

Modificações de meio de cultivo para produção de biofilmes de nanocelulose bacteriana opticamente transparentes

Modifications of culture medium for the production of optically transparent bacterial nanocellulose biofilms

RESUMO

João Pedro Maximino Gongora Godoi
jgodoi@alunos.utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Brasil

Samara Silva Souza
samarasouza@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Brasil

Gabriela Sperotto
gsperotto@alunos.utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Brasil

Larissa Gabrieli Stasiak
larissastasiak@alunos.utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Brasil

Naiana Cristine Gabiatti
naianagabiatti@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, Brasil

A nanocelulose bacteriana (NCB) é um biomaterial com vasto potencial de modificações e incorporações a sua matriz, com o propósito de produzir novos materiais com propriedades diferenciadas. Este estudo avaliou a capacidade da bactéria *Komagataeibacter xylinus* (ATCC® 53524™) de sintetizar NCB sob restrições de nutrientes em um meio definido mínimo. A reativação da cepa bacteriana foi realizada utilizando o meio complexo Hestrin-Schramm. Após sete dias de incubação foi constatado contaminação de fungos filamentosos através de análise macroscópica da placa de manutenção e de contaminação por leveduras na alíquota do meio de reativação. A metodologia e procedimentos foram reavaliados para garantir total assepsia, sendo possível a obtenção de biofilmes de NCB, confirmado através da morfologia bacteriana. Em seguida, foram realizados testes de biossíntese através da inoculação da bactéria em meio mínimo, entretanto, durante o período de crescimento não foi observado a presença de NCB, indicando uma contaminação. Com a suspensão das atividades de pesquisa, não foi possível concluir que as modificações foram eficientes na produção de biofilmes, além da caracterização dos materiais. Novos testes serão realizados futuramente, entretanto, o presente estudo contribuiu para as atividades propostas de propagação, estoque, reativação da cepa e preparo de reagentes.

PALAVRAS-CHAVE: Nanocelulose bacteriana. Meio de cultura. Meio mínimo.

ABSTRACT

Bacterial nanocellulose (BNC) is a biomaterial with a wide potential of modifications and incorporations to its matrix, aiming to produce new materials with distinctive properties. This study evaluated the *Komagataeibacter xylinus* (ATCC® 53524™) bacteria's capacity to synthesize BNC under nutrients' restrictions in a minimum defined medium. The bacterial strain reactivation was carried out using the Hestrin-Schramm complex medium. After seven days of incubation, contamination by filamentous fungi was detected, through a macroscopic analysis of the maintenance plate and contamination by yeasts in the aliquot of the reactivation medium. The methodology and procedures were reevaluated to guarantee total asepsis, which allowed to obtain BNC biofilms, confirmed by bacterial morphology. Then, biosynthesis tests were conducted through the bacteria inoculation in a

Recebido: 04/09/2020

Aprovado: 25/09/2020

Direito autoral: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



minimum medium, however, during the growth period, the presence of BNC was not observed, which indicates contamination. As the research activities were suspended due to COVID-19, it was not possible to conclude that the modifications were efficient to produce biofilms besides the materials' characterization. New tests will be performed in the future, but, so far, this study has contributed to the proposed activities of propagation, stock, strain reactivation, and reagent preparation.

KEYWORDS: Bacterial nanocellulose. Culture medium. Minimal medium.

INTRODUÇÃO

A nanocelulose bacteriana (NCB) ao longo dos últimos anos vem se destacando como importante biomaterial no ramo de engenharia de tecidos (METCALF; FERGUSSON, 2006). Tamanha notoriedade se deve a propriedades únicas como elevada resistência mecânica, biocompatibilidade, capacidade de absorção de água e possibilidade de ser moldada em estruturas tridimensionais durante sua síntese (GAMA; GATENHOLM; KLEM, 2012; LEE et al., 2014; SHAH et al., 2013; Shi et al., 2014). Tais características expande as possibilidades de aplicações tecnológicas como implantes corporais (Niaounakis, 2015), substituto de pele (Fu et. Al, 2013), tubos vasculares (HONG et al., 2015) e a fabricação de biosensores eletroquímicos para imobilização da bacteriófagos (Farooq et. al, 2020).

Para a biossíntese de NCB são utilizadas bactérias do gênero *Komagataeibacter*, sendo a mais estudada a *Komagataeibacter xylinus* pela sua alta capacidade de produzir níveis relativamente altos do biopolímero a partir de uma ampla variedade de substratos (Yamada et al., 2012 a,b). Vários autores pesquisaram esta capacidade de fermentar diferentes substratos para obtenção de celulose, o primeiro meio de cultivo complexo foi desenvolvido por Hestrin e Scharamm ao qual utilizam glicose como fonte de carbono e outros nutrientes como extrato de levedura e peptona (Hestrin; Scharamm, 1954), entretanto, o custo final de um meio de cultura corresponde a cerca de 30% dos custos totais de obtenção de produtos de origem biotecnológica (JOZALA et al., 2016).

Visando eliminar o fator de alto custo dos meios de cultura, surgiram inúmeros trabalhos levando em consideração o desenvolvimento de meios de cultura de baixo custo, tendo enfoque principal fontes alternativas de carbono e nitrogênio através de resíduos agroindustriais (CAVKA et al., 2013; KUO; LIN; LEE, 2010; HYUN; MAHANTY; KIM, 2014), da indústria alimentícia como casca de arroz (GOELZER et al., 2009), palha de trigo (HONG et al., 2011), bagaço de frutas (KUMBAR; RAJWADE; PAKNIKAR, 2015; VAZQUEZ; FORESTI; CERRUTTI, 2013) e soro de leite (CARREIRA et al., 2011), porém todos estes meios ainda possuem componentes complexos em sua composição, não permitindo uma quantificação exata e consequentemente uma pior reprodutibilidade. Além disto, o uso de componentes alternativos no meio de cultura pode influenciar nas propriedades finais da NCB (KONGRUANG, 2008; CASTRO et al., 2011; DAHMAN; JAYASURIA; KALIS, 2010). Por outro lado, os meios quimicamente definidos contém a composição exata de cada componente.

Seguindo esta tendência, meio mínimo é um meio quimicamente definido que contém a quantidade adequada de nutrientes necessária para o crescimento de bactérias (MACHADO et al., 2019; LETORT; JUILLARD, 2001). A grande maioria dos estudos sobre o meio mínimo são usados para experimentos *in silico*, identificando as capacidades metabólicas, demanda de nutrientes e geração de metabólitos extracelulares (PHAN-THANH; GORMON, 1997; WEGKAMP et al., 2010; AZATIAN; KAUR; LATHAN, 2019).

Recentemente o primeiro meio mínimo definido para produção de NCB foi avaliado a partir da bactéria *Komagataeibacter hansenii* (ATCC® 23769™). O estudo avaliou diferentes fontes de carbono e nitrogênio em cultura estática e definiu as melhores condições e concentrações capaz de produzir biofilmes de nanocelulose. Em consequência da modulação do meio de cultura, a NCB sintetizada apresentou uma elevada transparência quando comparada aos meios complexos (SOUZA; BERTI; OLIVEIRA, 2019).

Biofilmes transparentes de nanocelulose se destacam em aplicações de engenharia de tecidos pois sua microestrutura fornece uma matriz organizada que permite o crescimento celular (KHODA; KOC, 2013; ZHU; MARCHANT, 2011). Além disso, biofilmes transparentes podem ser uma melhor plataforma para processos de cicatrização de feridas que podem ser facilmente monitoradas sem a remoção do curativo (NOGI; YANO, 2008; SAITO et al., 2003).

Os biomateriais opticamente transparentes são essenciais para diversas aplicações tecnológicas e projetam novos desafios em seu desenvolvimento por projetos inovadores de produção (CHEN et al., 2012; FERNANDES et al., 2009; OKAHISA et al., 2009). Neste contexto, este projeto tem como objetivo explorar as modificações de meio de cultura, principalmente no que se refere ao uso de um meio mínimo definido, para produzir biofilmes de NCB opticamente transparentes a partir da bactéria *Komagataeibacter xylinus* (ATCC® 53524™) em culturas estáticas.

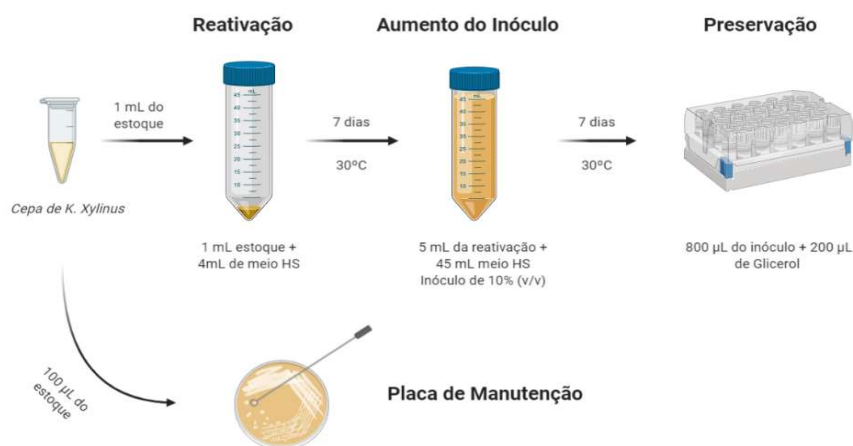
MATERIAIS E MÉTODOS

A bactéria utilizada para a síntese de nanocelulose bacteriana (NCB) foi *Komagataeibacter xylinus* (ATCC® 53524™). Para reativação, cultivo, preservação foi elaborado o meio de cultura Hestrin & Schramm (HS) constituído por 20 g/L de glicose ($C_6H_{12}O_6$), 5 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de peptona bacteriológica, 2,7 g/L de fosfato dissódico (Na_2HPO_4) e 1,15 g/L de ácido cítrico.

Em alternativa ao tradicional meio de cultura HS foi desenvolvido o meio de cultura mínimo de acordo com a metodologia adotada por Samara e colaboradores (2019) ao qual foram preparadas soluções estoques separadamente de cloreto de cálcio ($CaCl_2$) 0,1 M, sulfato de magnésio ($MgSO_4$) 1 M, cloreto de amônio (NH_4Cl) 0,5 M e glicose ($C_6H_{12}O_6$) 1 M. Para a suplementação mínima de sais foram utilizados os padrões M9 de sais mínimos proposto por Miller (1979), desta forma foi elaborada uma solução estoque de sais 10x 4% (v/v) contendo 58 g de fosfato dissódico (Na_2HPO_4), 30 g de fosfato monopotássico (KH_2PO_4) e 5 g de cloreto de sódio ($NaCl$) em um litro. O meio de cultivo mínimo foi preparado através da adição de alíquotas das soluções estoques produzidos anteriormente, seguindo a adição de 40 mL solução de sais, 800 µL de sulfato de magnésio, 400 µL cloreto de cálcio, 25 mL de glicose, 20 mL de cloreto de amônio e completado em um litro de solução. O pH de ambos os meios foram ajustados para 6,5 e em seguida esterilizados em autoclave a 121°C por 20 minutos.

Para a reativação da cepa bacteriana, descongelou-se uma alíquota estoque de 1 mL (Figura 1), ao qual 100 µL foram inoculados em meio HS sólido, denominando-a como placa de manutenção, logo o restante da alíquota foi realocado em tubo de cultura contendo 4 mL de meio HS. Após homogeneização, o tubo foi alocado em uma incubadora B.O.D a 30°C e cultivado em condições estáticas por 7 dias. Em seguida ao período de incubação, o biofilme sintetizado foi retirada e efetuado o aumento do inóculo adicionando 45 mL de meio HS e cultivado por mais 7 dias a 30°C, logo após preservadas em glicerol a -20°C. Através da placa de manutenção foram selecionadas 5 colônias da bactéria *K. xylinus* em 1 mL de meio HS e inoculado 100 µL em uma placa denominada placa de trabalho.

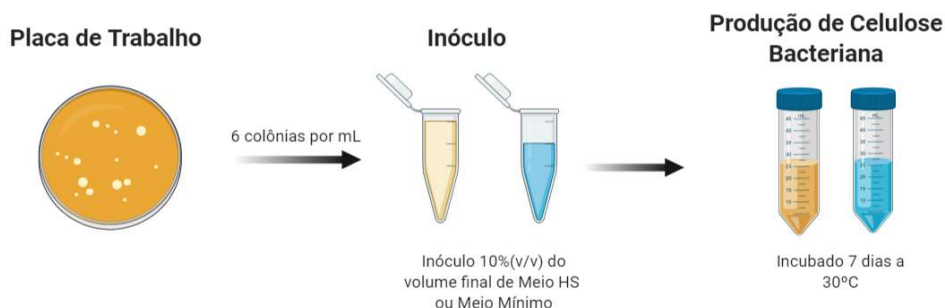
Figura 1. Esquema da reativação e preservação da cepa de *K. xylinus*



Fonte: Autoria própria (2020).

Para a biossíntese da NCB preparou-se o meio de cultura (HS e Mínimo) contendo 10% (v/v) do inóculo partindo da placa de trabalho (Figura 2), logo em seguida incubadas a 30°C em BOD em cultura estática por 7 dias. Após o período de incubação os biofilmes foram removidos e purificados em um béquer contendo uma solução 0,1 M de hidróxido de sódio (NaOH) por 24 horas a 50°C. Depois foram lavados com água destilada até o pH atingir a neutralidade e autoclavados por 20 min a 121 °C.

Figura 2. Esquema para preparo do inóculo bacteriano para biossíntese de NCB



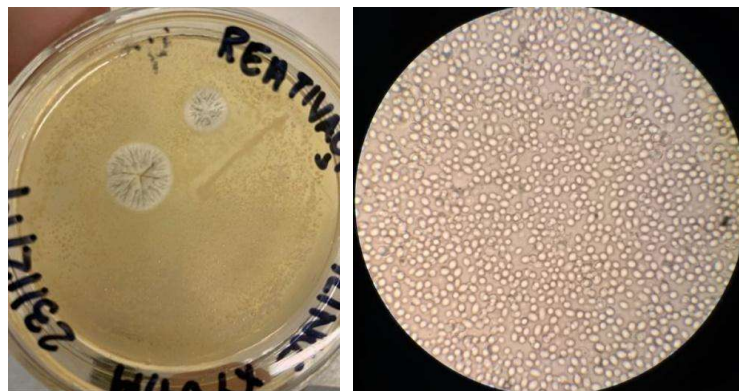
Fonte: Autoria própria (2020).

RESULTADO E DISCUSSÃO

O primeiro experimento consistiu na reativação da bactéria *K. xylinus* em meio Hestrin- Scharamm, entretanto, após o período de incubação de sete dias a placa de manutenção apresentou o crescimento de fungos filamentosos, evidenciados pelo crescimento de micélios observados pela morfologia macroscópica das colônias como demonstrado na Figura 3 (a). Já o meio o meio de reativação com

meio HS líquido ao ser observado uma alíquota em microscópico óptico, ficou constatado a contaminação por leveduras (Figura 3 (b)), caracterizadas por suas formas esféricas ou ovais na presença de pseudo-hifas, características típicas de leveduras (Tortora; Funke, 2010), divergindo do padrão morfológico de estrutura em forma bacilar e tamanho de 0,5 µm a 1,0 µm por 2,0 µm a 10,0 µm da cepa de *K. Xylinus* (KADERE et al., 2008; TOMITA; KONDO, 2009).

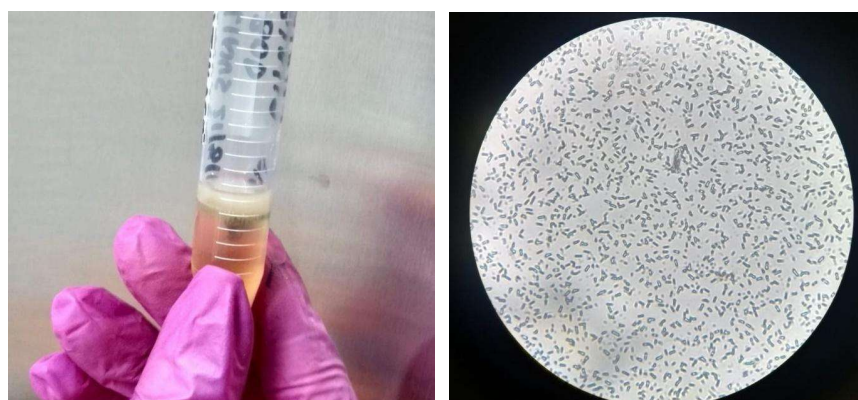
Figura 3 – Contaminação da placa de manutenção por fungos filamentosos (a), contaminação do meio líquido por leveduras (b)



Fonte: Autoria própria (2020).

A reativação foi refeita e após 7 dias verificado a formação de uma película de nanocelulose bacteriana conforme a Figura 4 (a) e confirmação morfológica (b) e por fim preparadas as placas de manutenção.

Figura 4 – Biossíntese do biofilme de nanocelulose após 7 dias de incubação de forma estática (a), micrografia *K. Xylinus* (b)



Fonte: Autoria própria (2020).

Para produção de biofilmes transparentes, foi preparado um inóculo com o meio mínimo de 10 % do volume final e por fim em uma placa de 24 poços foram adicionados 2 mL em cada poço, em seguida incubados por 7 dias a 30°C.

Após este período, não foi verificado a formação de biofilmes, indicando uma possível contaminação do meio (Figura 5).

Figura 5 – Teste de biossíntese de NCB através do meio mínimo



Fonte: Autoria própria (2020).

CONCLUSÃO

O presente estudo alcançou as atividades propostas de propagação, estoque, reativação da cepa bacteriana, preparo de reagentes e meio de cultura. Devido as contaminações e posteriormente com a pandemia, as atividades foram suspensas não sendo possível obter resultados conclusivos. Neste aspecto, não é possível concluir que as modificações do meio de cultivo mínimo foram eficientes na produção de biofilmes de nanocelulose bacteriana opticamente transparentes através da cepa de *Komagataeibacter xylinus*, sendo necessário que novos testes sejam realizados futuramente.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Prof.^a Dr.^a Samara Silva Souza e coorientadora Prof.^a Dr.^a Naiana Cristine Gabiatti por todo apoio ao longo da elaboração do projeto de pesquisa. Também gostaria de deixar um agradecimento em especial a Universidade Tecnológica Federal do Paraná e a Fundação Araucária por possibilitar a execução deste trabalho científico.

REFERÊNCIAS

AZATIAN, S.; KAUR, N.; LATHAM, M. Increasing the buffering capacity of minimal media leads to higher protein yield. *Journal of biomolecular NMR*, v. 73, n. 1-2, p. 11-17, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10858-018-00222-4>. Acesso em: 24 de ago. 2020.

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, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.04.081>. Acesso em: 24 de ago. 2020.

CASTRO, C. et al. Structural characterization of bacterial cellulose produced by *Gluconacetobacter swingsii* sp. from Colombian agroindustrial wastes. *Carbohydr Polym*, v. 84, p. 96–102, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.10.072>. Acesso em: 24 de ago. 2020.

CAVKA, A.; GUO, X.; TANG, S.; WINESTRAND, S.; JÖNSSON, L. J.; HONG, F. Production of bacterial cellulose and enzyme from waste fiber sludge. *Biotechnology for Biofuels*, London, v. 6, n. 1, p. 25, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-25>. Acesso em: 24 ago. 2020.

CHEN, C. et al. Optically transparent biocomposites: polymethylmethacrylate reinforced with high-performance chitin nanofibers. *BioResources*, v. 7, n. 4, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/0021998311431995>. Acesso em 24 de ago. 2020.

DAHMAN, Y.; JAYASURIA, KE.; KALIS, M. Potential of biocellulose nanofibers production from agricultural renewable resources: preliminary study. *Applied Biochemistry Biotechnology*, v. 162, p. 1647–1659, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12010-010-8946-8>. Acesso em 24 de ago. 2020.

FAROOQ, U. et. al. High-density particles immobilization in surface-modified bacterial cellulose for ultra-sensitive and selective eletrochemical detection of *staphylococcus aureus*. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 157, n. 112163. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112163>. Acesso em 24 ago. 2020.

FERNANDES, S. C. M. et al. Novel transparent nanocomposite films based on chitosan and bacterial cellulose. *Green Chemistry*, v. 11, n. 12, p. 2023–2029, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/B919112G>. Acesso em: 24 de ago. 2020.

Fu, L.; Zhang, J.; Yang G. Present status and applications of bacterial cellulose-based materials for skin tissue repair. *Carbohydrate Polymers*, v.92, p. 1432–1442, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.10.071>. Acesso em: 24 ago. 2020.

GAMA, M.; GATENHOLM, P.; KLEMM, D. (Eds.). Bacterial nanocellulose: a sophisticated multifunctional material. Florida: CRC Press, p. 304, 2012.

GOELZER, F. D. E.; FARIA-TISCHER, P. C. S.; VITORINO, J. C.; SIERAKOWSKI, M. R.; TISCHER, C. A. Production and characterization of nanospheres of bacterial cellulose from *Acetobacter xylinum* from processed rice bark. Materials Science and Engineering: C, Raleigh, v. 29, n. 2, p. 546-551, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2008.10.013>. Acesso em: 24 de ago. 2020.

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. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/bj0560163>. Acesso em: 24 ago. 2020.

HONG, F.; GUO, X.; ZHANG, S.; HAN, S. F.; YANG, G.; JÖNSSON, L. J. Bacterial cellulose production from cotton-based waste textiles: enzymatic saccharification enhanced by ionic liquid pretreatment. Bioresource Technology, Barking, v. 104, p. 503-508, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.028>. Acesso em: 24 de ago. 2020.

HONG, F.; WEI, B.; CHEN, L. Preliminary study on biosynthesis of bacterial nanocellulose tubes in a novel doublesilicone-tube bioreactor for potential vascular prosthesis. Biomed Res Int., 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2015/560365>. Acesso em: 24 ago. 2020.

HYUN, J. Y.; MAHANTY, B.; KIM, C. G. Utilization of Makgeolli Sludge Filtrate (MSF) as LowCost Substrate for Bacterial Cellulose Production by *Gluconacetobacter xylinus*. Applied Biochemistry and Biotechnology, Clifton, v. 172, n. 8, p. 3748-3760, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12010-014-0810-9>. Acesso em: 24 de ago. 2020.

JOZALA, A. F.; DE LENCASTRE-NOVAES, L. C.; LOPES, A. M.; SANTOS-EBINUMA, V. C.; MAZZOLA, P. G.; PESSOA-JR, A.; GROTO, D.; GERENUTTI, M.; CHAUD, M. V. Bacterial nanocellulose production and application: a 10-year overview. Applied Microbiology Biotechnology, Berlin, v. 100, n. 5, p. 2063-2072, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7243-4>. Acesso em: 24 ago. 2020.

KADERE, T. T.; MIYAMOTO, T.; ONIANG`O, R. K.; KUTIMA, P. M.; NJOROGI, S. M. Isolation and identification of the genera *Acetobacter* and *Gluconobacter* in coconut toddy (mnazi). African Journal of Biotechnology, v. 7, n. 16, p. 2963-2971, 2008. Disponível em:

<https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/59210>. Acesso em: 24 de ago. 2020.

KIZILTAS, E. E.; KIZILTAS, A.; GARDNER, D. J. Synthesis of bacterial cellulose using hot water extracted wood sugars. *Carbohydrate Polymers*, Oxford, v. 124, p. 131-138, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.01.036>. Acesso em: 24 de ago. 2020.

KONGRUANG, S.; Bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* strains from agricultural waste products. *Applied Biochemistry Biotechnology*, v. 148, p. 245-246, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12010-007-8119-6>. Acesso em: 24 de ago. 2020.

KUMBHAR, J. V.; RAJWADE, J. M.; PAKNIKAR, K. M. Fruit peels support higher yield and superior quality bacterial cellulose production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Heidelberg, v. 99, n. 16, p. 6677-6691, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6644-8>. Acesso em: 24 de ago. 2020.

KUO, C. H.; LIN, P. J.; LEE, C. K. Enzymatic saccharification of dissolution pretreated waste cellulosic fabrics for bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, Roboken, v. 85, n. 10, p. 1346-1352, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jctb.2439>. Acesso em: 24 ago. 2020.

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, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mabi.201300298>. Acesso em: 24 ago. 2020.

LETORT, C.; JUILLARD, V. Development of a minimal chemically- defined medium for the exponential growth of *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Applied Microbiology*, v. 91, n. 6, p. 1023-1029, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01469.x>. Acesso em: 24 de ago. 2020.

MACHADO, H. et al. Strain- specific metabolic requirements revealed by a defined minimal medium for system analyses of *Staphylococcus aureus*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 85, n. 21, p. 1-13, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.01773-19>. Acesso em: 24 de ago. 2020.

Metcalf, A.D.; Ferguson, M. W. J. Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells

and regeneration. *Journal of the royal Society interface*, n.4, p. 413–437, 2006.
Disponível em: <https://doi.org/10.1098/rsif.2006.0179>. Acesso em 24 ago. 2020.

Miller, J. H. *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor (New York): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1972.

NIAOUNAKIS, M. Medical, dental, and pharmaceutical applications. In: Jackson D (eds) *Biopolymers: applications and trends*, 1st edn. William Andrew Publishing, Oxford, p. 291–405, 2015.

NOGI, M.; YANO, H. Transparent Nanocomposites Based on Cellulose Produced by Bacteria Offer Potential Innovation in the Electronics Device Industry. *Advanced Materials*, v. 20, n. 10, p. 1849–1852, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/adma.200702559>. Acesso em: 24 de ago. 2020.

OKAHISA, Y. et al. Optically transparent wood–cellulose nanocomposite as a base substrate for flexible organic light-emitting diode displays. *Composites Science and Technology*, v. 69, n. 11–12, p. 1958–1961, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.compscitech.2009.04.0.17>. Acesso em: 24 de ago. 2020.

PHAN-THANH, L.; GORMON, T. A chemically defined minimal medium for the optimal culture of *Listeria*. *International Journal of Food Microbiology*, v. 35, n.1, p. 91-95, 1997. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(96\)01205-6](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(96)01205-6). Acesso em: 24 de ago. 2020.

SAITO, H. et al. Preparation and properties of transparent cellulose hydrogels. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 90, n. 11, p. 3020– 3025, 9 dez. 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/app.13015>. Acesso em: 24 de ago. 2020.

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, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.08.018>. Acesso em 24 ago. 2020.

SHI, Z.; ZHANG, Y.; PHILLIPS, G. O.; YANG, G. Utilization of bacterial cellulose in food. *Food Hydrocolloids*, Oxford, v. 35, p. 539-545, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.07.012>. Acesso em 24 ago. 2020.

SOUZA, S. S.; BERTI, F. V.; OLIVEIRA, K. P. V. DE; et al. Nanocellulose biosynthesis by *Komagataeibacter hansenii* in a defined minimal culture medium. *Cellulose*,

v.26, n. 3, p. 1641–1655, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10570-018-2178-4>. Acesso em: 24 ago. 2020.

TOMITA, Y.; KONDO, T. Influential factors to enhance the moving rate of *Acetobacter xylinum* due to its nanofiber secretion on oriented templates. *Carbohydrate Polymers*, v. 77, p. 754–759, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.02.022>. Acesso em: 24 de ago. 2020.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, CL. *Microbiologia*. 10. ed., Porto Alegre: Artmed, 2010.

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, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10924-012-0541-3>. Acesso em: 24 de ago. 2020.

WEGKAMP, A. et al. Development of minimal growth medium for *Lactobacillus plantarum*. *Letters in Applied Microbiology*, v. 50, n. 1, p. 57-54, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02752.x>. Acesso em: 24 de ago. 2020.

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, 2012a. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13213-011-0288-4>. Acesso em: 24 de ago. 2020.

YAMADA, Y.; YUKPHAN, P.; VU, H. T. L.; MURAMATSU, Y.; OCHAIKUL, D.; TANASUPAWAT, S.; NAKAGAWA, Y. Description of *Komagataeibacter* gen. nov., with proposals of new combinations (*Acetobacteraceae*). *Journal General Applied Microbiology*, Tokyo, v. 58, p. 397-404, 2012b. Disponível em: <https://doi.org/10.2323/jgam.58.397>. Acesso em: 24 de ago. 2020.