. G.; IGASHIYAMA, A. H.; SIQUEIRA, P. F.; CARVALHO, J. C.; VANDENBERGHE, L. P. S.; THOMAZ-SOCCOL, V.; CORAL, J.; THOLOZAN, J.-L.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Application of the biorefinery concept to produce l-lactic acid from the soybean vinasse at laboratory and pilot scale. **Bioresource Technology**, Barking, v. 102, n. 2, p. 1765–1772, jan. 2011.

KESHK, S. M. A. S. Bacterial cellulose production and its industrial applications. **Journal of Bioprocessing and Biotechniques**, Sunnyvale, v. 4, n. 2, feb. 2014.

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

KHATTAK, W. A.; KHAN, T.; UL-ISLAM, M.; WAHID, F.; PARK, J. K. Production, characterization and physico-mechanical properties of bacterial cellulose from industrial wastes. **Journal of polymers and the environment**, New York, v. 23, p. 45–53, mar. 2015.

KIZILTAS, E. E.; KIZILTASA, A.; GARDNER, D. J. Synthesis of bacterial cellulose using hot water extracted wood sugars. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 124, p. 131–138, june 2015.

KIM, S.Y.; KIM, J.N.; WEE, Y.J.; PARK, D.H.; RYU, H.W. Production of bacterial cellulose by *Gluconacetobacter* sp. RKY5 isolated from persimmon vinegar. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 131, p. 705–715, mar. 2006.

KIM, Y. J.; KIM, J. N.; WEE, Y. J.; PARK, D. H.; RYU, H. W. Bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter* sp. PKY5 in a rotary biofilm contactor. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 137–140, n. 1–12, p. 529–537, apr. 2007.

KONGRUANG, S. Bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* strains from agricultural waste products. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 148, n. 1–3, p. 245–256, mar. 2008.

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

KUMBHAR, J. V.; RAJWADE, J. M.; PAKNIKAR, K. M. Fruit peels support higher yield and superior quality bacterial cellulose production. **Biotechnological Products and Process Engineering**, Berlin, v. 99, p. 6677–6691, may. 2015.

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**, Weinheim, v. 14, n. 1, p. 10–32, jan. 2014.

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

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

LI, Z.; WANG, L.; HUA, J.; JIA, S.; ZHANG, J.; LIU, H. Production of nano bacterial cellulose from waste water of candied jujube-processing industry using *Acetobacter xylinum*. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 120, p. 115–119, apr. 2015.

LIMA, H. L. S.; NASCIMENTO, E. S.; ANDRADE, F. K.; BRÍGIDA, A. I. S.; BORGES, M. F.; CASSALES, A. R.; MUNIZ, C. R.; SOUZA FILHO, M. S. M.; MORAIS, J. P. S.; ROSA, M. F. Bacterial Cellulose Production by *Komagataeibacter hansenii* ATCC 23769 Using Sisal Juice - An Agroindustry Waste. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, São Paulo, v. 34, n. 3, p. 671–680, sept. 2017.

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

LIN, N.; DUFRESNE, A. Nanocellulose in biomedicine: Current status and future prospect. **European Polymer Journal**, Oxford, v. 59, p. 302–325, oct. 2014.

LIN, W. C.; LIEN, C. C.; YEH, H. J.; YU, C. M.; HSU, S.H. Bacterial cellulose and bacterialcellulose-chitosan membranes for wound dressing applications. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 94, p. 603–611, apr. 2013.

LOKURUKA, M. N. I. Effects of processing on soybean nutrients and potential impact on consumer health: An overview. **African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development**, Nairobi, v.11, n.4, p. 1-18, 2011.

LUJÁN-RHENALS, D. E.; MORAWICKI, R. O.; GBUR, E. E.; RICKE, S. C. Fermentation of soybean meal hydrolyzates with *Saccharomyces cerevisiae* and *Zymomonas mobilis* for ethanol production. **Journal of Food Science**, Malden, v. 80, n. 7, p. 1512–1518, july 2015.

MACHADO, R. P. **Produção de etanol a partir de melaço de soja**. 1999. 137 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Setor de Ciências e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 1999.

MANTOVANI, D. **Estudo da Recuperação e Hidrólise de Isoflavonas e Carboidratos obtidos a partir do Melaço de Soja**. 2013. 143 f. Tese (Doutorado em MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Soja - MAPA**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/soja>>. Acesso em: 26 nov. 2017.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Soja - MAPA**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/soja>>. Acesso em: 26 nov. 2017.

MILLER G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426, 1959.

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

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

MOHAMMADKAZEMI, F.; DOOSTHOSEINI, K.; AZIN, M. Effect of ethanol and medium on bacterial cellulose (BC) production by *Gluconacetobacter xylinus* (PTCC 1734). **Cellulose chemistry and technology**, Bucharest, v. 49, n.5, p. 455-462, july 2015.

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

MOHITE, B. V.; SALUNKE, B. K.; PATIL, S. V. enhanced production of bacterial cellulose by using *Gluconacetobacter hansenii* NCIM 2529 strain under shaking conditions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 169, n. 5, p. 1497-1511, mar. 2013.

MOHITE, B.V.; KAMALJA, K.K.; PATIL, S.V. Statistical optimization of culture conditions for enhanced bacterial cellulose production by *Gluconoacetobacter hansenii* NCIM 2529. **Cellulose**, Houten, v. 19, p. 1655–1666, oct. 2012.

MOON, R.; MARTINI, A.; NAIRN, J.; SIMONSEN, J.; YOUNGBLOOD, J. Cellulose Nanomaterials Review: Structure, Properties and Nanocomposites. **Chemical Society Reviews**, London, v. 40, n. 7, p. 3941–3994, may. 2011.

MORAIS JÚNIOR, W. G.; KAMIMURA, E. S.; RIBEIRO, E. J.; PESSELA, B. C.; CARDOSO, V. L.; DE RESENDE, M. M. Optimization of the production and characterization of lipase from *Candida rugosa* and *Geotrichum candidum* in soybean molasses by submerged fermentation. **Protein Expression and Purification**, San Diego, v. 123, p. 26–34, july 2016.

MOVASAGHI, Z.; REHMAN, S.; REHMAN, I. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. **Applied Spectroscopy Reviews**, Abingdon, v. 43, n. 2, p. 134–179, feb. 2008.

NARITOMI, T.; KOUUDA, T.; YANO, H.; YOSHINAGA, F. Effect of lactate on bacterial cellulose production from fructose in continuous culture. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v. 85, n. 89–95, 1998.

NASCIMENTO, E. S. D.; LIMA, H. L. S.; BARROSO, M. K. D. A.; BRÍGIDA, A. I. S.; ANDRADE, F. K.; BORGES, M. D. F.; MORAIS, J. P. S.; MUNIZ, C. R.; ROSA, M. D. F. Mesquite (*Prosopis juliflora* (Sw.)) extract is an alternative nutrient source for bacterial cellulose production. **Journal of Biobased Materials and Bioenergy**, Califórnia, v. 10, n. 1, p. 63–70, feb. 2016.

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

NISHINARI, K.; FANG, Y.; GUO, S.; PHILLIPS, G. O. Soy proteins: A review on composition, aggregation and emulsification. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 39, p. 301–318, aug. 2014.

NUMATA, Y.; MAZZARINO, L.; BORSALI, R. A slow-release system of bacterial cellulose gel and nanoparticles for hydrophobic active ingredients. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 486, n. 1–2, p. 217–225, mar. 2015.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F.; OTHERS. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química nova**, São Paulo, v. 33, n. 7, p. 1549–1558, 2010.

OLSSON, L.; JORGENSEN, H.; KROGH, K. B. R.; ROCA, C. Bioethanol production from lignocellulosic material. In: Dumitriu, S., (Ed.). **Polysaccharides: Strutral Diversity and Functional Versatility**, USA: CRC Press, 2005, p. 957- 993.

PACHECO, G.; NOGUEIRA, C. R.; MENEGUIN, A. B.; TROVATTI, E.; SILVA, M. C. C.; MACHADO, R. T. A.; RIBEIRO, S. J. L.; FILHO, E. C. S.; Barud, H. S. Development and characterization of bacterial cellulose produced by cashew tree residues as alternative carbon source. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 107, p. 13-19, nov. 2017.

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

PECORARO, É.; MANZANI, D.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L. Bacterial Cellulose from *Glucanacetobacter xylinus*: Preparation, Properties and Applications. In: BELGACEM, M. N.; GANDINI, A. **Monomers, Polymers and Comp. from Renewable Resources**. Amsterdam: Elsevier, 2008, p. 369–383.

PHISALAPHONG, M.; CHIAOPRAKOBKIJ, N. Applications and Products-Nata de Coco. In: GAMA, M.; GATENHOLM, P.; KLEMM, D. (Eds.). **Bacterial nanocellulose: a sophisticated multifunctional material**. Florida: CRC Press, 2012. p.143 -156.

PINEDA, L. D. C.; MESA, L. A. C.; RIASCOS, C. A. M. Técnicas de fermentación y aplicaciones de la celulosa bacteriana: una revisión. **Ingeniería y Ciencia**, Medellín, v. 8, n. 16, p. 307-335, 2012.

QIU, Y.; QIU, L.; CUI, J.; WEI, Q. Bacterial cellulose and bacterial cellulose-vaccarin membranes for wound healing. **Materials Science and Engineering C: Materials for Biological Applications**, Amsterdam, v. 59, p. 303–309, feb. 2016.

QUAN, Z. X.; JIN, Y. S.; YIN, C. R.; LEE, J. J.; LEE, S. T. Hydrolyzed molasses as an external carbon source in biological nitrogen removal. **Bioresource Technology**, Barking, v. 96, n. 15, p. 1690-1695, oct. 2005.

RAGHUNATHAN, D. Production of microbial cellulose from the new bacterial strain isolated from temple wash waters. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, Kancheepuram, v. 2, n. 12, p. 275-290, 2013.

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

RAMANA, K.V.; TOMAR, A.; SINGH, L. Effect of various carbon and nitrogen sources on cellulose synthesis by *Acetobacter xylinum*. **World journal of microbiology & biotechnology**, Oxford, v.16, p. 245–248, feb. 2000.

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

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. **Química de alimentos**. 2 ed. São Paulo: Editora Edgard Blucher, 2007. p. 184.

RIVAS, B.; MOLDES, A. B.; DOMINGUEZ, J. M.; PARAJO, J. C. Development of culture media containing spent yeast cells of *Debaryomyces hansenii* and corn steep liquor for lactic acid production with *Lactobacillus rhamnosus*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 97, n. 1, p. 93-98, dec. 2004.

ROBLEDO, M.; RIVERA, L.; JIMENEZ-ZURDO, J. I.; RIVAS, R.; DAZZO, F.; VELAZQUEZ, E.; MARTINEZ-MOLINA, E.; HIRSCH, A. M.; MATEOS, P. F. Role of *Rhizobium endoglucanase* CelC2 in cellulose biosynthesis and biofilm formation on plant roots and abiotic surfaces. **Microbial cell factories**, London, v. 11, p. 125, sept. 2012.

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

ROSS, P.; MAYER, R.; BENZIMAN, M. Cellulose biosynthesis and function in bacteria. **Microbiological Reviews**, Washington, 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**, Oxford, v. 89, n. 2, p. 613-622, june 2012.

SALVI, D. T. B.; BARUD, H. S.; TREU-FILHO, O.; PAWLICKA, A.; MATTOS, R. I.; RAPHAEL, E.; RIBEIRO, S. J. L. Preparation, thermal characterization, and DFT study of the bacterial cellulose. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, Dordrecht, v. 118, n. 1, p. 205-215, oct. 2014.

SANADA, C. T. N.; KARP, S. G.; SPIER, M. R.; PORTELLA, A. C.; GOUVÊA, P. M.; YAMAGUISHI, C. T.; VANDENBERGHE, L. P. S.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Utilization of soybean vinasse for α -galactosidase production. **Food Research International**, Ottawa, v. 42, n. 4, p. 476–483, may. 2009.

SANTOS, S. M.; CARBAJO, J. M.; VILLAR, J. C. The effect of carbon and nitrogen sources on bacterial cellulose production and properties from *Gluconacetobacter sucrofermentans* CECT 7291 focused on its use in degraded paper restoration. **Bioresources**, Raleigh, v. 8, n. 3, p. 3630–3645, 2013.

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

SHAH, N.; UL-ISLAM, M.; KHATTAK, W. A.; PARK, J. K. Overview of bacterial cellulose composites: A multipurpose advanced material. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 98, n. 2, p. 1585-1598, nov. 2013.

SHEN, T.; GNANAKARAN, S. The stability of cellulose: a statistical perspective from a coarse-grained model of hydrogen-bond networks. **Biophysical Journal**, Cairo, v. 96, n. 8, p. 3032–3040, apr. 2009.

SHEZAD, O.; KHAN, S.; KHAN, T.; PARK, J. K. Physicochemical and mechanical characterization of bacterial cellulose produced with an excellent productivity in static conditions using a simple fed-batch cultivation strategy. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 82, n. 1, p. 173–180, aug. 2010.

- SHI, Z.; ZANG, S.; JIANG, F.; HUANG, L.; LU, D.; MA, Y.; YANG, G. In situ nano-assembly of bacterial cellulose– polyaniline composites. **RSC Advances**, Cambridge, v. 2, n. 3, p. 1040–1046, 2012.
- SHI, Z.; ZHANG, Y.; PHILLIPS, G. O.; YANG, G. Utilization of bacterial cellulose in food. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 35, p. 539-545, mar. 2014.
- SHIGEMATSU, T.; TAKAMINE, K.; KITAZATO, M.; MORITA, T.; NARITOMI, T.; MORIMURA, S.; KIDA, K. Cellulose production from glucose using a glucose dehydrogenase gene (gdh)-deficient mutante of *Gluconacetobacter xylinus* and its use for bioconversion of sweet potato pulp. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 99, n. 4, p. 415–422, apr. 2005.
- SHODA, M; SUGANO, Y. Recent advances in bacterial cellulose production. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, Seoul, v. 10, n. 1, p. 1-8, 2005.
- SILVA, F. B.; ROMÃO, B. B.; CARDOSO, V. L.; FILHO, U. C.; RIBEIRO, E. J. Production of ethanol from enzymatically hydrolyzed soybean molasses. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 69, p. 61–68, dec. 2012.
- SINGHSA, P.; NARAIN, R.; MANUSPIYA, H. Physical structure variations of bacterial cellulose produced by different *Komagataeibacter xylinus* strains and carbon sources in static and agitated conditions. **Cellulose**, Houten, v. 25, p. 1571–1581, feb. 2018.
- SIQUEIRA, P. F.; KARP, S. G.; CARVALHO, J. C.; STURM, W.; RODRÍGUEZ-LEÓN, J. A.; THOLOZAN, J.-L.; SINGHANIA, R. R.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Production of bio-ethanol from soybean molasses by *Saccharomyces cerevisiae* at laboratory, pilot and industrial scales. **Bioresource Technology**, Barking, v. 99, n. 17, p. 8156–8163, nov. 2008.
- SON, H. J.; HEO, M. S.; KIM, Y. G.; LEE, S. J. Optimization of fermentation conditions for the production of bacterial celulose by a newly isolated *Acetobacter* sp. A9 in shaking cultures. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, San Diego, v. 33, p. 1–5, feb. 2001.
- SON, H. J.; KIM, H. G.; KIM, K. K.; KIM, H. S.; KIM, Y. G.; LEE, S. J. Increased production of bacterial cellulose by *Acetobacter* sp. V6 in synthetic media under shaking culture conditions. **Bioresource Technology**, Barking, v. 86, n.3, p. 215–219, feb. 2003.
- SUN, Y.; LIN, L.; PANG, C.; DENG, H.; PENG, H.; LI, J.; HE, B.; LIU, S. Hydrolysis of Cotton Fiber Cellulose in Formic Acid. **Energy & Fuels**, Washington, v. 21, n. 4, p.2386-2389, june 2007.
- TABUCHI, M. Nanobiotech versus Synthetic Nanotech. **Nature Biotechnology**, New York, v. 25, n. 4, p. 389–390, apr. 2007.
- TASIĆ, M. M.; KONSTANTINOVIĆ, B. V.; LAZIĆ, M. L.; VELJKOVIĆ, V. B. The acid hydrolysis of potato tuber mash in bioethanol production. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 43, n. 2, p. 208–211, feb. 2009.

TYAGI, N.; SURESH, S. Production of cellulose from sugarcane molasses using *Gluconacetobacter intermedius* SNT-1: optimization & characterization. **Journal of Cleaner Production**, Oxford, v. 112, p. 71–80, jan. 2016.

TSOUKO, E.; KOURMENTZA, C.; LADAKIS, D.; KOPSAHELIS, N.; MANDALA, I.; PAPANIKOLAOU, S.; PALOUKIS, F.; ALVES, V.; KOUTINAS, A. Bacterial cellulose production from industrial waste and by-product streams. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 16, p. 14832–14849, july 2015.

UDE, S.; ARNOLD, D. L.; MOON, C. D.; TIMMS-WILSON, T.; SPIERS, A. J. Biofilm formation and cellulose expression among diverse environmental *Pseudomonas* isolates. **Environmental microbiology**, Oxford, v. 8, n. 11, p. 1997–2011, nov. 2006.

UL-ISLAM, M.; SHAH, N.; HA, J. H.; PARK, J. K. Effect of chitosan penetration on physico-chemical and mechanical properties of bacterial cellulose. **The Korean journal of chemical engineering**, Seoul, v. 28, p. 1736–1743, 2011.

UZYU, H. K.; SAÇAN, M. T. Bacterial cellulose production by *Komagataeibacter hansenii* using algae-based glucose. **Environmental science and pollution research international**, Landsberg, v. 24, n. 12, p. 11154–11162, apr. 2017.

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**, New York, v. 21, n. 2, p. 545–554, june 2013.

VIEILLE, B.; AUCHER, J.; TALEB, L. Comparative study on the behavior of woven-ply reinforced thermoplastic or thermosetting laminates under severe environmental conditions. **Materials & Design**, Reigate, v. 35, p. 707–719, mar. 2012.

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

WU, J. M.; LIU, R. H. Thin stillage supplementation greatly enhances bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus*. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 90, n. 1, p. 116–121, sept. 2012.

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

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

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

YANG, Y.; JIA, J. J.; XING, J. R.; CHEN, J. B.; LU, S. M. Isolation and characteristics analysis of a novel high bacterial cellulose producing strain *Gluconacetobacter intermedius* CIs26. **Carbohydrate polymers**, Oxford, v. 92, n. 2, p. 2012–2017, feb. 2013a.

YEMM, E.W.; WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochemical Journal*, Colchester. v. 57, p.508-514, 1954.

YUNOKI, S.; OSADA, Y.; KONO, H.; TAKAI, M. Role of ethanol in improvement of bacterial cellulose production: analysis using ¹³C-labeled carbon sources. **Food Science and Technology Research**, Tsukuba, v. 10, n. 3, p. 307–313, aug. 2004.

ZHOU, C.; WU, Q. Recent development in applications of cellulose nanocrystals for advanced polymer-based nanocomposites by novel fabrication strategies. In: **Nanocrystals—Synthesis, Characterization and Applications**, Intech: Rijeka, 2012.

ZHU, H.; JIA, S.; YANG, H.; TANG, W.; JIA, Y.; TAN, Z. Characterization of bacteriostatic sausage casing: a composite of bacterial cellulose embedded with ϵ -polylysine. **Food Science and Biotechnology**, Seoul, v. 19, n. 6, p. 1479–1484, dec. 2010.