

PRODUCTION OF BACTERIAL CELLULOSE USING GLYCEROL AS CARBON SOURCE

Marielle de Oliveira, Letícia de Souza, Ana L. Tavares, Jhenefer Fachini, Giovanni F. Weiss, Geisiely G. Conceição, Letícia Zanata, Derce O.S. Recouvreux, Claudimir A. Carminatti

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina
Departamento de Engenharias da Mobilidade, Centro de Joinville – Joinville – SC
marielledeoliveira@gmail.com; c.carminatti@ufsc.br

Abstract. Bacterial cellulose is a polymeric material with an extensive applicability due to its properties like biodegradability, biocompatibility and high water absorption capacity. Its applicability extends to a wide range of industries, such as food, textile, biomedical, and diverse areas of engineering involving acoustics and optics. The aim of this study was to analyze the bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter hansenii* using glycerol as a carbon source. Assays were performed in static mode for 27 days using glycerol and glucose as carbon source. Results showed that the amount of bacterial cellulose produced after 27 days was higher when using glycerol as a carbon source, yielding $2.33 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ for glycerol and $0.99 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ for glucose. The use of glycerol may reduce the costs production of the bacterial cellulose. This reduction is the result from the increase of the mass amount produced and also due glycerol be a low-cost carbon source. The costs reduction will allow the development of a wide range of applications for bacterial cellulose in several areas of our daily lives.

Palavras-chave: *Biopolymer, Bacterial cellulose, Glycerol.*

1. INTRODUÇÃO

A celulose é um polímero formado por cadeias lineares não ramificadas de moléculas de glicose unidas por ligações do tipo $\beta(1\rightarrow4)$ glicosídicas. A celulose forma a

base estrutural da parede celular de plantas, sendo também produzida por outros organismos como algas, fungos e algumas bactérias (Brown *et al.*, 1976 [1]; Ross *et al.*, 1991 [2]).

A celulose produzida por bactérias possui a mesma estrutura química da celulose produzida por plantas, porém é morfológicamente diferente. Enquanto a celulose sintetizada por plantas necessita de processos de purificação complexos, dispendiosos e altamente poluentes para a extração da lignina e da hemicelulose, o processo de obtenção e de purificação de celulose bacteriana (CB) é bastante simples (Brown *et al.*, 1998 [3]).

O primeiro estudo documentado relacionado à produção de celulose por bactéria foi relatado em 1886 por Adrian Brown [4]. Ele observou um material gelatinoso que se formava na superfície de uma fermentação de vinagre. A análise desse material revelou que se tratava de celulose. A bactéria produtora de celulose foi denominada *Acetobacter xylinum* (Ref. [3]), reclassificada atualmente como *Gluconacetobacter hansenii* (Yamada *et al.*, 1997 [5]). *G. hansenii* é uma bactéria Gram-negativa, estritamente aeróbica, conhecida por produzir celulose na forma de uma película na interface líquido-ar do meio de cultivo, em cultura estática (Dudman, 1960 [6]; Ref. [2]; Watanabe *et al.*, 1998 [7]).

A estrutura da CB consiste em uma rede de nanofibras interligadas por ligações de hidrogênio (Ref. [1]; Ref. [7]; Yamanaka *et*

al., 2000 [8]). Ela possui propriedades físicas e mecânicas únicas, não apresentadas por outros biomateriais, que são apropriadas para a obtenção de novos biomateriais, tais como elevada pureza, uniformidade e biocompatibilidade (Ref. [2]).

Devido as suas características peculiares, a celulose bacteriana abrange um amplo campo de aplicações, como na indústria têxtil, na indústria alimentícia como espessante, em empresas de aparelhos eletroacústicos como diafragma em fones de ouvido (Sony Corporation), para o desenvolvimento de materiais para a fabricação de placas blindadas e em compostos utilizados em coletes à prova de balas, dentre outras. O uso das películas de CB tem sido investigado recentemente em outros procedimentos da área médica, tais como substituto temporário da pele humana, como revestimento de stents, e na neurologia para substituição da dura-máter (Recouvreur *et al.*, 2008 [9]; Ereno, 2004 [10]).

Atualmente, uma variedade de fontes de carbono, tais como glicose, frutose, sacarose, manitol, glicerol, entre outras, têm sido exploradas como substrato para a produção de celulose bacteriana. Um dos grandes problemas em sistemas de produção deste biopolímero tem sido a sua baixa produtividade, tornando seu custo de produção elevado quando se emprega glicose como fonte de carbono.

O glicerol possui uma variedade de aplicações. Ele vem sendo utilizado na indústria química, cosmética, farmacêutica e alimentícia. Embora a produção de glicerol envolva processos de baixa complexidade tecnológica, o seu custo ainda é inviável para várias aplicações (Biodieselbr, 2006 [11]).

O objetivo deste trabalho foi analisar a produção de celulose bacteriana em meio estático pela bactéria *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 23769 utilizando glicerol como fonte de carbono. Os ensaios foram realizados durante 27 dias a temperatura constante de 30°C, sendo a massa de celulose produzida determinada por gravimetria.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

A bactéria *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 23769 foi utilizada neste estudo. O inóculo foi preparado em meio de cultivo contendo 3 g·L⁻¹ de peptona, 5 g·L⁻¹ de extrato de levedura e 25 g·L⁻¹ de manitol, sendo acrescentado 5% (v/v) de inóculo obtido de uma cultura estoque, sendo o mesmo mantido em incubadora a 30°C. A composição do meio de cultivo foi extrato de levedura (5,0 g·L⁻¹), peptona (3,0 g·L⁻¹), e 25 g·L⁻¹ de glicerol ou de glicose.

Os ensaios foram realizados em duplicata, sendo utilizados 14 frascos de Erlenmeyer de 125 ml contendo 36 ml de meio de cultivo, sendo os mesmos previamente esterilizados em autoclave por 20 minutos a 121°C e 1 atm. Aos frascos foram adicionados 10% (4,0 ml) de inóculo contendo *G. hansenii*. Após a inoculação, os frascos de Erlenmeyer foram mantidos em incubadora à 30°C, sendo que dois frascos foram coletados após 7, 11, 15, 19, 23 e 27 dias do início do experimento.

De cada frasco retirado para análise, a película de celulose produzida foi tratada com NaOH 0,1M, sendo os frascos de Erlenmeyer mantidos em estufa a 60°C durante 48 h. Após, a celulose bacteriana foi lavada com água destilada e colocada em refrigeração por 24 h, repetindo o processo até a completa limpeza das membranas. As películas foram então secas em estufa a 50°C, sendo então determinada por gravimetria a massa de celulose bacteriana de cada película.

3. RESULTADOS

O estudo buscou determinar a quantidade de celulose bacteriana produzida ao se utilizar glicerol como fonte de carbono. O glicerol é uma fonte de carbono barata que vem sendo amplamente estudada devido a quantidade produzida como resíduo na obtenção de biodiesel. Os ensaios foram realizados durante 27 dias de forma estática a temperatura constante de 30°C.

Foram utilizados glicose e glicerol puros como fontes de carbono para comparar o rendimento da celulose produzida a partir de glicose frente ao glicerol puro.

A Tabela 1 apresenta os resultados obtidos para a celulose bacteriana produzida (em $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) após os 27 dias de cultivo para as fontes de carbono glicerol e glicose. Já a Figura 1 apresenta as curvas de crescimento da massa do biopolímero considerando-se a média das duplicatas realizadas durante os 27 dias do ensaio.

Tabela 1 – Massa de celulose bacteriana produzida após 27 dias de cultivo utilizando glicerol e glicose como fontes de carbono.

Tempo (dias)	Massa [$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]	
	Glicerol	Glicose
4	0,0150	0,0250
	0,1050	0,0800
7	0,5175	0,3250
	0,2300	0,3475
11	0,8575	0,5075
	0,9775	0,5350
15	1,3225	0,7025
	1,3400	0,6425
19	1,6175	0,6375
	1,5875	0,6475
23	2,0175	0,7875
	2,0825	0,7675
27	2,3200	1,0200
	2,3450	0,9600

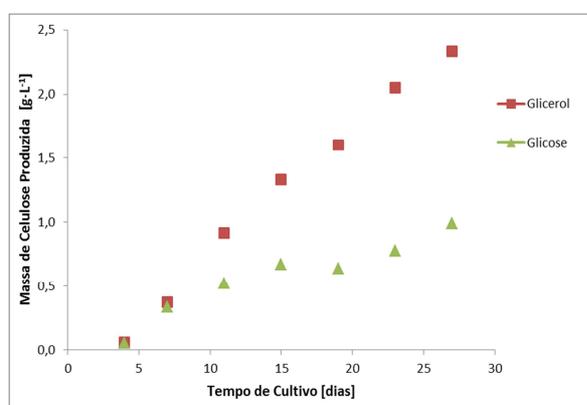


Figura 1 – Produção de celulose bacteriana utilizando glicerol e glicose.

Analisando os resultados, verifica-se que em todos os ensaios ocorreu um aumento na massa de celulose bacteriana com o tempo, sendo que a quantidade produzida foi maior para o glicerol em relação à glicose já a partir de 7 dias de cultivo. Observa-se pela Figura 1 que o rendimento a partir do glicerol é maior do que o obtido utilizando-se glicose como fonte de carbono.

Os valores obtidos para a massa de celulose bacteriana aos 27 dias de cultivo foram de $2,33 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ para o glicerol e $0,99 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ para a glicose, sendo que o valor obtido para o glicerol foi quase 2,5 vezes maior em comparação com os resultados obtidos para a glicose.

Os valores encontrados são comparáveis a resultados citados na literatura para a produção de celulose bacteriana utilizando glicose e glicerol (Keshk & Sameshima, 2005 [12]; Recouvreux *et al.*, 2007 [13]; Adnan *et al.*, 2015 [14]).

O glicerol pode ser considerado uma fonte de carbono com um grande potencial para a produção de celulose bacteriana, devido principalmente ao fato de ser o principal resíduo da produção de biodiesel, o que o torna uma fonte de carbono de baixo custo, diminuindo assim os custos de produção do biopolímero.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados observados para a produção de celulose bacteriana após 27 dias de produção mostraram que o maior rendimento foi obtido utilizando-se glicerol como fonte de carbono, obtendo-se uma quantidade de massa produzida superior ao se utilizar a glicose.

Como o glicerol pode ser considerado uma fonte de carbono de baixo custo, principalmente devido a sua obtenção a partir do biodiesel, a sua utilização poderá diminuir os custos de produção da celulose bacteriana, permitindo o desenvolvimento de novas aplicações para este biopolímero nas mais diversas áreas do nosso cotidiano.

REFERÊNCIAS

- [1] M.R. Brown Jr; J.H.M Willison; C.L. Richardson, “Cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum*: 1. Visualization of the site of synthesis and direct measurement of the in vivo process”. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., vol 73, no. 12, 1976, pp. 4565-4569.
- [2] P. Ross; R. Mayer, M. Benziman, “Cellulose Biosynthesis and Function in Bacteria”, Microbiol. Rev., vol. 55, no. 1, 1991, pp. 35-58.
- [3] M.R. Brown Jr., “Microbial Cellulose: a new resource for wood, paper, textiles, food and specialty products”, disponível em: <www.botany.utexas.edu/facstaff/facpages/mbrown>. Acesso em: 06 set 2015.
- [4] A.J. Brown, “An acetic ferment which forms cellulose”, J. Chem. Soc., vol. 49, 1886, pp. 432-439.
- [5] Y. Yamada; K.-I Hoshino; T. Ishikawa, “The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: the evaluation of the subgenus *Gluconoacetobacter* to the generic level”, Biosci. Biotechnol. Biochem., vol. 61, 1997, pp. 1244-1251.
- [6] W.F. Dudman, “Cellulose production by *Acetobacter* strain in submerged culture”, J. Gen. Microbiol., vol. 22, 1960, pp. 25-29.
- [7] K. Watanabe; M. Tabuchi; Y. Morinaga; F. Yoshinaga, “Structural features and properties of bacterial cellulose produced in agitated culture”, Cellulose, vol. 5, 1998, pp. 187-200.
- [8] S. Yamanaka; M. Ishihara; J. Sugiyama, “Structural modification of bacterial cellulose”, Cellulose, vol. 7, 2000, pp. 213-225.
- [9] D.O.S. Recouvreux, “Desenvolvimento de Novos Biomateriais Baseados em Celulose Bacteriana para Aplicações Biomédicas e de Engenharia de Tecidos”, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 2008, 145 p.
- [10] D. Ereno, “Celulose na pele. Bactéria produz substância usada para tratar queimaduras e no revestimento de coletes à prova de balas”, disponível em: www.revistapesquisa.fapesp.br, acesso em: 27 set 2013.
- [11] Biodieselbr. “Glicerina - Sub-produto do biodiesel”, disponível em: <www.biodieselbr.com/biodiesel/glicerina/biodiesel-glicerina.htm>, acesso em: 11 fev 2016.
- [12] S.M.A. Keshk; K. Sameshima, “Evaluation of different carbon sources for bacterial cellulose production”, Afr. J. Biotechnol., v. 4, 2005, pp. 478-482.
- [13] D.O.S. Recouvreux; C.A. Carminatti; A. Cruz Jr.; R.V. Antônio; L.M. Porto, “Produção de Celulose Bacteriana por *Gluconoacetobacter xylinus* ATCC 23769 a Partir de Resíduo do Biodiesel”, in Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2007.
- [14] A. Adnan; G.R. Nair; M.C. Lay; J.E. Swan; R. Umar, “Glycerol as a cheaper carbon source in bacterial cellulose (bc) production by *Gluconoacetobacter xylinus* Dsm46604 in batch fermentation system”, Malaysian J. Anal. Sc., v. 19, 2015, pp. 1131-1136.