

Modificações *in situ* para biossíntese de nanocelulose bacteriana opticamente transparente

In situ modifications for optically transparent bacterial nanocellulose biosynthesis

João Pedro Maximino Gongora Godoi*, Samara Silva de Souza†

Gabriela Sperotto‡, Larissa Gabrieli Stasiak Vezentin§, Naiana Cristine Gabiatti¶

Paula Fernandes Montanher^l

RESUMO

A nanocelulose bacteriana (NCB) é tradicionalmente produzida em meio de cultivo complexo, o meio Hestrin-Schramm (HS). Entretanto é um processo economicamente custoso e não permite sua quantificação, bem como a reprodutibilidade pois utiliza-se componentes complexos. Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo explorar modificações *in situ* do meio de cultura, utilizando-se o meio mínimo definido para avaliar a capacidade da bactéria *Komagataeibacter xylinus* em produzir membranas opticamente transparentes sob restrição de nutrientes. A reativação da cepa bacteriana foi realizada em meio HS durante sete dias de incubação em B.O.D a 28°C. Após o aumento do inóculo bacteriano, alíquotas foram preparadas e preservadas em glicerol. Para produção das membranas foi realizada a inoculação da bactéria nos dois meios de cultura produzidos: meio mínimo e HS e incubados durante 14 dias em B.O.D. Após a produção das membranas seguiu-se com a purificação em hidróxido sódico (0,1 M) a 50°C durante 24 horas, seguido de lavagens sucessivas com água destilada para remoção das bactérias. As membranas foram autoclavadas e estocadas. Em conclusão, o estudo demonstrou a eficiência das modificações realizadas *in situ* com o uso do meio mínimo para a produção de membranas transparentes quando comparadas com as produzidas no meio complexo.

Palavras-chave: Nanocelulose bacteriana, Meio Complexo, Meio Mínimo.

ABSTRACT

Bacterial nanocellulose (BNC) is traditionally produced in a complex culture medium, the Hestrin-Schramm (HS) medium. However it is an economically costly process and does not allow its quantification, as well as reproducibility because complex components are used. In this context, the present work aims to explore *in situ* modifications of the culture medium, using the defined minimal medium to evaluate the ability of the bacterium *Komagataeibacter xylinus* to produce optically transparent membranes under nutrient restriction. Reactivation of the bacterial strain was performed in HS medium for seven days of incubation in B.O.D. at 28 °C. After increasing the bacterial inoculum, aliquots were prepared and preserved in glycerol. To produce the membranes, the bacteria were inoculated in both culture media, minimal and HS, and incubated for 14 days in B.O.D. After the production of the membranes, it was followed with purification in sodium hydroxide (0.1 M) at 50 °C for 24 hours and successive washes with distilled water until complete removal of bacteria. The membranes were autoclaved and stored. In conclusion, the study demonstrated the efficiency of the modifications performed *in situ* using the minimal medium for the production of transparent membranes when compared to those produced in the complex medium.

Keywords: Bacterial Nanocellulose, Complex media, Minimal Media.

* Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil; jgodoi@alunos.utfpr.edu.br

† Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos; samarasouza@utfpr.edu.br

‡ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos; gsperotto@alunos.utfpr.edu.br

§ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos; larissastakiak@alunos.utfpr.edu.br

¶ Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos; naianagabiatti@utfpr.edu.br

^l Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos; paulamontanher@utfpr.edu.br

1 INTRODUÇÃO

A celulose constituinte das paredes celulares das plantas e algas é o polímero mais abundante do planeta da terra, entretanto, apesar de ser extraída de fontes renováveis, o uso da madeira como matéria prima ainda é a principal causa de desmatamentos ilegais e os processos de purificação da celulose são altamente poluentes, isto é, a celulose encontra-se ramificada entre hemicelulose, lignina e impurezas que são removidas através de processos químicos que resultam em efluentes com alta fração de compostos orgânicos não biodegradáveis (ESA; TASIRIN; RAHMAN, 2014; DONINI et al., 2014). Nesse sentido existe algum biomaterial que possa resolver toda esta temática ambiental e ainda possa ser modificado?

A nanocelulose bacteriana (NCB) se destaca como uma alternativa tecnológica promissora para substituição dos processos tradicionais de obtenção de celulose. Para a biossíntese de NCB são utilizadas bactérias do gênero *Komagataeibacter*, sendo o organismo modelo de produção a *Komagataeibacter xylinus* devido a sua alta capacidade de sintetizar celulose a partir de diferentes substratos (YAMADA et al, 2012 a,b). A NCB possui estrutura química semelhante a celulose vegetal e seu processo de purificação envolve apenas a remoção das bactérias aderidas a membrana, deste modo, não contendo impurezas indesejadas. Além disso, é constituída por fibras nanométricas que a conferem propriedades específicas tais como alta resistência mecânica e à tração, possibilidade de formação de compósitos, hidrofiliabilidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade, alta cristalinidade, alta pureza, grande capacidade de retenção de água (DONINI et al., 2010; ESA; TASIRIN; RAHMAN, 2014; VAZQUEZ et al., 2013).

Uma grande vantagem na NCB é sua funcionalização, através de modificações que podem alterar suas propriedades físico-químicas a fim de se obter um material diferenciado. As modificações da nanocelulose podem ser realizadas através de métodos *in situ* na qual a incorporação de outros materiais ocorrem durante a síntese ou modificações no meio de cultura. Por outro lado, o método *ex situ* a NCB é incorporada com materiais em uma fase pós tratamento (CHAWLA et al., 2009; DE SOUZA et al, 2019; ESA; TASARIN; RAHMAN, 2014).

Diversos autores demonstraram a capacidade da bactéria *K. xylinus* de fermentar diferentes substratos com o intuito de obtenção de celulose, sendo o primeiro estudo desenvolvido por Hestrin e Schramm (1958) ao qual utilizaram glicose como fonte de carbono e outros nutrientes tais como extrato de levedura e peptona (HESTRIN; SCHARAMM, 1954). Atualmente, 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). Estudos surgiram com o intuito de reduzir o alto custo dos meios de cultura, principalmente meios alternativos como fontes de carbono e nitrogênio a partir de resíduos agroindustriais (CAVKA et al., 2013; KUO; LIN; LEE, 2010; HYUN; MAHANTY; KIM, 2014), da indústria alimentícia (YANG et al., 2016; KONGRUANG, 2008) e resíduos da indústria de biodiesel (YANG et al., 2013; GUO et al., 2013) entre outros. No entanto, todos esses meios ainda possuem componentes complexos em sua composição, o que não possibilita uma quantificação exata dos nutrientes, além de variações a cada lote. Além disso, o uso de componentes alternativos como meio de cultura pode influenciar nas propriedades finais das fibras de NCB (KONGRUANG, 2008; DAHMAN; JAYASURIA; KALIS, 2010).

Novos estudos revelam as vantagens dos meios quimicamente definidos que contêm a composição exata de cada componente. Dentre os meios quimicamente definidos, o meio mínimo é uma excelente alternativa, no qual contém a quantidade adequada de nutrientes necessária para o crescimento microbiano (MACHADO et al., 2019; LETORT; JUILLARD, 2001). Os estudos sobre meio mínimo relatados na literatura são utilizados em experimentos *in silico*, identificando as capacidades metabólicas, demanda de nutrientes e geração de

metabólitos extracelulares para modulação de um meio de cultura (PHAN-THANH; GORMON, 1997; AZATIAN; KAUR; LATHAN, 2019).

O primeiro meio mínimo definido para produção de nanocelulose bacteriana foi elaborado por De Souza e colaboradores (2018) a partir da bactéria *Komagataeibacter hansenii* (ATCC® 23769™) e avaliou diferentes concentrações de diferentes fontes de carbono e nitrogênio em cultura estática. Como consequência dessa modulação do meio de cultura, a membrana sintetizada apresentou uma elevada transparência e porosidade quando comparada a membranas sintetizadas em meios complexos (DE SOUZA et al., 2019). Além disso, o custo do meio mínimo fica em torno de \$0,87 por litro, enquanto o meio HS chega a \$3,99 por litro, uma redução significativa (SPEROTTO et al., 2021).

Os biofilmes transparentes de NCB se destacam em aplicações de engenharia de tecidos pois sua microestrutura fornece uma matriz organizada para o crescimento celular e podem ser usados para processos de cicatrização de feridas que podem ser facilmente monitoradas sem remoção do curativo (KHODA; KOC, 2013; ZHU; MARCHANT, 2011; NOGI; YANO, 2008). Nesse contexto, esse estudo tem como objetivo explorar as modificações *in situ* de meio de cultura, principalmente no que se refere a utilização de um meio mínimo definido, para biossíntese de membranas de nanocelulose bacteriana opticamente transparentes a partir da bactéria *Komagataeibacter xylinus* (ATCC® 53524™) em cultura estática.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Meios de cultivo

A bactéria *Komagataeibacter xylinus* (ATCC® 53524™) foi empregada na biossíntese de nanocelulose bacteriana (NCB). Para reativação, cultivo e preservação foi preparado o meio de cultura líquido Hestrin-Scharamm (HS) constituído por 20 g/L de glicose (C₆H₁₂O₆), 5 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de peptona bacteriológica, 2,7 g/L de fosfato dissódico (Na₂HPO₄) e 1,15 g/L de ácido cítrico (C₆H₈O₇). Para o meio de cultura sólido o meio Hestrin-Scharamm (HS) foi suplementado com 15 g/L de ágar bacteriológico, o pH do meio foi corrigido para 6,5 e esterilizado em autoclave a 121°C por 20 minutos (HESTRIN; SCHARAMM, 1954).

Em alternativa ao meio HS, foi desenvolvido um meio de cultura mínimo, conforme a metodologia adotada por De Souza e colaboradores (2019) ao qual foram preparadas separadamente soluções estoques de cloreto de cálcio (CaCl₂) - 0,1 M, sulfato de magnésio (MgSO₄) - 1 M, cloreto de amônio (NH₄Cl) - 0,5 M e glicose (C₆H₁₂O₆) - 1 M (DE SOUZA et al., 2019). Para a suplementação mínima de sais utilizou-se os padrões determinados por Miller (1979), sendo elaborado uma solução estoque de sais 10x 4% (v/v) com 58 g de fosfato dissódico (Na₂HPO₄), 30 g de fosfato monopotássico (KH₂PO₄) e 5 g de cloreto de sódio (NaCl) (MILLER, 1979). Todas as alíquotas foram esterilizadas em autoclave a 121°C por 20 minutos. O meio de cultivo mínimo foi preparado em câmara de fluxo laminar com adição de alíquotas das soluções produzidas anteriormente, seguindo a adição de 40 mL solução de estoque 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 com água deionizada.

2.1 Reativação e preservação da cepa bacteriana

Para a reativação da cepa bacteriana de *K. xylinus* foi descongelada uma alíquota estoque de 1 mL, ao qual foram inoculados 100 µL em placas com meio HS sólido, sendo nomeada como “placa de manutenção”.

O restante da alíquota foi realocado em tubo falcon contendo 4 mL de meio HS, após homogeneização, o tubo foi incubado em estufa B.O.D por sete dias a 28°C. Após o período de incubação, a membrana de nanocelulose formada foi retirada e realizado o aumento do inóculo bacteriano adicionando cerca de 45 mL de meio HS em um erlenmeyer, sendo cultivado por mais sete dias a 28°C. Por fim, as amostras foram preservadas em glicerol (20%) a -20°C.

2.2 Biossíntese e purificação

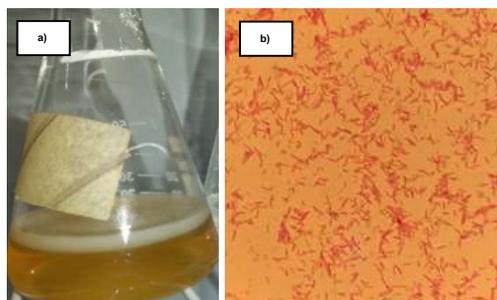
Através da placa de manutenção gerada na etapa anterior, foram selecionadas em torno de 6 colônias de *K. xylinus* em 1 mL, criando o inóculo bacteriano, logo foram inoculados 100 µL deste inóculo em uma placa denominada “placa de trabalho” ao qual foi incubada por 7 dias a 28°C. Para a produção das membranas de NCB foi preparado um inóculo bacteriano de 2,5% v/v.

Para os ensaios foram utilizadas placas de 6 poços, contendo 6 mL por poço do inóculo de cada um dos meios. As placas foram incubadas por 14 dias a 28°C, após o período de incubação as membranas foram imersas em uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) – 0,1M a 50°C durante 24 horas. Em seguida, as membranas foram lavadas até atingirem pH em torno da neutralidade e autoclavadas, sendo estocadas para futuras análises.

2 RESULTADOS

O primeiro experimento consistiu na reativação da bactéria *K. xylinus* utilizando o meio HS. Após o período de incubação de sete dias verificou-se a formação da membrana de nanocelulose bacteriana (Fig. 1a). Uma lâmina a partir da alíquota foi corada através da coloração de Gram (Fig. 1b) e ao ser observada em microscópico óptico revelou um padrão morfológico em forma bacilar e tamanho de 0,5 µm a 1,0 µm por 2,0 µm a 10,0 µm e apresentando cor rosa, características de bactérias Gram-negativas como a *K. xylinus* (KADERE et al., 2008; TOMITA; KONDO, 2009).

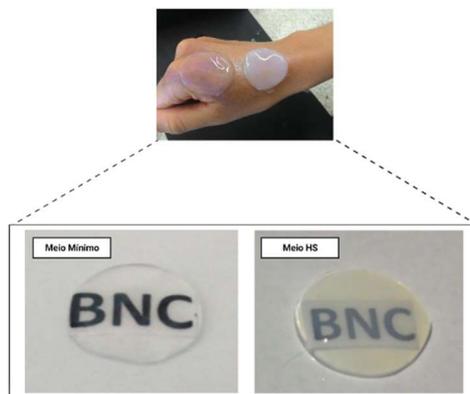
Figura 1 – Reativação bacteriana após incubação (a) e coloração de Gram da lâmina contendo *K. xylinus* (b)



Fonte: Autoria Própria (2021)

As membranas transparentes também foram sintetizadas com sucesso a partir do meio mínimo definido. A Figura 2 mostra a maior transparência das membranas sintetizadas em meio mínimo comparado as membranas em meio complexo.

Figura 2 – Produção de membranas de nanocelulose bacteriana opticamente transparentes



Fonte: Autoria Própria (2021)

Assim esse estudo apresenta uma nova membrana mais transparente opticamente. Ainda é necessário realizar as caracterizações das membranas para avaliar a microestrutura de rede de nanofibras, porosidade, além de outras propriedades. Esse material tem grande potencial, uma vez que se trata de nanocelulose pura sem adição de outras substâncias, apenas com a modulação do meio de cultura e por um custo de produção bem baixo.

3 CONCLUSÃO

O presente estudo alcançou a realização das atividades propostas de propagação, estoque, reativação da cepa bacteriana e preparo dos meios de cultura. O uso do meio mínimo foi efetivo no crescimento de nanocelulose bacteriana a partir da bactéria *Komagataeibacter xylinus* mesmo sob restrição de nutrientes. Além disso, as membranas apresentaram uma maior transparência quando comparadas as membranas obtidas pelo meio HS, podendo ser uma excelente alternativa para aplicações onde a transparência é essencial.

AGRADECIMENTOS

A Prof. Dra. Samara Silva de Souza por todo apoio ao longo da elaboração do projeto de pesquisa. Também gostaria de agradecer a Universidade Tecnológica Federal do Paraná e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) 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.
- 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.
- CHAWLA, P. R. et al. Microbial cellulose: fermentative production and applications. **Food Technology and Biotechnology**, v. 47, n. 2, p. 107-124, 2009.
- 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.



- DE SOUZA, S. S. et al. Nanocellulose biosynthesis by *Komagataeibacter hansenii* in a defined minimal culture medium. **Cellulose**, v. 26, n. 3, p. 1641–1655, 2019.
- DONINI, Í. A. N. et al. Biossíntese e recentes avanços na produção de celulose bacteriana. **Eclética Química**, v. 35, p. 165–178, 2010.
- ESA, F.; TASIRIN, S. M.; RAHMAN, N. A. Overview of Bacterial Cellulose Production and Application. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**, v. 2, p. 113–119, 2014.
- GUO, X.; CAVKA, A.; JÖNSSON, L. J.; HONG, F. Comparison of methods for detoxification of spruce hydrolysate for bacterial cellulose production. **Microbial Cell Factories**, London, v. 12, n. 93, p. 1-14, 2013.
- 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.
- 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.
- 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.
- KADERE, T. T.; MIYAMOTO, T.; ONIANG'O, R. K.; KUTIMA, P. M.; NJOROGE, 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.
- KHODA, A. K. M.; KOC, B. Functionally Heterogeneous Porous Scaffold Design for Tissue Engineering. **Journal of Computer Aided Design (CAD)**, v. 45, n. 11, p. 1276-1293, 2013.
- 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, 2008
- 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.
- 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.
- 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.
- MILLER, J. H. **Experiments in molecular genetics**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1972.
- 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.
- 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.
- SPEROTTO, G.; STASIAK, L. G.; GODOI, J. P. M. G. et al. A review of culture media for bacterial cellulose production: complex, chemically defined and minimal media modulations. **Cellulose**, v. 28, p. 2649–267, 2021.
- 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.
- VAZQUEZ, A. et al. Bacterial cellulose from simple and low-cost production media by *Gluconacetobacter xylinus*. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 21, n. 2, p. 545–554, 2013.
- YAMADA, Y. et al. Description of *Komagataeibacter* gen. nov., with proposals of new combinations (*Acetobacteraceae*). **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 58, n. 5, p. 397–404, 2012a.
- YAMADA, Y. et al. Subdivision of the genus *Gluconacetobacter* Yamada, Hoshino and Ishikawa 1998: the proposal of *Komagatabacter* gen. nov., for strains accommodated to the *Gluconacetobacter xylinus* group in the α -*Proteobacteria*. **Annals of Microbiology**, v. 62, n. 2, p. 849–859, 2012b.
- 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, 2013.
- 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.
- ZHU, J.; MARCHANT, R. E. Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds. **Expert Rev Med Devices**, v. 8, p. 607–626, 2011.