



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102020012400-5 A2



(22) Data do Depósito: 18/06/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 21/12/2021

(54) **Título:** MEIO DE CULTURA À BASE DE SAIS E FONTE DE CARBONO SIMPLES PARA PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA E USOS

(51) **Int. Cl.:** C12N 1/20; C12P 19/04.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO.

(72) **Inventor(es):** KARINA CARVALHO DE SOUZA; GLÓRIA MARIA VINHAS; JAQUELINE DE MORAIS CAMPELO; INGRID SUELY MELO DE LIMA.

(57) **Resumo:** MEIO DE CULTURA À BASE DE SAIS E FONTE DE CARBONO SIMPLES PARA PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA E USOS. A presente inovação propõe um meio de cultura de baixo custo e que pode ser uma alternativa versátil para testes bioquímicos em bactérias do gênero *Acetobacter*, bem como a produção de biopolímeros de celulose bacteriana. A formação utilizada para o crescimento da celulose bacteriana por bactérias do gênero *Acetobacter* tem sua composição a base de sais (Di-hidrogenofosfato de amônio, Fosfato dipotássico, Sulfato de magnésio hepta-hidratado, Cloreto de cálcio di-hidratado, Sulfato de ferro II), Açúcar (fonte de carbono) e etanol. Como principais resultados das avaliações de caracterização dos filmes poliméricos, obteve-se um material biotecnologicamente compatível à celulose bacteriana produzida de forma convencional.



MEIO DE CULTURA À BASE DE SAIS E FONTE DE CARBONO SIMPLES PARA PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA E USOS

[01] O presente relatório refere-se a um produto de inovação, meio de cultura a base de sais e trioses ou hexoses, para avaliações bioquímicas em bactérias do gênero *Acetobacter* e produção de celulose bacteriana (CB). O meio proposto é líquido, de aspecto turvo e de coloração branca.

[02] O meio é constituído de seis componentes, sendo estes: di-hidrogenofosfato de amônio, fosfato dipotássico, sulfato de magnésio hepta-hidratado, cloreto de cálcio di-hidratado, sulfato de ferro II e fonte de carbono (glicose, manitol, sorbitol, frutose, sacarose, peptona, extrato de levedura e glicerol). A invenção proposta possui composição controlada e definida que proporcionará o desenvolvimento de bactérias do gênero *Acetobacter*, especialmente as que produzem celulose. Bem como, otimizar a produção de biopolímeros melhorando significativamente as avaliações bioquímicas.

[03] As bactérias do gênero *Gluconacetobacter* são Gram-negativas, dotadas de motilidade, isto é, com presença de flagelos e cujas colônias apresentam aspecto leitoso. Estas bactérias são capazes de oxidar etanol a ácido acético e algumas espécies deste gênero são produtoras de biopolímero de celulose, também chamado de nanocelulose. Dentre as mais diversas fontes de carbono que são capazes de metabolizar estão D-glicose, D-galactose, D-xilose e D-arabinose (Yamada *et al.*, 2012). As espécies *Hansenii* e *Rhaticus* foram escolhidas por serem dois microrganismos exaustivamente estudados na literatura.

[04] O meio de cultivo mais utilizado para este tipo de bactéria foi elaborado em 1954 por Hestrin e Schramm (HS), tendo como composição, em porcentagem massa/volume (%m/v), glicose 2,0%,

peptona 0,5%, extrato de levedura 0,5%, dissódio fosfato anidro 0,27% e ácido cítrico mono-hidratado 0,115%. Nesta formulação, o pH é ajustado para 6,0 utilizando ácido clorídrico ou hidróxido de sódio diluídos (Hestrin e Schramm, 1954). Contudo, por se tratar de um meio de cultivo complexo, não é possível saber com exatidão, todos os seus componentes. Pois, esses meios de cultura que contém substâncias como extrato de levedura e peptona em sua composição, possuem porcentagens diversas de carbono e nutrientes. Este aspecto, afeta a repetibilidade dos experimentos realizados, uma vez que cada formulação apresentar-se-á com características próprias.

[05] O meio sintético à base de sais de Cl^- , SO_4^{2-} e H_2PO_4^- e fontes de carbono possui composição simples e controlada e facilmente assimilável por micro-organismos do gênero *Gluconacetobacter*, por se tratar de micro e macronutrientes fundamentais ao crescimento e produção da celulose. Essa composição poderá ser de suma importância para realização de testes bioquímicos, onde a fonte de carbono assimilada pela bactéria é única e controlada. Outro fator relevante é com relação aos custos para produção de celulose bacteriana, o meio mais usado (Hestrin-Schramm, HS) é caro e inviabiliza a produção em escala industrial. Outro relatório, como a patente BR 10 2014 027203 8 A2, buscou a produção de celulose bacteriana a partir de fontes renováveis de açúcares de cana-de-açúcar, derivados lácteos e água de coco. Entretanto, a composição salina aqui proposta visa suprir os impasses quanto às avaliações bioquímicas e custos de produção, pois tem como principal vantagem sua composição controlada, diferentemente dos meios convencionais e ou formulados a partir de resíduos, já existentes.

[06] As imagens e os dados anexados na seção dos desenhos configuram resultados positivos em relação ao produto de inovação proposto, o meio de cultura para produção de celulose bacteriana. A

Figura 1 ilustra a imagem da membrana de celulose através do meio de cultura. A Figura 2 representa o espectro de FTIR da biomembrana produzida a partir do meio sintético. A Figura 3 ilustra a tabela que comprova semelhança químicas entre as celuloses produzidas no meio de sintético e meios convencionais. As Figuras 4a e 4b são imagens microscópicas da estrutura reticulada composta por nanofibrilas finas de tamanho manométrico, vista na película da celulose bacteriana. A Figura 5 representa o espectro de TGA da película de celulose bacteriana. A Figura 6 representa o difratograma da película de celulose bacteriana.

[07] O meio proposto possui a seguinte composição: di-hidrogenofosfato de amônio ($1,0$ a $7,0 \text{ g.L}^{-1}$), fosfato dipotássico ($0,1$ a $5,0 \text{ g.L}^{-1}$), sulfato de magnésio hepta-hidratado ($0,1$ a $6,0 \text{ g.L}^{-1}$), cloreto de cálcio di-hidratado ($0,1$ a $5,5 \text{ g.L}^{-1}$), sulfato de ferro II ($0,1$ a $2,0 \text{ g.L}^{-1}$), fonte de carbono ($30,0 \text{ g.L}^{-1}$) e etanol ($0,1$ a 10% v/v). O mesmo meio, sendo sólido ($18,0 \text{ g.L}^{-1}$ Agar-Agar), foi também utilizado para conservação e manutenção do micro-organismo. Após o preparo de 300 mL do meio composição salina, 50 mL foi distribuído em cada *erlenmeyer*, totalizando 6 reatores de 125 mL de capacidade, sendo um deles utilizado como inóculo. Ao inóculo, foram transferidas três alçadas da cultura previamente crescida em meio sólido, que ficou por três dias fermentando. Após esse tempo, foi transferido 10% (v/v) do inóculo para cada um dos 5 *erlenmeyer*, que tiveram tempo final de fermentação de 20 dias.

[08] As membranas obtidas foram purificadas nos próprios reatores utilizados para seu cultivo, retirando-se o meio remanescente e adicionando-se 50 mL de hidróxido de sódio (NaOH) $0,1 \text{ mol. L}^{-1}$ por 1h a 80°C . Em seguida, foram lavadas com água destilada e colocadas em estufa com circulação de ar por 24h a 40°C para o processo de secagem. Posteriormente, as amostras foram caracterizadas pelas técnicas:

infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), análise termogravimétrica (TGA), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e difratometria de raios-X (DRX).

[09] A análise de FTIR foi realizada, no Laboratório de Polímeros não convencionais, do Departamento de Física da UFPE, no espectrômetro IR Tracer-100 da Shimadzu, e o espectro foi obtido no comprimento de onda de 400 até 4.000 cm^{-1} , a fim de caracterizar a estrutura química da biomembrana, identificando os grupos funcionais presentes. As películas secas foram submetidas à análise termogravimétrica, a fim de verificar as temperaturas características da perda de água e decomposição da CB, utilizando um equipamento STA 5000 da Perkin Elmer, em que as amostras foram conduzidas entre 30 e 600°C, a 10°/min. As análises foram realizadas na Central Analítica do Departamento de Química Fundamental da UFPE. A análise de MEV foi realizada para observar as superfícies dos filmes poliméricos, possibilitando verificar a existência das nanofibras nas membranas. Para a realização dessa análise, seções das amostras foram colocadas sob "*stubs*", suportes utilizados nessa análise, e foi feita uma metalização com uma fina camada de ouro em aparelho de cobertura metálica. A análise foi realizada no microscópio eletrônico de varredura da marca Tescan e modelo Mira3, e foram visualizadas sob uma aceleração de voltagem 10 kV, em diferentes aumentos. A metalização foi realizada na Central Analítica do Departamento de Química Fundamental e a análise em si foi feita no Laboratório de Microscopia do Departamento de Física, ambos da UFPE. A análise de DRX foi realizada no ITEP (Instituto Tecnológico de Pernambuco). Os difratogramas foram obtidos em difratômetro Rigaku, com tubo de Cu em 40 kV e 20 mA na escala de 2θ . O intervalo angular (2θ) foi de 10-50° e a velocidade de varredura foi de 0,5°/min. O cálculo do índice de cristalinidade foi feito dividindo-se a área dos picos cristalinos pela área total do difratograma. A

equação 1 foi utilizada para calcular o índice de cristalinidade (Rosli *et al.*, 2013): $Ic\% = (Ic - Ia) / Ic \cdot 100$ (1), em que $Ic\%$ representa a fração cristalina em porcentagem, Ic representa a área total dos picos cristalinos e Ia representa a área total do halo amorfo.

[10] Como principais resultados, o espectro de FTIR da biomembrana produzida a partir do meio sintético comprova semelhança químicas entre as celuloses produzidas no meio de sintético e meios convencionais. A análise permitiu confirmar os grupos funcionais presentes na celulose bacteriana, além disso, foi possível observar que não houve interações dos componentes do meio com a celulose, pois não há picos referentes às bandas de absorção de grupos diferentes dos encontrados na CB, mostrando assim, a eficácia do processo de produção e purificação. Para análise de microscopia eletrônica, as películas de CB purificadas exibiram uma estrutura reticulada composta por nanofibrilas finas de tamanho $79,43 \pm 15,05$ nm. Segundo Pecoraro *et al.* (2008), as larguras de fibras nanométricas variam de 70 a 80 nm. Com relação a análise de TGA, observa-se uma perda de 8% de umidade em torno de 100°C . À medida que a temperatura aumentou, acima de 350°C , a degradação termo-oxidativa estabilizou a massa de celulose em torno de 30% da massa inicial, apresentando uma estabilidade térmica superior à produzida por meios convencionais da literatura. Por fim, a avaliação da cristalinidade mostrou que o biopolímero apresentou picos típicos de celulose bacteriana, nas regiões $14,5^\circ$, $16,3^\circ$ e $22,6^\circ$, que atribuídos à distância entre os planos cristalográficos característicos, indicativo das fases $I\alpha$ e $I\beta$ da estrutura cristalina (Cheng, Catchmark, Demirci, 2009; Sarma *et al.*, 2011).

[11] Como conclusão final desse invento, após avaliações de caracterização dos filmes poliméricos, obteve-se um material biotecnologicamente compatível à celulose bacteriana produzida de

forma convencional. Nesses biopolímeros, foi possível verificar características esperadas, como: grupos funcionais pertencentes à estrutura química da biomembrana; películas termicamente estáveis; nanofibras observadas microscopicamente com padrões em escala nanométrica, bem como, padrão de cristalinidade dentro do esperado.

→ **Referências bibliográficas**

[12] BR 10 2014 027203 8 A2. Processo de produção e purificação em escala de celulose bacteriana obtida pela polimerização da glicose a partir de fontes renováveis via biotecnologia por meio da propagação *Gluconoacetobacter hansenii* LMSPE em reatores e obtenção da celulose purificada para aplicação nas áreas da saúde, farmacotécnica e cosmiatria

[13] Cheng, K. C.; Catchmark, J. M.; Demirci, A. Effect of different additives on bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* and analysis of material property. *Cellulose*, 16:1033-1045, 2009.

[14] Hestrin, S.; Schramm, M. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. *Biochemical Journal*, 58:345-352, 1954.

[15] Pecoraro, E.; Manzani, D.; Messaddeq, Y.; Ribeiro Sidney, J. L. Bacterial cellulose from *Gluconoacetobacter xylinus*: preparation, properties and applications. *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*. Elsevier, São Paulo, Brasil, 2008.

[16] Rosli, N. A.; Ahmad, I.; Abdullah, I. Isolation and characterization of cellulose nanocrystals from *Agave angustifolia* fibre. *BioResources*, 8:1893-1908, 2013.

[17] Sarma, S. J.; Brar, S. K.; Sydney, E. B.; Le Bihan, Y.; Buelna, G.; Soccol, C. R. Microbial hydrogen production by bioconversion of crude glycerol: a review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37:6473-6490, 2011.

[18] Yamada, Y.; Youkphan, P.; Vu, H. T. L.; Muramatsu, Y.; Ochaikul, D.; Tanasupawat, S.; Nakagawa, Y. Description of *Komagateibacter* gen. Nov. With proposals of new combinations (*Acetobacteraceae*). *The Journal of General and Applied Microbiology*, 58:397-404, 2012.

REIVINDICAÇÕES

- 1) Meio de cultura à base de sais e fonte de carbono simples para produção de celulose bacteriana e usos, **caracterizado pela** seguinte composição: di-hidrogenofosfato de amônio (1,0 a 7,0g/L), fosfato dipotássico (0,1 a 5,0g/L), sulfato de magnésio hepta-hidratado (0,1 a 6,0g/L), cloreto de cálcio di-hidratado (0,1 a 5,5g/L), sulfato de ferro II (0,1 a 2,0g/L), etanol (0,1 a 10% v/v) e fonte de carbono, como os açúcares.
- 2) Meio de cultura à base de sais e fonte de carbono simples para produção de celulose bacteriana e usos, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado por** ser constituído de sais Cl^- , SO_4^{2-} e H_2PO_4^- e outros.
- 3) Meio de cultura à base de sais e fonte de carbono simples para produção de celulose bacteriana e usos, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado por** ser constituído de qualquer fonte de carbono que sirva de componente nutricional para o microrganismo.
- 4) Meio de cultura à base de sais e fonte de carbono simples para produção de celulose bacteriana e usos, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado por** um meio de cultura que serve de fonte nutricional para bactérias do gênero *Acetobacter* ou qualquer outro gênero produtor de celulose bacteriana.
- 5) Uso do meio de cultura à base de sais e fonte de carbono simples para produção de celulose bacteriana, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizado por** servir para avaliações bioquímicas em bactérias do gênero *Acetobacter* ou qualquer outro gênero produtor de celulose bacteriana.
- 6) Uso do meio de cultura à base de sais e fonte de carbono simples para produção de celulose bacteriana, de acordo com a Reivindicação 1, **caracterizada por** servir como suplemento de meio de cultura convencionais, como Hestrin-Schramm (HS).

DESENHOS

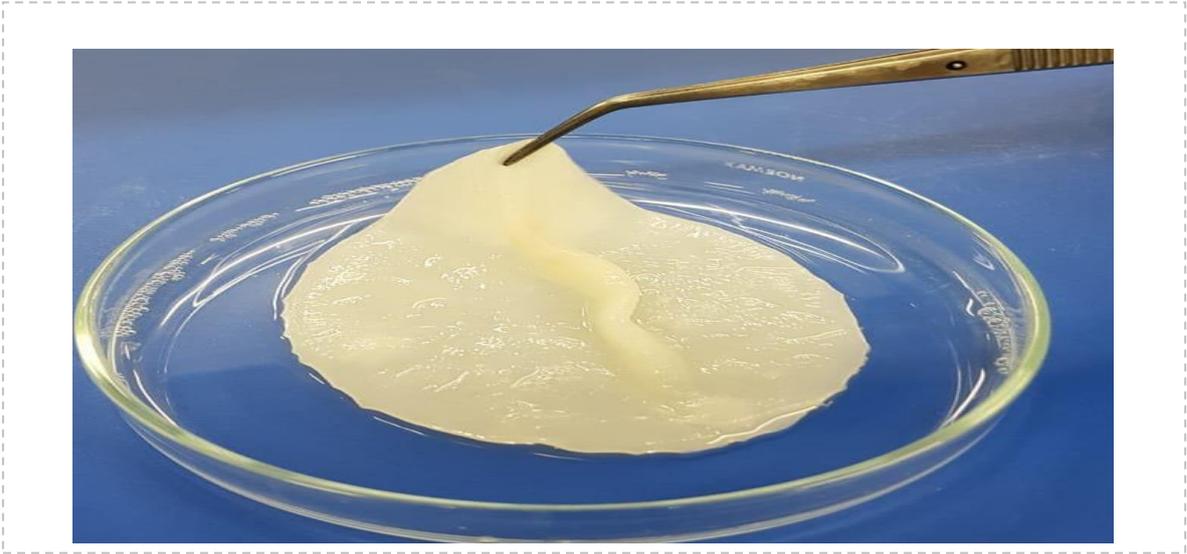


Figura 1

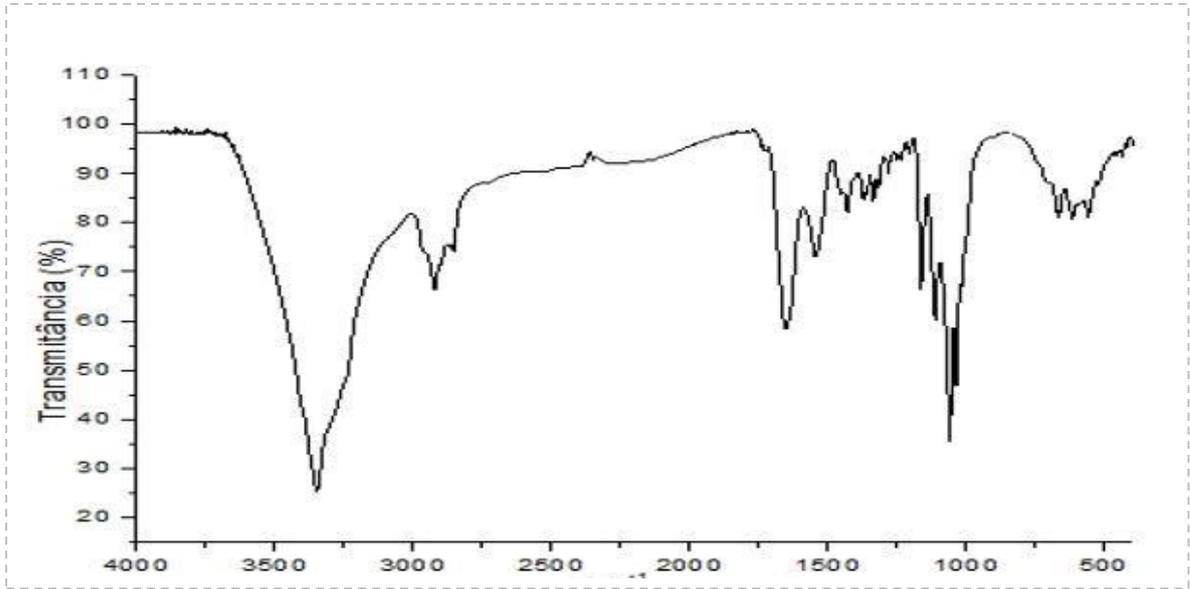


Figura 2

Hestrin-Schram modified medium		Saline Medium	
Component	Conc. (g.L ⁻¹)	Component	Conc. (g.L ⁻¹)
Peptone	5	KH ₂ PO ₄	1
Yeast Extract	5	(NH ₄)H ₂ PO ₄	3
Citric Acid monohydrated	1.15	FeSO ₄	0.2
Disodium phosphate	2.7	MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5
Glycerol	20	Glycerol	20

Figura 3

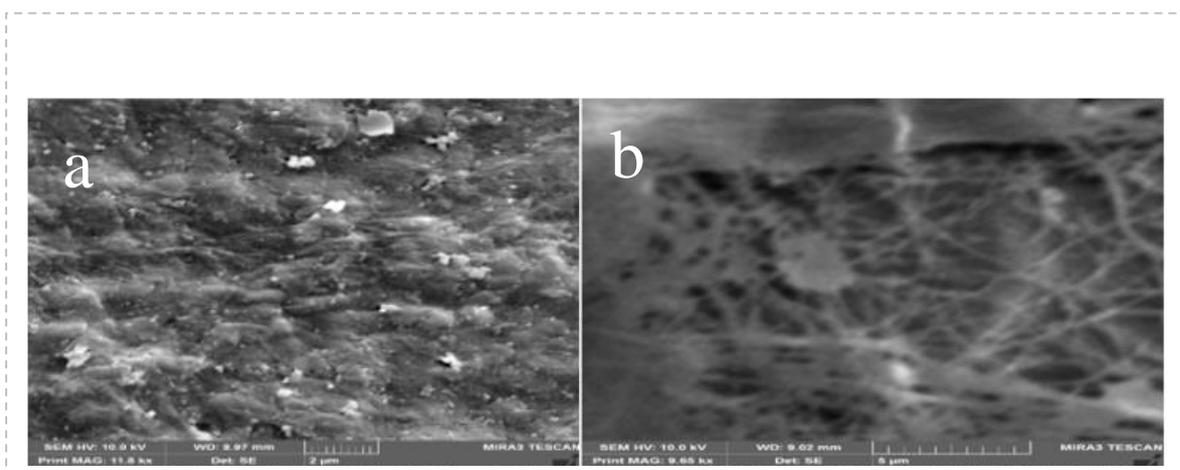


Figura 4

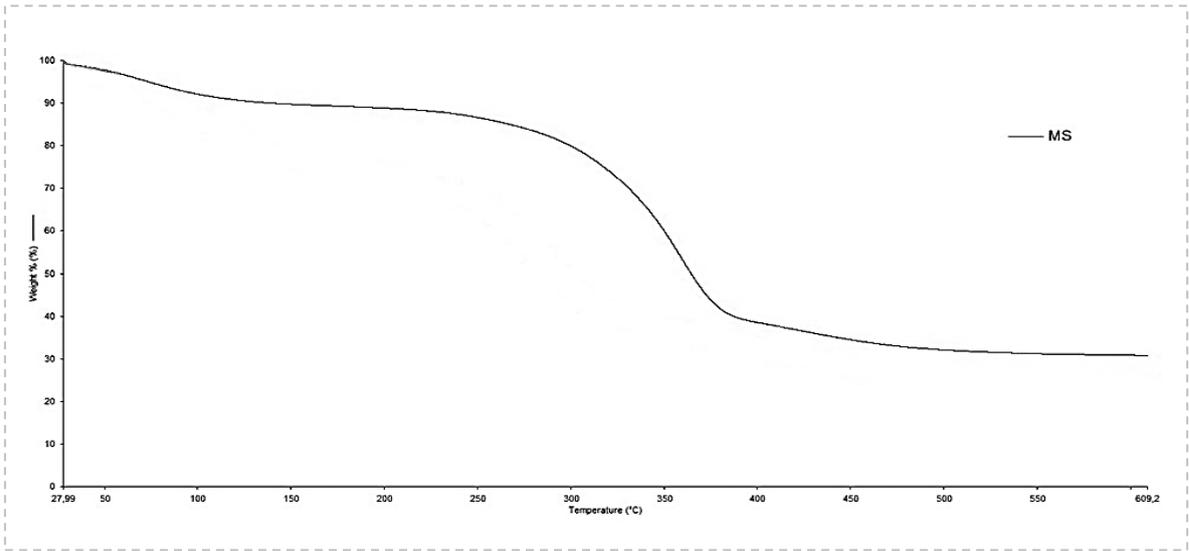


Figura 5

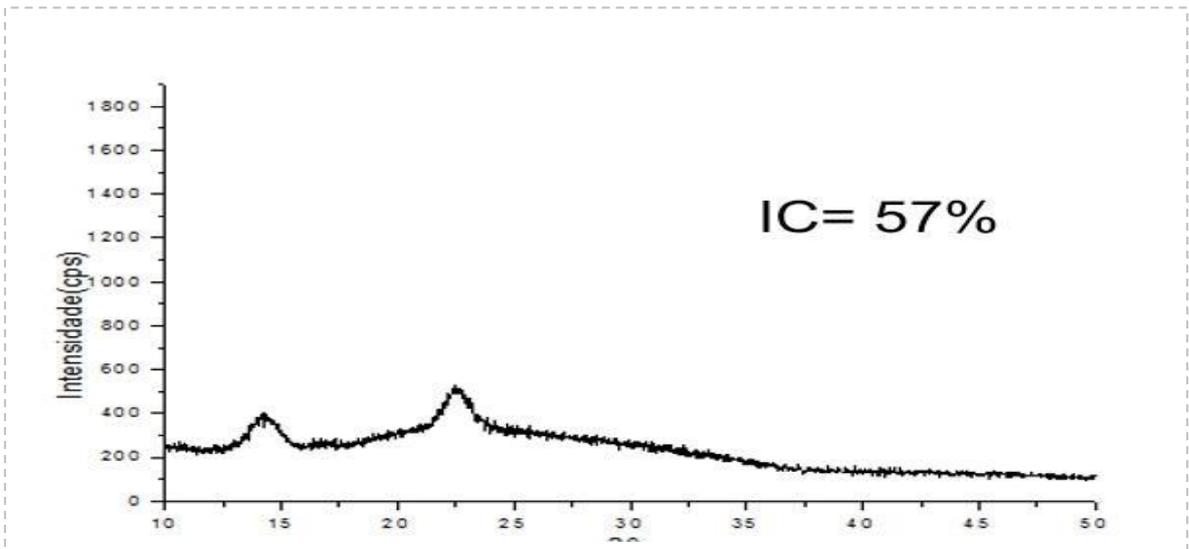


Figura 6

Resumo

MEIO DE CULTURA À BASE DE SAIS E FONTE DE CARBONO SIMPLES PARA PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA E USOS

A presente inovação propõe um meio de cultura de baixo custo e que pode ser uma alternativa versátil para testes bioquímicos em bactérias do gênero *Acetobacter*, bem como a produção de biopolímeros de celulose bacteriana. A formação utilizada para o crescimento da celulose bacteriana por bactérias do gênero *Acetobacter* tem sua composição a base de sais (Di-hidrogenofosfato de amônio, Fosfato dipotássico, Sulfato de magnésio hepta-hidratado, Cloreto de cálcio di-hidratado, Sulfato de ferro II), Açúcar (fonte de carbono) e etanol. Como principais resultados das avaliações de caracterização dos filmes poliméricos, obteve-se um material biotecnologicamente compatível à celulose bacteriana produzida de forma convencional.