



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

LARISSA FERNANDES MONTEIRO

CO-CULTURAS E SEUS IMPACTOS SOBRE BIOSÍNTESE
DE CELULOSE POR *KOMAGATAEIBACTER*

CAMPINAS

2025

LARISSA FERNANDES MONTEIRO

**CO-CULTURAS E SEUS IMPACTOS SOBRE BIOSÍNTESE DE
CELULOSE POR *KOMAGATAEIBACTER***

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do Título de
Mestra em Genética e Biologia Molecular,
na área de Genética de Microorganismos.*

Orientador: PROFA. DRA. ELIZABETH BILSLAND

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA
PELA ALUNA LARISSA FERNANDES
MONTEIRO E ORIENTADA PELA PROFA. DRA.
ELIZABETH BILSLAND.

CAMPINAS

2025

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

M764c Monteiro, Larissa Fernandes, 1998-
Co-culturas e seus impactos sobre biossíntese de celulose por *Komagataeibacter* / Larissa Fernandes Monteiro. – Campinas, SP : [s.n.], 2025.

Orientador: Elizabeth Bilsland.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Instituto de Biologia.

1. Técnicas de cocultura. 2. Celulose. 3. Chá de Kombucha. 4. Biopolímeros. 5. Bioprospecção. I. Bilsland, Elizabeth, 1973-. II. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Instituto de Biologia. III. Título.

Informações complementares

Título em outro idioma: Co-cultures and their impacts on cellulose biosynthesis by *Komagataeibacter*

Palavras-chave em inglês:

Coculture techniques

Cellulose

Kombucha tea

Biopolymers

Bioprospecting

Área de concentração: Genética de Microorganismos

Titulação: Mestra em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Elizabeth Bilsland [Orientador]

Soledad Palameta

Rogério Ferreira Lourenço

Data de defesa: 31-01-2025

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS)

Não se aplica

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-0798-7074>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/9622410523603135>

BANCA DA APROVAÇÃO

Profa. Dra. Elizabeth Bisland

Profa. Dra. Soledad Palameta

Prof. Dr. Rogério Ferreira Lourenço

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de **Dissertação** e na Secretaria do Programa **de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular** do **Instituto de Biologia**.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais,
que debaixo do Sol me fizeram
chegar até aqui na sombra.

AGRADECIMENTOS

Este projeto nasceu de uma iniciativa cuidadosamente confeccionada e bordada por muitas mãos. Dito isso, meus primeiros agradecimentos vão ao meu time, iGEM UNICAMP Brazil 2022, composto por diversos rostos amigos. Em especial, às minhas duas almas gêmeas, Michele Geirmar e Brena Amorim, por sempre me apoiarem e me fortalecerem nos momentos mais desafiadores.

Aos amigos do Laboratório de Doenças Tropicais, tanto os que passaram quanto os que ficaram, meu muito obrigada pelas conversas, risadas e momentos compartilhados, sejam de alegria ou de aprendizado.

À Professora Dra. Elizabeth Bilsland, expresso meus mais profundos agradecimentos. Sua trajetória é uma inspiração para mim: como mulher, mãe, defensora incansável dos animais – especialmente os que ronronam –, como uma força motriz, entusiasta da ciência e pesquisadora exemplar. Tenho imenso orgulho de ter sido orientada, moldada e incentivada por uma professora tão extraordinária.

Agradeço à minha família, em especial aos meus pais, que desde cedo me ensinaram a coexistir e admirar a natureza, plantando em mim a semente do interesse pela ciência. Sua dedicação e amor foram fundamentais para cada etapa da minha trajetória.

Ao meu noivo, Renan de Faria, que compartilhou comigo cada passo desta jornada: sofrendo, rindo, se empolgando, me apoiando, e, acima de tudo, nunca permitiu que eu duvidasse da minha própria capacidade ao longo desses anos. Muito obrigada por ser esse suporte que torna toda a loucura da minha vida possível.

Por fim, agradeço à Pró-Reitoria de Extensão e Cultura (PROEC) pelo apoio financeiro a este projeto, que foi essencial para torná-lo realidade. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

A celulose, um polímero natural presente na estrutura das paredes celulares de plantas, é formada por uma cadeia complexa de glicose. Intimamente associados à celulose vegetal, as plantas produzem também polímeros como pectina, hemicelulose e lignina, o que dificultam a obtenção de celulose pura. Uma alternativa à celulose vegetal é a celulose bacteriana (CB), que tem a mesma estrutura química, mas é livre dos demais polímeros. Devido ao elevado grau de pureza, a CB pode ter aplicações na área da saúde, como em tratamento de queimaduras, *scaffold* para crescimento celular, além da área de alimentos, combustível e outras. No entanto, a produção em larga escala de CB ainda é inviável devido ao baixo rendimento e ao alto custo da produção. O objetivo deste trabalho foi prospectar novas cepas bacterianas produtoras de celulose e analisar os impactos de cepas fúngicas como agentes reguladores da produção de CB. Isolamos as *Komagataeibacter* sp. *LaBS_1* e *LaBS_3* e comparamos as suas capacidades produtivas à cepa *Komagataeibacter xylinus*. Também isolamos a levedura *LaBS_2* e observamos que seu co-cultivo com *LaBS1*, *LaBS3* e *K. xylinus* levaram a um aumento de 131,88%, 139,39% e 131,66% na produção de CB, respectivamente, em comparação às monoculturas. Isso destaca o potencial dos estudos sobre a sinergia presente nas interações microbianas em estado de co-cultivo para a otimização da síntese de celulose.

Palavras chaves: Co-cultivos, Celulose bacteriana, Kombucha, biopolímeros, bioprospecção.

ABSTRACT

Cellulose, a natural polymer present in the structure of plant cell walls, is formed by a complex chain of sugars, including glucose. Closely associated with cellulose, plants also contain polymers such as pectin, hemicellulose and lignin, which make the isolation of pure cellulose difficult. An alternative to vegetable cellulose is bacterial cellulose (BC), which has the same chemical structure, but is free of other polymers. Due to the high degree of purity, BC can have applications in the health sector, such as in the treatment of burns, scaffolding for cell growth, in addition to the areas of food, fuel and others. However, large-scale production of BC is still unfeasible due to low yield and high production cost. The objective of this work was to prospect for new cellulose-producing bacterial strains and analyze the impacts of fungal strains as regulatory agents for BC production. We isolated *Komagataeibacter* sp. LaBS_1 and LaBS_3 and compared their productive capabilities to the *Komagataeibacter xylinus*. We also isolated the yeast LaBS_2 and observed that its co-cultivation with LaBS1, LaBS3 and *K. xylinus* led to an increase of 131.88%, 139.39% and 131.66% in BC production, respectively, compared to monocultures. This highlights the potential of studies on the synergy present in microbial interactions in a co-cultivation state for optimizing cellulose synthesis.

Keywords: Co-cultivation, Bacterial cellulose, Kombucha, Biopolymers, Bioprospecting.

EPIGRAFE

“Pass on what you have learned. Strength.
Mastery. But weakness, folly, failure also.
Yes, failure most of all. The greatest
teacher, failure is”.

Mestre Yoda, Star Wars: The Last Jedi
(2017)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Celulose	13
1.2. Celulose bacteriana	14
1.3. Propriedades estruturais da celulose bacteriana	15
1.4. Gênero <i>Komagataeibacter</i>	18
1.5. Produtividade de celulose bacteriana	22
1.6. Desafios econômicos na utilização da celulose bacteriana.....	25
1.7. Co-cultivo para otimização da produção de celulose bacteriana.....	27
2. OBJETIVOS	29
2.1. Objetivo geral.....	29
2.2. Objetivos específicos	29
3. MÉTODOS E DESIGN	30
3.1. Coleta de amostras.....	30
3.1.1. Meio de cultivo	30
3.1.2. Coleta de amostras de Chá de Kombucha	30
3.1.3. Isolamento de bactérias produtoras de celulose	30
3.2. Extração do DNA genômico	31
3.3. Amplificação e purificação do gene 16S.....	31
3.4. Sequenciamento de Sanger	32
3.5. Testes de co-cultivos	33
3.6. Secagem e quantificação das mantas de celulose	34
3.7. Caracterização das propriedades físico-químicas	34
3.8. Caracterização das propriedades mecânicas.....	35
4. RESULTADOS	36
4.1. Isolamento e caracterização dos microrganismos	36
4.1.1. Análise por microscopia óptica	36
4.1.2. Características das colônias em placas de cultura	36
4.1.3. Confirmação da produção de celulose pelas cepas isoladas	37
4.2. Amplificação da região codificadora por Rna 16s.....	38
4.3. Genotipagem das cepas isoladas	38
4.4. Produção de celulose bacteriana	39
4.4.1. Monocultivos	39
4.4.2. Co-cultivos	42

4.5.	Caracterização das propriedades físico-químicas da celulose bacteriana	44
4.6.	Caracterização das propriedades mecânicas da celulose bacteriana	45
5.	CONCLUSÃO	47
6.	PRÓXIMOS PASSOS	48
7.	REFERÊNCIAS	49

ANEXOS

ANEXO A - Declaração de direitos autorais	57
ANEXO B - Declarações referentes a bioética e/ou biossegurança	58
ANEXO C - Declarações referentes a bioética e/ou biossegurança	59

1. INTRODUÇÃO

1.1. Celulose

Em 1839 o termo “celulose” foi citado pela primeira vez pelo químico francês Anselme Payen, ao descrever uma estrutura sólida e fibrosa com uma cadeia complexa de açúcares (glicose) presente na parede vegetal (MARCHESSAULT; SUNDARARAJAN, 1983). Anselme definiu a fórmula química da celulose como $C_6H_{10}O_5$ como ilustrado na Figura 1.

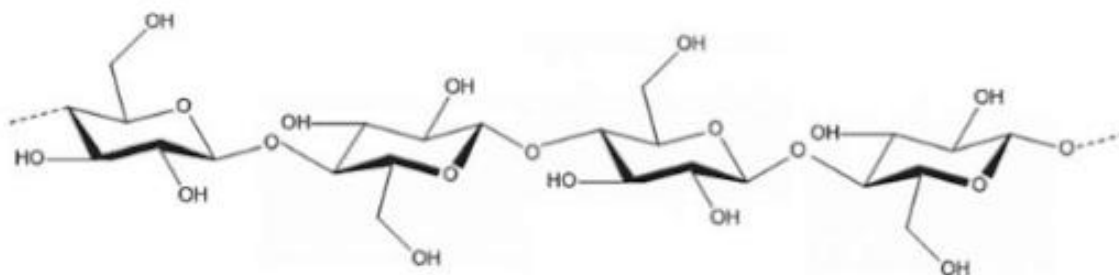


Figura 1: Estrutura da celulose. Fonte: Ruka, D., Simon, G. & Dean, K., (2014).

A celulose é utilizada pela humanidade há milênios, sendo um exemplo a invenção do papel, datada em 105 d.C. em Pequim, em que ao observar vespas construindo seus ninhos com uma massa à base de celulose, o oficial da corte T'sai Lun mimetizou este processo para produzir a primeira folha de papel descrita (LANDIM FRITOLI; KRÜGER; KÜSTER DE PAULA CARVALHO, 2016).

Na parede vegetal, a celulose vegetal (CV) está intimamente emaranhada por outros componentes, como a pectina, lignina e hemicelulose formando uma estrutura complexa (MAKOTO SHODA; YASUSHI SUGANO, 2005). A hemicelulose é responsável por dar suporte estrutural à parede celular, contribuindo para a resistência e flexibilidade das células vegetais, enquanto a lignina dá suporte estrutural e também atua como uma barreira protetora, dificultando a penetração de patógeno e pragas por impedir a ação de enzimas celulolíticas (XIMENES et al., 2011).

Com isso, este conjunto complexo de elementos dificulta o processo de extração da celulose, sendo necessária a aplicação de tratamentos químicos e físicos para obtenção de sua forma purificada (HASUNUMA; KONDO, 2012).

1.2. Celulose bacteriana

Além das plantas, algumas bactérias também realizam a biossíntese de celulose. A celulose bacteriana (CB) apresenta a mesma fórmula química que a CV, no entanto, as bactérias secretam celulose pura, sem a presença de hemicelulose, pectina e lignina. Desta forma, as etapas de extração da celulose se tornam menos complexas em comparação com a CV, uma vez que passos necessários para sua purificação são mínimos (DE WULF; JORIS; VANDAMME, 1996).

As pesquisas para aprimorar e descobrir novas aplicações para CB têm se intensificado. Na área da saúde, sua biocompatibilidade e alta pureza a tornam uma excelente proposta para atuação na biomedicina e biotecnologia (DAHMAN, 2009). A medicina regenerativa tem apostado na CB na recuperação e cicatrização acelerada das lesões, devido ao aumento da adesão celular, à proliferação e diferenciação celular na pele machucada (SHPICHKA et al., 2019). Um estudo aponta que os curativos de CB quando aplicados em pacientes com ulcerações ocasionadas por doenças venosas crônicas, apresentaram redução na margem dos ferimentos, facilitando a restauração das camadas dérmicas, sem provocar efeitos deletérios na região (CAVALCANTI et al., 2017).

As membranas de celulose podem ser associadas a diferentes compostos devido à sua alta capacidade reter líquidos por imersão, melhorando assim a eficácia em tratamentos de machucados. Foi demonstrado que a associação da quitosana com a CB acelerou a regeneração de feridas cutâneas em modelos animais, em comparação ao uso da celulose bacteriana isoladamente (LIN et al., 2013).

Entretanto, a CB não se restringe apenas ao tratamento de lesões na pele. Estudos relatam que a celulose bacteriana em casos de procedimentos de duroplastia pode atuar como substituta da dura-máter, membrana mais externa que reveste o encéfalo e a medula espinhal (LIMA et al., 2017). Além disso, a celulose bacteriana foi apontada como potencial para ser utilizada como uma malha fibrosa para prevenir a recorrência de fechamento de artérias durante procedimentos de desobstrução vascular (BUENO et al., 2009).

Na indústria alimentícia o seu uso mais conhecido é como matéria prima da nata de coco, sobremesa muito popular na Ásia (IGUCHI; YAMANAKA;

BUDHIONO, 2000). A confecção de filmes para embalagens alimentícias e o uso como agente espessante utilizado na emulsão de preparos são outras formas de aplicações na área (ATTA et al., 2022a, 2022b; CHO; ALMEIDA, 2012). Esses diversos exemplos ilustram apenas uma pequena parcela das aplicações possíveis para a CB. Seu uso é possível em diversas outras áreas, como podemos observar na Figura 2.

Aplicações para Celulose Bacteriana

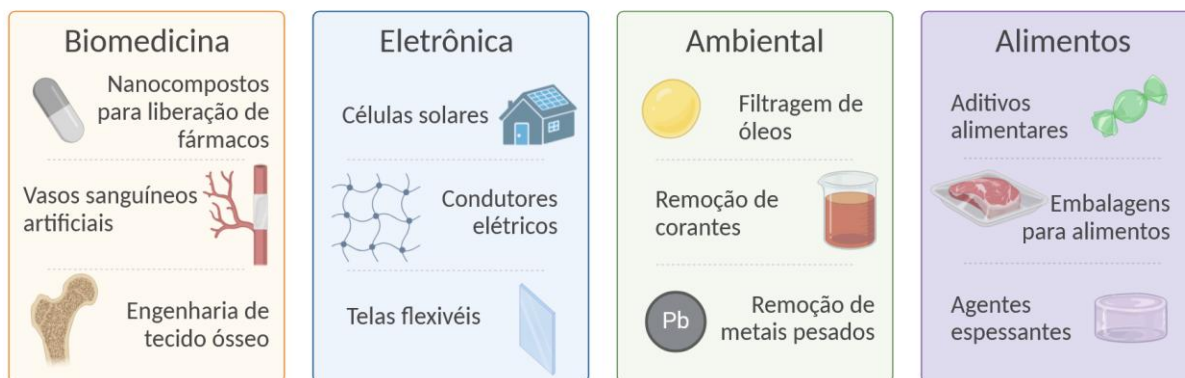


Figura 2: Aplicações da celulose bacteriana em diversas áreas.

Fonte: Adaptado de El-Gendi, H et al., (2022).

Os exemplos citados representam apenas uma fração das inúmeras possibilidades que o dinamismo e as características únicas deste biopolímero oferecem para aplicações inovadoras. Suas propriedades versáteis e ajustáveis abrem caminho para avanços em diversos setores, mostrando que o potencial da celulose bacteriana está longe de ser totalmente explorado.

1.3. Propriedades Estruturais da Celulose Bacteriana

A CB apresenta diversas características estruturais, químicas e funcionais específicas, entre as quais podemos citar a estabilidade térmica, alta resistência, flexibilidade, alto grau de polimerização, alta capacidade de retenção de água e ausência de citotoxicidade, o que a torna viável e aplicável em diversas áreas, como demonstrado anteriormente (CACICEDO et al., 2016; KESHK, 2014; RUKA; SIMON; DEAN, 2014; SWINGLER et al., 2021; WANG et al., 2017).

As malhas tridimensionais do biopolímero se devem ao acúmulo de grandes quantidades de água em meio as fibras de celulose. As interações dos grupos hidroxila com as moléculas de água, faz com que a celulose seja depositada em

forma de hidrogel na superfície do meio de cultura, como esquematizado na Figura 3 (CHEN et al., 2018).

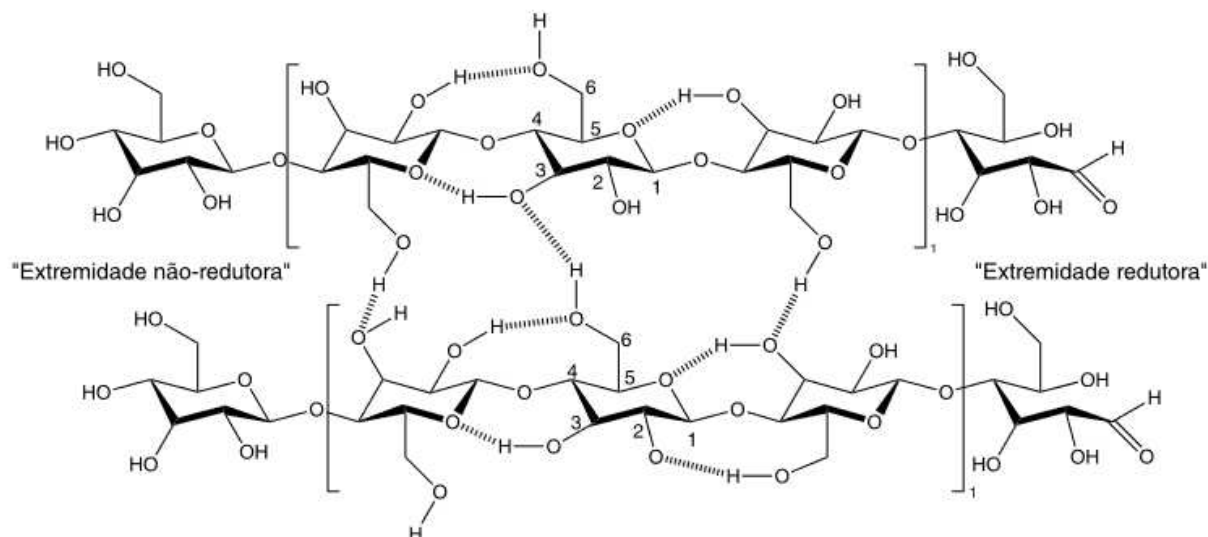


Figura 3: Diagrama do arranjo molecular da cadeia polimérica de celulose, ilustrando suas interações inter e intramoleculares, além das possíveis terminações na estrutura da cadeia. Fonte: Evaristo et al., (2023) e Trache et al., (2017).

Ademais, essa interação, em conjunto com a porosidade das mantas, é responsável por conferir ao hidrogel uma morfologia viscoelástica e poroelástica característica (LOPEZ-SANCHEZ et al., 2014). A película de celulose recém sintetizada, assim que retirada da superfície do compartimento de fermentação, contém cerca de 97-99% do seu peso em água (MANEERUNG; TOKURA; RUJIRAVANIT, 2008). Por conta dessas características, a CB tem sido utilizada em uma ampla gama de produtos, mas principalmente nas áreas da indústria alimentícia e biomédica (ULLAH; SANTOS; KHAN, 2016). Esse fenômeno, reflete diretamente nas propriedades mecânicas dos filmes sintetizados, como alto grau de extensibilidade, flexibilidade e retenção de água (KESHK; SAMESHIMA, 2006).

As mantas de celulose produzidas por distintas cepas do gênero *Komagataeibacter* exibem uma variedade de propriedades mecânicas, incluindo aspectos como elasticidade, rigidez, viscoelasticidade, porosidade e permeabilidade, de modo que esses atributos podem ser influenciados tanto pela concentração de celulose quanto pela organização da rede fibrilar (CHEN et al., 2018).

Um trabalho realizado por Tsouko (2015) buscou analisar se existe uma diferença nas características das membranas de celulose, com uma mudança dos meios de cultivos convencionais para outras fontes de substrato, como resíduos agroindustriais. Os resíduos escolhidos foram os subprodutos das indústrias de biodiesel e de confeitaria, a farinha de girassol e um resíduo rico em farinha de trigo, respectivamente. Nesse trabalho, foram analisados não só os rendimentos da produção, mas as propriedades mecânicas das mantas produzidas em diferentes meios. Os autores avaliaram parâmetros como a retenção de água, módulo de flexibilidade ou módulo de Young, estresse na ruptura e grau de polimerização, concluindo que os valores dessas propriedades permanecem similares aos valores obtidos em cultivo com meios convencionais. Entretanto, quando mantas foram analisadas utilizando um Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), as fibras presentes nas mantas demonstravam diferentes padrões de sentido e espessuras, conferindo alterações morfológicas dependentes do meio de cultivo, sem alterar drasticamente as propriedades mecânicas. Isso realça a importância de associar diferentes técnicas de análise para avaliar a qualidade e estrutura das membranas.

A celulose bacteriana apresenta inúmeras semelhanças com a celulose vegetal, entretanto, contém diferenças características, como alta capacidade de absorção e retenção de água, força de tensão, durabilidade, elasticidade e alta cristalinidade (SERAFICA; MORMINO; BUNGAY, 2002). Outro ponto diferencial entre os polímeros, revelou-se por meio do MEV, sendo a divergência entre os diâmetros das fibras de celulose, em que a CB apresenta um diâmetro cem vezes menor (1/100) que a CV (SUTHERLAND, 1998), como podemos observar na Figura 4.

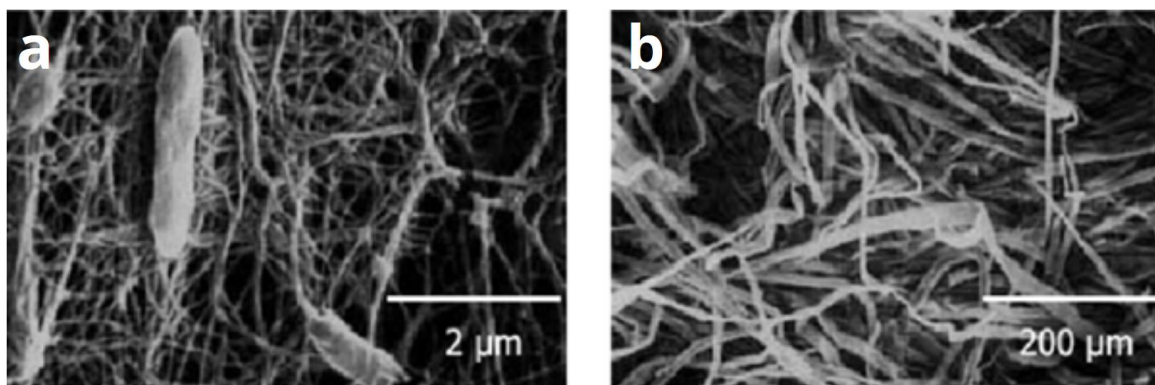


Figura 4: Imagens de microscopia eletrônica de varredura. **a)** Celulose bacteriana (x 20.000); **b)** Celulose Vegetal (x 200).

Fonte: Sutherland, (1998).

Com base nessa dinâmica, estudos que investiguem a resposta das fibras a diferentes condições de cultivo e o impacto nas suas propriedades mecânicas, físico-químicas e disposição espacial, tornam-se essenciais para vislumbrar suas aplicações.

1.4. Gênero *Komagataeibacter*

As bactérias responsáveis pela síntese de celulose pertencem à ordem *Rhodospirillales* e família *Acetobacteraceae*, que contém 32 gêneros (HUANG et al., 2014). Desses podemos citar os gêneros *Acetobacter*, *Aerobacter*, *Agrobacterium*, e em destaque o gênero *Komagataeibacter* (HASSAN et al., 2015; YAMADA et al., 2012). Vale a pena ressaltar que, este gênero passou por alterações na nomenclatura, anteriormente sendo conhecido como *Gluconacetobacter* (YAMADA et al., 2012). Através da fermentação acética as acetobactérias são capazes de oxidar álcool etílico (etanol) em ácido acético, com isso são consideradas oxidantes obrigatórias por necessitarem de oxigênio para realizar a conversão (HUANG et al., 2014).

Bactérias do gênero *Komagataeibacter* são gram-negativas, medem cerca de 0,5-0,8x1,0-3,0 µm, não apresentam estruturas para movimentação da célula e crescem em formas de colônias brancas cremosas (GOPU; GOVINDAN, 2018). Essas bactérias podem ser encontradas em diversas fontes como frutas estragadas (ex: romã e uvas). No entanto, o destaque está no chá de Kombucha, uma bebida fermentada que contém o *Scoby*, que consiste em uma membrana de celulose bacteriana contendo leveduras e bactérias responsáveis por

fermentar a bebida a base de chá verde ou preto e açúcar, que existem vários estudos relatando os seus benefícios à saúde (OHAD; DANON; HESTRIN, 1962; THORAT; DASTAGER, 2018; WANG et al., 2022).

O entendimento de como ocorre a biossíntese e deposição da celulose bacteriana tem sido alvo de estudos há muito tempo. Como organismo modelo de estudo desse grupo, podemos citar a espécie *Komagataeibacter xylinus* devido à capacidade de sintetizar celulose em grande quantidade (KEISKI et al., 2010).

A síntese de celulose ocorre na porção citoplasmática da membrana interna, de modo que o crescimento da cadeia dos polissacarídeos está intimamente coordenada com a exportação dessas cadeias em formação para o lado externo da célula. (RÖMLING; GALPERIN, 2015).

O óperon *bcs* (*bacterial cellulose synthesis*) é responsável por codificar o complexo proteico produtor de celulose. O óperon *bcs* possui 4 genes centrais, que são: *bcsA*, *bcsB*, *bcsC* e *bcsD* (MORGAN; STRUMILLO; ZIMMER, 2013).

A enzima produtora de celulose, celulose sintase, é codificada por *bcsA*, que utiliza a molécula ativa UDP-glicose (Uridina-difosfato-glicose) para sintetizar o biopolímero (SHI et al., 2014). A grande proteína periplasmática que é ancorada na membrana interna, responsável por guiar o polímero recém sintetizado até a membrana externa, é codificada pelo gene *bcsB* (OMADJELA et al., 2013). Estudos indicam que a funcionalidade das 4 subunidades é necessária para atingir a síntese máxima *in vivo*, sendo que *bcsC* e *bcsD* estão relacionadas a cristalização e o transporte das fibrilas de celulose para o meio extracelular (WONG et al., 1990).

O óperon de *bcs* da cepa *K. xylinus* apresenta outros 3 genes conhecidos, sendo eles *bcsZ*, *bglX* e *bcsH*. Os produtos de *bcsZ* e *bglX* são apontados como enzimas responsáveis pela hidrólise, ao invés de síntese de β -D-glucanos, todavia, suas funções ainda não foram plenamente elucidadas (RÖMLING; GALPERIN, 2015). O gene *bcsH* codifica um componente essencial para a síntese de celulose, atuando na regulação da expressão de *bcsB* e *bcsC* (STANDAL et al., 1994).

O óperon apresenta uma variedade de genes a depender da espécie em que pertencem. Em alguns casos, existem diferenças dentro da mesma espécie, como por exemplo algumas cepas da espécie *K. xylinus* contêm um segundo óperon de *bcs*, que codifica uma única proteína oriunda da junção *bcsAB*, além

de dois genes extras, *bcsX* e *bcsY* (UMEDA *et al.*, 1999). Essa abundante diversidade, fez com que os pesquisadores Römmling e Galperin (2015), sugerissem uma classificação para juntar as variantes dos óperons em 3 grupos que foram divididos de acordo com a disposição e a quantidade de componentes nos lócus, como demonstrado na Figura 5.

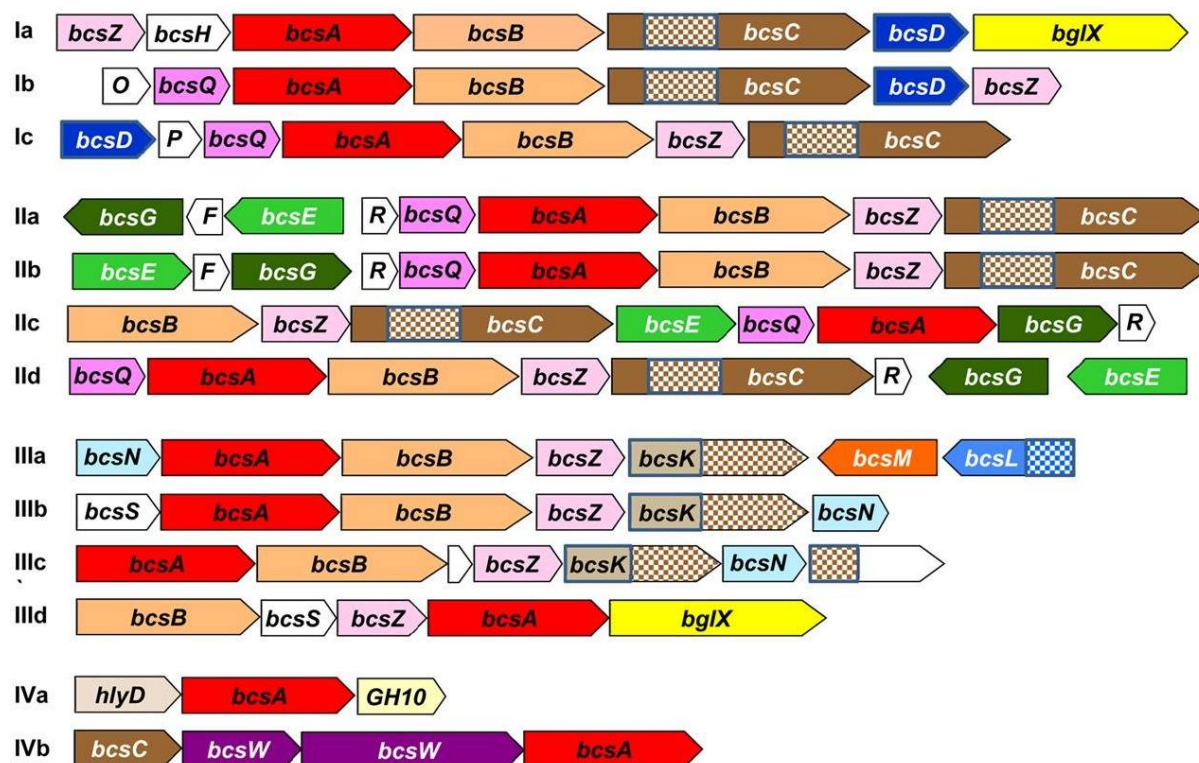


Figura 5: Diversidade dos óperons de celulose (*bcs*). Os genes são representados em escala aproximada, representando a posição dos lócus dos genes do óperon *bcs* em diferentes espécies. Os elementos marcados em branco, têm funções desconhecidas. Os espaços quadriculados marcam domínios de repetições tetratricopeptíde (TPR).

Os óperons exibidos são: **Ia)** *Komagataeibacter xylinus* E25, **Ib)** *Dickeya dadantii* Ech703, **Ic)** *Burkholderia phymatum* STM815, **IIb)** *Pseudomonas putida* KT2440, **IIc)** *Burkholderia mallei* ATCC 23344, **IId)** *Chromobacterium violaceum* ATCC, **IIIb)** *Methylobacterium extorquens*, **IIId)** *Azospirillum lipoferum* 4B, **IIId)** *Acidiphilium cryptum* JF-5 e **IVb)** *Nostoc* sp. PCC 7120.

Fonte: Römmling; Galperin, (2015).

Os esforços na área de engenharia genética de bactérias se concentram atualmente na construção de cepas que produzem celulose bacteriana a nível industrial, de forma a suprir demandas atuais e futuras do polímero.

Pesquisadores desenvolveram vetores contendo sistema genético responsável pela biossíntese de celulose bacteriana e os inseriram em três diferentes cepas de *Escherichia coli* (BULDUM; BISMARCK; MANTALARIS, 2018). Utilizando estratégias como a otimização de temperatura e a concentração

de um indutor químico para ativar a expressão dos genes, o estudo alcançou a biossíntese recombinante de celulose bacteriana em plataformas de *E. coli* pela co-expressão de *bcsABCD* e seu óperon *upstream*, além de produzir fibras do polímero mais longas, quando comparadas as produzidas por *Komagataeibacter hansenii*.

Outro recurso, recentemente empregado na otimização da produção de CB, é o uso de sítios de ligação a ribossomos sintéticos (*RBS*) para a regulação dos sistemas de expressão genética. Estudiosos desenvolveram uma biblioteca de *RBSs* com diferentes níveis de força, e otimizaram a expressão de três genes chave na produção de CB (*pgm*, *galU* e *ndp*), resultando em aumentos significativos na produção, alcançando valores finais de 5,28 g/L sob condições estáticas e 3,67 g/L em condições agitadas em *K. xylinus* (HUR et al., 2020). Esses resultados exaltam a modulação do fluxo metabólico por meio da expressão genética, como uma estratégia eficaz para aumentar a produtividade de CB.

A análise genômica contribui significativamente para a compreensão das condições ideais e dos nutrientes que maximizam a produção de CB, ao elucidar os genes e vias metabólicas envolvidas na confecção desse polímero. Durante o isolamento, classificação e análise do genoma completo de uma cepa *Komagataeibacter sp. nov. O CGMCC 17276*, os cientistas justificaram o seu alto rendimento em partes se relaciona a presença de quatro óperons de síntese de CB (LU et al., 2020). Partindo desta descoberta, o glicerol residual foi bem sucedido sendo aplicado como fonte de carbono, apresentando-se como uma possível estratégia economicamente viável para a produção de CB.

A *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 5358 e posteriormente, denominada como *Komagataeibacter hansenii* ATCC 53582, é bastante empregada como organismo modelo para estudo. Sendo que em 2016, foram descobertos, além do óperon principal, outros dois óperons de celulose sintase adicionais no seu genoma, e em contraste com o estudo anterior, os autores apontam que possivelmente a quantidade de cópias de óperons não sejam os responsáveis pela alta produtividade, mas sim, as variações nos níveis de expressão gênica e o metabolismo da glicose, sendo esses aspectos que mais impactam na produção (FLOREA et al., 2016).

Existem na literatura diversos estudos que utilizam métodos de edição genética em cepas produtoras de celulose e cepas não produtoras, sendo que as bactérias naturalmente não produtoras, como a *E.coli*, têm se mostrado uma excelente plataforma para engenharia visando de produção, devido ao seu crescimento rápido e metabolismo bem caracterizado. Isso abre uma ampla gama de possibilidades, não só para melhorar os rendimentos de produção, mas também para modificar as estruturas das nanofibras e associar novas propriedades ao produto final.

1.5. Produtividade de Celulose Bacteriana

Através da modelagem matemática e utilizando o modelo metabólico de *K. xylinus*, o time iGEM-UNICAMP 2022 apresentou uma correlação negativa entre a taxa de crescimento bacteriano e a produção de celulose (Unicamp_Brazil - iGEM, 2022). Ao entrar na célula, a glicose pode ser utilizada em uma cascata de reações pela via das pentoses, seguindo o Ciclo de Krebs para a geração de energia em forma de ATP (adenosina trifosfato). Alternativamente, para a produção de CB, a glicose passa apenas pela primeira conversão dessa rota. Primeiramente, é transformada em glicose-6-fosfato e, em seguida, em glicose-1-fosfato pela ação da enzima fosfatase. A partir daí, inicia-se a cascata de síntese do polímero pela célula. Sendo um fator importante a ser explorado para aprimorar estratégias que visem amenizar esse conflito negativo tanto sobre a produção do biopolímero e o crescimento celular.

Durante o desenvolvimento do Projeto *Cellulopolis*, o time também indicou formas de calcular o rendimento de celulose na cultura, sendo os coeficientes Y_{xs} , Y_{ps} e Y_{px} , que indicam o coeficiente de conversão substrato-biomassa, coeficiente de conversão substrato-celulose e coeficiente de celulose gerado para cada g de biomassa, respectivamente. Representados pelas fórmulas detalhadas na Figura 6.

Coeficientes de Rendimento

$$a) \quad Y_{XS} = \frac{\Delta X}{\Delta S}$$

$$b) \quad Y_{PS} = \frac{\Delta P}{\Delta S}$$

$$c) \quad Y_{PX} = \frac{\Delta P}{\Delta X}$$

K. xylinus

Y_{XS} - 1,7 a 2,4%;

Y_{PS} - 24%;

Y_{PX} - 1 g de biomassa gera 10 g de celulose.

Figura 6: Coeficientes de Rendimento Metabólico para celulose bacteriana. Em que, X , S e P , são, respectivamente, biomassa, substrato (glicose) e produto de interesse (celulose). No quadro cinza, os valores de cada coeficiente da cepa bacteriana *Komagataeibacter xylinus*.

Fonte: Adaptado de Unicamp_Brazil - iGEM, (2022).

Muitos artigos apontam a produção de celulose bacteriana em g/L (massa seca por litro de meio de cultivo), sendo destacadas e buscadas as cepas com maior rendimento, após otimização, principalmente de meios de cultura alternando as fontes de carbono.

Tabela 1: Produção de celulose bacteriana (CB) utilizando diversos recursos naturais e padrões, conforme estudos presentes na literatura científica.

Bactéria	Meio de cultivo	Tempo (dia)	g/L	Referência
<i>Komagataeibacter sucrofermentans</i> DSM 15973	Hidrolisado de farinha de girassol	15	13,3	Tsouko et al. (2015)
<i>Komagataeibacter maltaceti</i>	Meio HS (- Glicose) + 8% de dextrina	~6	6,2	Greser; Avcioglu, (2022)
<i>Komagataeibacter nataicola</i>	Meio HS (- Glicose) + 10% maltose	~6	5,4	Greser; Avcioglu, (2022)
<i>Komagataeibacter hansenii</i> ATCC 23769	20 g/L de Lactose + 5 g/L de Prodex Lac® (Extrato de levedura selvagem).	12	5,5	Tureck et al. (2021)

<i>Komagataeibacter xylinus</i> InaCC B404	Meio HS (- Glicose) + 20 g/L de lactose	15	8,7	Napitupulu et al. (2022)
<i>Komagataeibacter acetii</i> KTH 5655	Meio HS	9	10,4	Chen et al. (2017)
<i>Komagataeibacter xylinus</i> ATCC 53524	Meio HS	9	5,2	Chen et al. (2017)
<i>Komagataeibacter intermedius</i> JF2	Meio HS-glicose-manitol	7	1,6	Fernández et al. (2019)
<i>Komagataeibacter intermedius</i> CIs26	Meio de solução de resíduos cítricos (5 g de extrato de levedura, 5 g de glicose, 30 g de sacarose, 3 g (NH ₄) ₂ SO ₄ , 2g Na ₂ HPO ₄ e 1 ml de ácido em solução de resíduos cítricos).	8	7,2	Yang et al. (2013)
<i>Komagataeibacter intermedius</i> SNT-1	Melaço pré-tratado com H ₂ SO ₄	7	12,6	Tyagi; Suresh, (2016)
<i>Komagataeibacter intermedius</i> NT	Meio HS modificado meio contendo 40 ml/L de melaço pré-tratado.	10	10,0	Tyagi; Suresh, (2013)
<i>Komagataeibacter xylinus</i> NRRL B-42	Meio HS (-Glicose) + 10,0 g/l de Glicerol comercial	14	10,0	Vazquez et al. (2013)
<i>Komagataeibacter xylinus</i> BCRC 12334	Meio TS-HS (Água destilada substituída por efluente da destilaria de vinho de arroz (TS)).	7	10,4	Wu; Liu, (2012)
<i>Komagataeibacter xylinus</i> ATCC 23770	Meio de sementes (0,3% de peptone 0,5% de extrato de levedura e 2,5% de hidrolisados de palha de trigo)	7	8,3	Chen et al. (2013)

Fonte: Autoria própria (2024).

A Tabela 1 apresenta a produção de celulose bacteriana reportada em diferentes publicações bibliográficas. Nesses artigos temos uma faixa de produção de 1,6 – 13,3 g/L. O maior rendimento relatado é de 13,3 g/L, em que foi utilizado hidrolisado de farinha de girassol como fonte de carbono para o cultivo da cepa *Komagataeibacter sucrofermentans* DSM 15973.

Podemos observar pela tabela uma grande variação de rendimento por tempo de cultivo, demonstrando que a metodologia de cultivo varia bastante a depender da espécie que estamos trabalhando. A fonte de carbono ideal para maximizar a biossíntese também é bastante discutida. Existem inúmeros artigos testando diferentes substratos e constatando que não existe um ideal para todas as espécies, pois cada metabolismo responde melhor com variadas fontes de açúcares, mas temos como o mais usual a glicose.

A cepa *Komagataeibacter xylinus* é o microrganismo apontado com o maior índice de produção do biopolímero, sendo cada célula responsável pela polimerização de até 200.000 moléculas de glicose em cadeias de β -1,4-glucano e simultaneamente organizar essas cadeias em poliméricas em nanofibras em apenas 1 segundo (LIN; CHEN; CHEN, 2011; ZHONG, 2020). Apesar da alta e rápida formação dos exopolímeros pela *K. xylinus*, ainda estamos longe de atingir um nível viável de industrialização e comercialização em larga escala de CB (ASWINI; GOPAL; UTHANDI, 2020).

1.6. Desafios econômicos na utilização da Celulose Bacteriana

A celulose bacteriana contém diversos benefícios quando comparada à celulose vegetal, pois como explicado anteriormente a CB não apresenta pectina, hemicelulos, lignina ou outros polímeros em sua estrutura, com isso a purificação é simples e menos prejudicial ao meio ambiente em comparação com o procedimento de extração de celulose da madeira. Além disso, sua produção pode ocorrer em ambientes controlados, independe da região e condições climáticas, gerando um produto uniforme e com rendimento previsível. Outro benefício é a possibilidade de produzir celulose com propriedades desejadas, por meio de modificações no meio de cultivo ou engenharia genética de cepas especializadas (SHI et al., 2014).

A crescente demanda por celulose bacteriana tem pressionado pesquisadores a aumentar sua produção. O baixo rendimento e o alto custo de produção dificultam sua viabilidade industrial, resultando em um preço elevado no mercado. Assim, é necessário investigar cepas bacterianas mais eficientes e meios de cultura de menor custo para aumentar a produção de CB (SINGHANIA et al., 2022).



Figura 7: Nata de coco em cubos.

Fonte: Alibaba, [s.d.]

O produto principal comercializado de CB é a nata de coco, composto por um alimento glicídico produzido através da fermentação por bactérias *K. xylinus* de água de coco ou leite de coco, sendo comercializada em forma de manta ou em cubos, que constitui uma sobremesa bem conhecida em países da Ásia, especialmente nas Filipinas (DANESI; WOSIACKI, 1998).

Os valores da Nata de coco variam entre a faixa de US\$ 200,00 à US\$1.000,00 por tonelada, podendo oscilar os preços a depender da qualidade, produtor e formato (UL-ISLAM et al., 2020).

O número de produtos baseados em celulose bacteriana está aumentando e conquistando espaço no mercado, em destaque na área alimentícia. Em 2016 o mercado de CB estava em torno de US\$207,36 milhões, e com uma projeção de alcançar US\$ 700 milhões em 2026 (“Research Moz QY Research”, 2017).

Embora a CB apresente inúmeras vantagens quando comparada à CV, sua produção em larga escala enfrenta desafios econômicos. Segundo Donini et al. (2010), a produção de celulose bacteriana se tornará viável e podendo ser comparável à da CV, quando o rendimento chegar a 15 g/L em um período de 50 horas.

Um fator que encarece o processo de escalonamento é o meio de cultura usado para a produção de mantas de CB, sendo o meio Hestrin-Schramm (HS) o padrão, contendo componentes caros em alta concentração, como por exemplo a glicose à 20 g/L, custando em média R\$9,12, refletindo aproximadamente 26,5% do custo total de 1 L de meio HS (R\$34,54) (M.C. S; E.F; L.M.F, 2021; SCHRAMM; HESTRIN, 1953) . O meio de cultura representa 30% do custo total

da produção de celulose, com isso, a busca por fontes alternativas de carbono e o aumento da eficiência de sintetização são formas de baratear os custos (RIVAS et al., 2004).

Os candidatos que vêm ganhando destaque para barateamento do meio de cultivo são os resíduos agroindustriais. Neste contexto, podemos citar meios utilizando o xarope de tâmara e soro de queijo como fonte de substrato, se mostrando boas alternativas para baratear o custo e apresentando compatibilidade com as cepas (RAISZADEH-JAHROMI et al., 2020; SALEH et al., 2021).

Outro exemplo encontrado na literatura de fontes alternativas, é a fermentação a partir de cascas de laranja, banana, abacaxi e cal doce, com uma produtividade de 11,44 g/L de CB sintetizadas por *K. xylinus* IITR DKH20 (LUO et al., 2017). Podemos também citar outros meios alternativos, exemplificados na Tabela 1, como a farinha de girassol, palha de trigo e resíduos de vinho, que demonstram as diversas formas e fontes de driblarmos o alto custo de produção, vislumbrando o escalonamento para atingir a demanda do mercado e ampliar suas aplicações.

1.7. Co-cultivo para otimização da produção de CB

O termo co-cultivo é aplicado para descrever o cultivo de dois ou mais microrganismos, células ou organismos no mesmo meio de cultura. Estratégias de co-cultivos estão sendo altamente exploradas na biotecnologia industrial, visando a produção de uma variedade de produtos, como enzimas, produtos químicos e aditivos alimentares, entre outros (GOERS; FREEMONT; POLIZZI, 2014; SHARMA; XU; QIN, 2019). Diversos estudos apontaram o co-cultivo como um potencial intensificador da produção do polímero.

Autores utilizaram *Escherichia coli* ATCC 700728 associada com a bactéria produtora, *Komagataeibacter hansenii* ATCC 23769 na fermentação, demonstrando que a produção de CB em co-cultura, obteve um aumento de 10,8% em meio de cultura padrão, o meio HS (LIU; CATCHMARK, 2019).

Em outro trabalho, observaram que o consórcio entre as bactérias *Komagataeibacter nataicola* e *Lactobacillus fermentum* apresentou um aumento

significativo na produção de CB, com um ganho de produtividade de até 4,5 vezes quando comparado ao monocultivo da mesma linhagem (JIANG et al., 2023).

O pesquisador Yi-Cheng Huang trabalhou com co-culturas de *K. xylinus* e *Lactococcus lactis*, e a partir dessa união conseguiu obter mantas de celulose bacteriana com atividade antibacteriana, pois a cepa *L. lactis* produz um composto proteico com ação bactericida contra gram-positivas e esporos bacterianos, chamado nisina (HUANG et al., 2024). Com isso, além da manta apresentar ação antibacteriana, o co-cultivo também aumentou o desempenho mecânico dos filmes de celulose, relatando assim os benefícios dos co-cultivos para além do rendimento.

A associação de estratégias de co-cultivo e meios de cultura alternativos de resíduos industriais vem ganhando notoriedade. Wenchao Li e seu grupo, empregaram o hidrolisado enzimático de palha de milho como fonte de carbono, para cultivar em conjunto a cepa *K. xylinus* (*Komagataeibacter xylinus* CGMCC 2955) e *Bacillus cereus*, obtendo um aumento de 258% no rendimento, quando comparada ao monocultivo (LI et al., 2023). Outro ponto interessante deste trabalho, é a função do *Bacillus cereus* como maquinário para aumentar os metabólitos acetoína e 2,3-butanodiol, que promovem na bactéria *K. xylinus* o aumento da atividade do ciclo de Krebs e crescimento bacteriano.

Diante do exposto, notamos o potencial e a importância de investigar as interações microbianas presentes no chá de Kombucha, visando sua aplicação em co-cultivos que possam modificar a produtividade e a qualidade do polímero.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho é isolar e identificar micro-organismos do chá de Kombucha, e otimizar métodos de cultivo e co-cultivo para melhor produção de CB, avaliando também a produção e as propriedades estruturais da celulose bacteriana sintetizada por essas cepas bacterianas.

2.2. Objetivos específicos

O objetivo geral deste trabalho pode ser pormenorizado nos seguintes objetivos específicos:

- Buscar e aprimorar métodos de isolamento bacteriano a partir de chá de Kombucha;
- Isolar e identificar espécies utilizando o sequenciamento da região codificadora para rDNA 16S de bactérias produtoras de celulose;
- Isolar e identificar espécies utilizando o sequenciamento da região codificadora para ITS rDNA 18S de levedura do chá de Kombucha;
- Estabelecer protocolo de cultivos e co-cultivos utilizando 2 linhagens de leveduras;
- Analisar quantitativamente e qualitativamente a celulose sintetizada pelas cepas em monocultivos e em co-cultivos;
- Caracterizar as particularidades físico-químicas e mecânicas das mantas de CB, cultivadas em monocultivos e em co-cultivos.

3. MÉTODOS E DESIGN

3.1. Coleta de amostras

3.1.1. Meio de cultivo

O meio HS utilizado nos ensaios contém 0,73 g/L de sulfato de magnésio (MgSO_4) (Sigma-aldrich®- M7506), 2 g/L de fosfato de potássio (KH_2PO_4) (MP Biomedicals® – 02191430-CF), 4 g/L de extrato de levedura (Sinergia Científica® – 15014), 20 ml/L de etanol absoluto (99,8%) (Êxodo Científica® – AE06689RA) e 50 g/L de glicose (Êxodo Científica® – D09724RA), no meio de cultura sólida adicionamos 15 g/L de ágar (Kasvi® – K25-1800).

O meio YPD ágar aplicado para a obtenção da cepa fúngica do chá de Kombucha apresenta em sua composição 10 g/L de extrato de levedura (NEOGEN® – NCM0218A), 20 g/L de peptona (Himedia® – RM001-500G), 20 g/L de glicose (Êxodo Científica® – D09724RA) e 15 g/L de ágar (Kasvi® – K25-1800).

3.1.2. Coleta de amostras de Chá de Kombucha

Para realizar o isolamento da cepa, as amostras foram provenientes de dois chás Kombuchas diferentes cultivados por alunos do laboratório (Kombucha_J e Kombucha_M). Foram coletados 20 mL de bebida Kombucha contendo pedaços do *Scoby* em frascos de vidro de 100 mL autoclavados. Para cada chá fizemos três inóculos contendo 1 mL dos chás coletados com 15 mL de meio Hestrin-Schramm (HS) por 3 dias a 30°C (SCHRAMM; HESTRIN, 1953). Os acessos foram registrados na plataforma Sisgen sob número A1D5D64.

3.1.3. Isolamento de Bactérias Produtoras de Celulose

Após o período de incubação, os microrganismos presentes nos inóculos produziram uma membrana gelatinosa na superfície do meio. Utilizando essa primeira cultura, preparamos lâminas para observar por meio de microscopia de luz a diversidade de microrganismos presentes.

Para a filtração das suspensões celulares, utilizamos filtros de membrana de nitrocelulose com poros de 0,45 μm da marca Schleicher & Schuell®, um funil de vidro e filtros para seringa com 0,45 μm , com o objetivo de reter

microrganismos de tamanho superior ao das bactérias. Foram filtrados 10 ml de cada cultura, dos quais 100 µL foram plaqueados em meio HS-ágar e incubados por 3 dias a 30°C. Com os 5 ml restante da suspensão microbiana que não passou por filtração, utilizando a técnica de semeadura por esgotamento em placa de YPD ágar, a fim de obter uma colônia isolada da levedura presente no consórcio.

A partir disso, isolamos a linhagem de bactéria **LaBS_1** e uma linhagem de levedura **LaBS_2** do chá Kombucha_J e a linhagem de bactéria **LaBS_3** do chá Kombucha_M.

3.2. Extração do DNA genômico

Para realizar a extração do DNA genômico das bactérias Gram-negativas e das leveduras, utilizamos o Wizard® Genomic DNA Purification Kit, seguindo os protocolos sugeridos pelo fabricante.

3.3. Amplificação e purificação do gene 16S

A amplificação da região 16S foi realizada por PCR, utilizando os oligonucleotídeos forward (F) e reverse (R) descritos na Tabela 2 (SAMBO et al., 2018). Para a reação de PCR aplicamos 0,5 µL de DNA genômico, 0,2 µL de primer F (10 mM), 0,2 µL de primer R (10 mM), 4 µL de dNTP (2,5 mM), 0,25 µL Taq DNA polimerase (New England Biolabs), 5 µL Taq buffer e completamos até um total de 50 µL com água ultra pura.

A reação de PCR foi realizada em um termociclador programado para 30 ciclos de amplificação. Inicialmente, o DNA molde foi desnaturado a 94 °C por 1 minuto. Em seguida, os primers foram hibridizados ao DNA a 55 °C por 2 minutos. A extensão das fitas foi conduzida a 72 °C por 3 minutos. Esses ciclos foram repetidos até completar o número desejado de amplificações, e a reação foi finalizada com uma extensão final a 72 °C por 5 minutos para garantir a completa síntese de qualquer fita incompleta.

Espera-se que ao final do protocolo de PCR, tenhamos um produto correspondendo a aproximadamente 500 pb de tamanho.

Tabela 2: Oligonucleotídeos utilizados para amplificação da região 16S

Primer F	Primer R
F1.1 - TCC TAC GGG AGG CAG CA	
F1.2 - TCC TAC CGG AGG CAC CA	
F1.3 - TCC TAC GGG CGA ATG CAG	R1.1 - TCA CGG CAC GAG CTG AC
F1.4 - CCT ACG CGA GGC TGC AA	R1.2 - GAC ACG AGC TGA CGA CA
F1.5 - CCT ACG CGA GGC AGC AA	
F1.6 - CCT ACG GAA GGC AGC AG	
F1.7 - CCT ACG GGT GGC TGC AG	
F1.8 - CTA CGG TGG GCT GCA GT	
F2.1 - TCC TAC GGG AGG CAG CA	
F2.2 - TCC TAC CGG AGG CAC CA	
F2.3 - TCC TAC GGG TGG TTG CAG	R2.1 - TCA CGG CAC GAG CTG AC
F2.4 - TCC TAC GGA AGG CAG CAG	R2.2 - ACG ACA CGA GCT GAC GAC
F2.5 - CCT ACG CGA GGC AGC AA	
F2.6 - CCT ACG CGA GGC TGC AA	
F2.7 - CCT ACG GGC GAA TGC AG	
F2.8 - CTA CGG TTG GCT GCA GT	
F3.1 - CTC CTA CGG AAG GCA GCA	
F3.2 - TCC TAC GGG AGC CTG CA	
F3.4 - CCT ACG GGT TGC AGC AG	R3.1 - ACG ACA CGA GCT GAC GA
F3.3 - TCC TAC GGA AGG GTG CAG	R3.2 - ACG ACA CGA GCT GAC ACC
F3.5 - CCT ACG CGA GGC AGC AA	R3.3 - CAC CAC GAG CTG ACG AC
F3.6 - CCT ACG CGT GGT TGC AG	R3.4 - CAA CAC GAG CTG ACG AGA G
F3.7 - TCT ACG GAC GGC AGC AA	
F3.8 - CTA CGT GCG GTT GCA GT	

Fonte: Sambo, F et al. (2018).

Para confirmação da amplificação do fragmento de interesse usamos gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, submetido à eletroforese a 80 V por 50 minutos.

Para a purificação do produto do PCR, utilizamos o Biospin gel and PCR Purification Kit – BioFlux®, eluindo as amostras com água ultra pura. Sendo que, essa etapa de purificação foi realizada visando a preparação da amostra para o sequenciamento.

3.4. Sequenciamento de Sanger

O sequenciamento pelo método Sanger da sequência amplificada e purificada da cepa isolada foi realizado utilizando a plataforma 3730XL da Applied

Biosystems, no Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho (LaCTAD).

3.5. Testes de co-cultivos

Os microrganismos utilizados consistiram em 3 cepas bacterianas produtoras de celulose, sendo as duas cepas isoladas da bebida fermentada, *LaBS_1* e *LaBS_3*, e uma cepa de *Komagataeibacter xylinus*. Além disso, nos co-cultivos foram utilizadas duas cepas fúngicas, sendo as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* BY4743 e *LaBS_2*.

A biossíntese de celulose bacteriana nos ensaios de monocultivos e co-cultivos foi realizada pelas cepas bacterianas: LaBS1, LaBS3 e *K. xylinus*, sendo *K. xylinus* como ponto de referência, devido ao seu rendimento conhecido, amplamente apontado pela literatura como elevado.

Os ensaios de monocultivos consistem no cultivo individual de cada cepa bacteriana isoladamente, com o objetivo de avaliar a qualidade e quantidade da CB produzida pelas bactérias prospectadas. Nos ensaios de co-cultivo, as bactérias foram associadas às leveduras. Para cada bactéria, foram realizados três tipos de cultivos: um individual, outro com a cepa fúngica isolada (*LaBS_2*) e um com a cepa fúngica laboratorial *S. cerevisiae* BY4743. Todos os ensaios foram conduzidos em triplicatas.

Seguimos um protocolo com etapas de pré-inóculos e inóculos, totalizando cinco fases até a produção final. A incubação dos pré-inóculos e inóculos durou 3 dias, enquanto a incubação para a obtenção da manta de celulose final foi de 5 dias, todos mantidos à 30°C, conforme ilustrado na Figura 8.

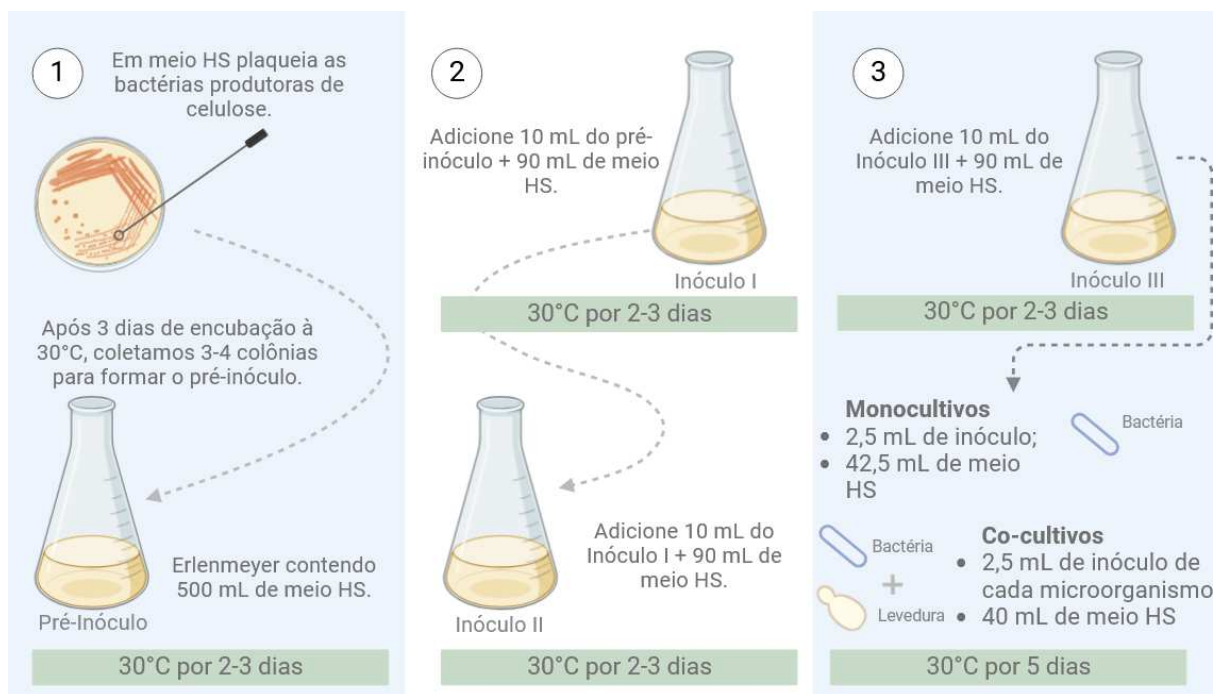


Figura 8: Etapas de preparo do pré-inóculo, inóculos e produção de mantas de biocelulose.
Fonte: Autoria própria (2022).

3.6. Secagem e Quantificação das Mantas de Celulose

Após os 5 dias de cultivo das mantas finais, estas passaram pelo processo de pesagem e secagem. As pesagens foram realizadas em dois estados: primeiro, imediatamente após a remoção das amostras do meio de cultura, e, em seguida, após 12 horas de secagem em uma estufa digital à 64 °C. Os pesos foram gerados em uma balança de precisão digital.

3.7. Caracterização das propriedades físico-químicas da celulose bacteriana

A caracterização das propriedades mecânicas e físico-químicas das amostras foi realizada em colaboração com a Profa. Dra. Rosiane Lopes da Cunha, do Laboratório de Engenharia de Processos (LEP), a Dra Luna Valentina e a Profa. Dra. Nathália Cirone da Silva, do Laboratório de Microbiologia de Alimentos II, todas vinculadas à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp.

As mantas de celulose foram secas em uma estufa convectiva sem circulação de ar à 64°C até o peso constante. Depois o material seco foi adaptado no formato para as diferentes análises e disposto em envelopes de papel

manteiga e reservados em dessecador por até 48 h antes das análises, submetidos a um ambiente com controle de umidade relativa ($HR=55\% \pm 3$).

Para a determinação de conteúdo de água e solubilidade em água, biofilmes com dimensões de 1x1 cm foram obtidos. Para a determinação de conteúdo de água os biofilmes foram pesados e dispostos em placas de vidro para secagem a 105 °C em estufa sem circulação de ar, após 24 h os biofilmes foram novamente pesados. O conteúdo de água foi determinado pela diferença entre o peso inicial e final é expresso em $g.100g^{-1}$ (HORWITZ, 2006). Depois, as amostras secas foram submetidas às análises de solubilidade em água.

Para determinar a solubilidade em água (SW) dos biofilmes, estes foram dispostos em béqueres de 50 mL contendo 25 mL de água destilada a $25^{\circ}C \pm 1$ deixados em agitação dentro de shaker a 115 rpm, após 24 h os biofilmes foram recuperados e secos a 105 °C em estufa sem circulação de ar por 24 h. Assim, a solubilidade foi calculada pela diferença entre a matéria seca inicial e o peso da matéria seca final expressado em termos de $g.100g^{-1}$ (GONTARD et al., 1994). O valor da atividade de água (A_w) foi obtido por leitura direta em equipamento para medir atividade de água (Aqualab, USA).

3.8. Caracterização das propriedades mecânicas da Celulose Bacteriana

A resistência à tração e o alongamento na ruptura dos filmes foi determinada pelo analisador de textura (TA. TX Plus Texture Analyser) usando o software “Texture Exponent 32” (Stable Micro Systems, Surrey, Reino Unido) de acordo com o método padrão D882-12 com adaptações (“Test Method for Tensile Properties of Plastics”, 2014). As amostras de biofilme foram adaptadas em tiras de 10 cm de comprimento por 2,5 cm de largura. O afastamento inicial das garras e a velocidade da travessa foram ajustadas para 8 cm e 1.0 mm/s, respectivamente. A resistência à tração (força/área inicial da seção transversal) e o alongamento na ruptura foram calculados diretamente das curvas de resistência versus curvas de alongamento usando o software “Texture Exponent 32”. O módulo de Young foi calculado como a inclinação da porção linear inicial desta curva.

4. RESULTADOS

4.1. Isolamento e Caracterização dos Microrganismos

4.1.1. Análise por Microscopia Óptica

Ao final da incubação de colônias obtidas a partir do chá Kombucha_J, as lâminas foram montadas diluindo células derivadas de placas em 10 µL de solução salina (0,85%) e analisadas no microscópio de luz. Conseguimos observar a presença de leveduras juntamente com a bactéria de interesse (Figura 9). Essa análise nos serviu de base para direcionar as próximas estratégias de isolamento bacteriano.

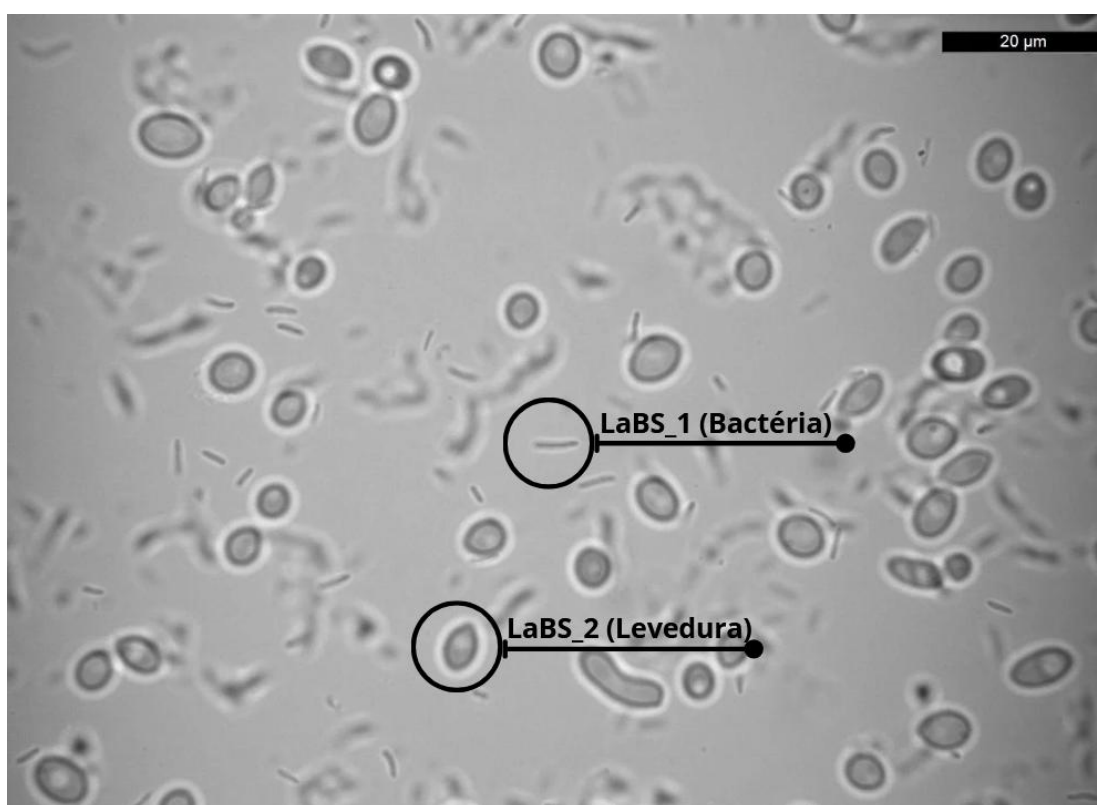


Figura 9: Imagem capturada de microrganismos do chá Kombucha_J, na imagem podemos observar leveduras e a cepa bacteriana.
Fonte: Autoria própria (2022).

4.1.2. Características das Colônias em Placas de cultura

Com base na imagem ilustrada na Figura 4, decidimos filtrar as culturas em filtros tamanhos de 0,45 µm, com o objetivo de reter as leveduras presentes.

Após a filtragem e o período de crescimento de 3 dias a 30°C, foi observada a formação de colônias bacterianas, denominadas como *LaBS_1* e *LaBS_3*,

como demonstrado na Figura 10 em A e B, respectivamente. Enquanto, a placa C contém a bactéria utilizada a nível de comparação de produção, a espécie *Komagataeibacter xylinus*.

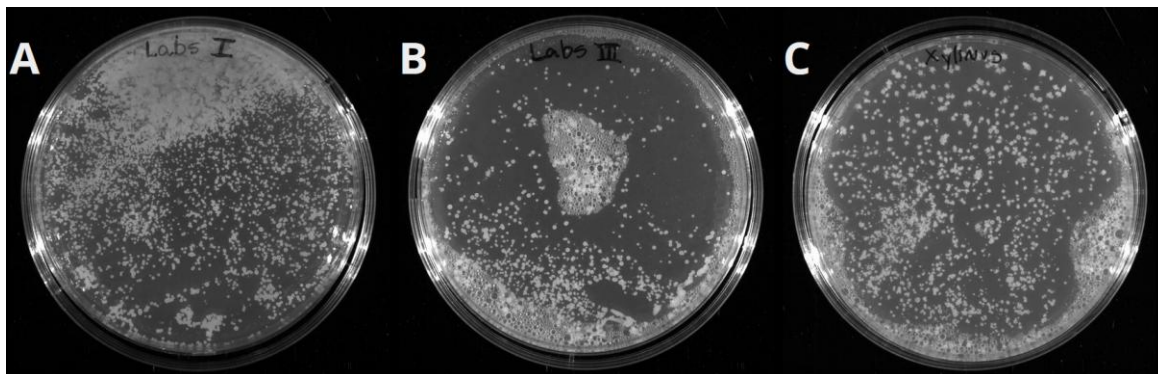


Figura 10: Colônias bacterianas em meio ágar HS. A placa A mostra o produto da filtração a 0,45 μm do Kombucha_J, enquanto a placas B do chá Kombucha_M, e em C a cepa controle *Komagataeibacter xylinus*.

Fonte: Autoria própria (2022).

4.1.3. Confirmação da Produção de Celulose pelas Cepas Isoladas

As colônias oriundas dos chás de Kombucha foram posteriormente inoculadas em meio HS para confirmar se eram cepas produtoras de celulose. Conseguimos observar finas camadas de celulose bacteriana (CB) de formando na superfície, como mostrado na Figura 11.

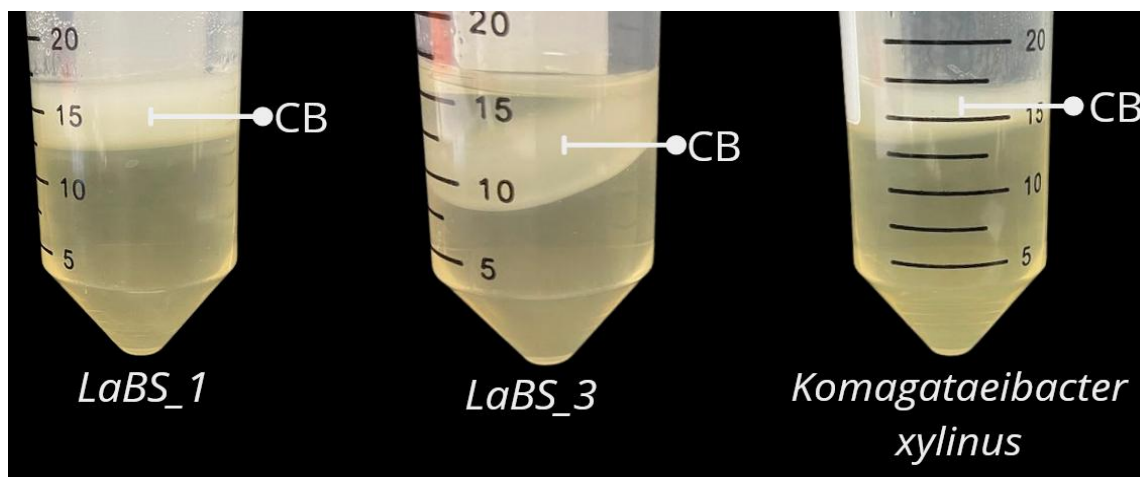


Figura 11: Discos de celulose bacteriana (CB) produzidos pela cepa *LaBS_1* (a), *LaBS_3* (b) e *K. xylinus* (c).

Fonte: Autoria própria (2023).

O cultivo de bactérias *LaBS_1* e *LaBS_3* em meio HS levou à formação de discos de celulose espessos na superfície do meio de cultivo, como observado em culturas da *K. xylinus*. Esses ensaios serviram para confirmar que as bactérias isoladas dos dois chás de Kombucha são cepas produtores de celulose.

4.2. Amplificação da Região Codificadora para rRNA 16S

Realizamos a extração do DNA genômico e o PCR das colônias isoladas. Para a amplificação por PCR utilizamos os todas as combinações de oligonucleotídeos F com seus respectivos oligonucleotídeos R descritos na Tabela 1, totalizando 64 reações.

Por meio do gel de agarose 1% observamos que os pares oligonucleotídeos anelam eficientemente com o genoma da linhagem *LaBS_1* (Figura 12) foram: F2.1 / R2.1; F2.1 / R2.2; F2.4 / R2.2 e F2.5 / R2.2, gerando uma banda de aproximadamente 500 pb, conforme esperado. O mesmo procedimento e resultado foi observado com cepa *LaBS_3*.

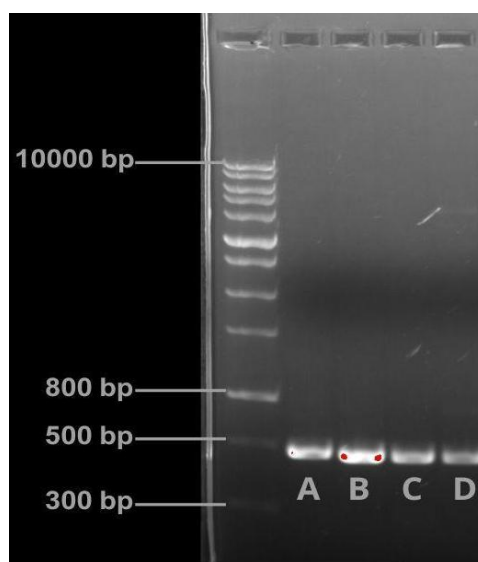


Figura 12: Gel de agarose 1% para confirmação da amplificação da região 16S da linhagem *LaBS_1*. Lane 1 - Marcador de peso molecular 1kB Promega, Lanes 2 a 5: A corresponde ao produto da amplificação com primers F2.1/R2.1, B - F2.1/R2.2, C - F2.4/R2.2 e D - F2.5/R2.2.

Fonte: Autoria própria (2023).

4.3. Genotipagem das cepas isoladas

Com o sequenciamento do produto de PCR do locus 16S conseguimos identificar a espécie/linhagem da bactéria *LaBS_1* e *LaBS_3*, sendo que ambas apresentam alta similaridade com *K. rhaeticus*, sendo de 98% e 96%, respectivamente. A cepa fúngica *LaBS_2*, teve o locus 18S amplificado por PCR, e o produto da reação foi sequenciado para identificação da espécie, como

resultado obtivemos alta compatibilidade com *S. cerevisiae*. Sendo assim, os microrganismos foram classificados como demonstra a Tabela 3.

Tabela 3: Microrganismos utilizados nos ensaios

Nº	Código de identificação	Espécies
1	<i>LaBS_1</i>	<i>Komagataeibacter rhaeticus</i>
2	<i>Komagataeibacter xylinus</i>	<i>Komagataeibacter xylinus</i>
3	<i>LaBS_3</i>	<i>Komagataeibacter rhaeticus</i>
4	<i>LaBS_2</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> BY4743	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

Fonte: Autoria própria (2024).

4.4. Produção de Celulose Bacteriana

4.4.1. Monocultivos

Os ensaios realizados resultaram na formação de discos do polímero que se depositaram na superfície do meio de cultura. Essa deposição é um indicativo positivo de atividade metabólica das cepas bacterianas, refletindo sua capacidade de produzir celulose bacteriana. Além disso, demonstra a validação do método de cultivo como eficaz para promover o desenvolvimento bacteriano e a sintetização desse biopolímero.

Após o período de incubação, esses discos foram retirados do meio de cultivo. Pode-se observar como características as bordas bem delineadas e uma coloração esbranquiçada após a lavagem, como refletido na Figura 13.

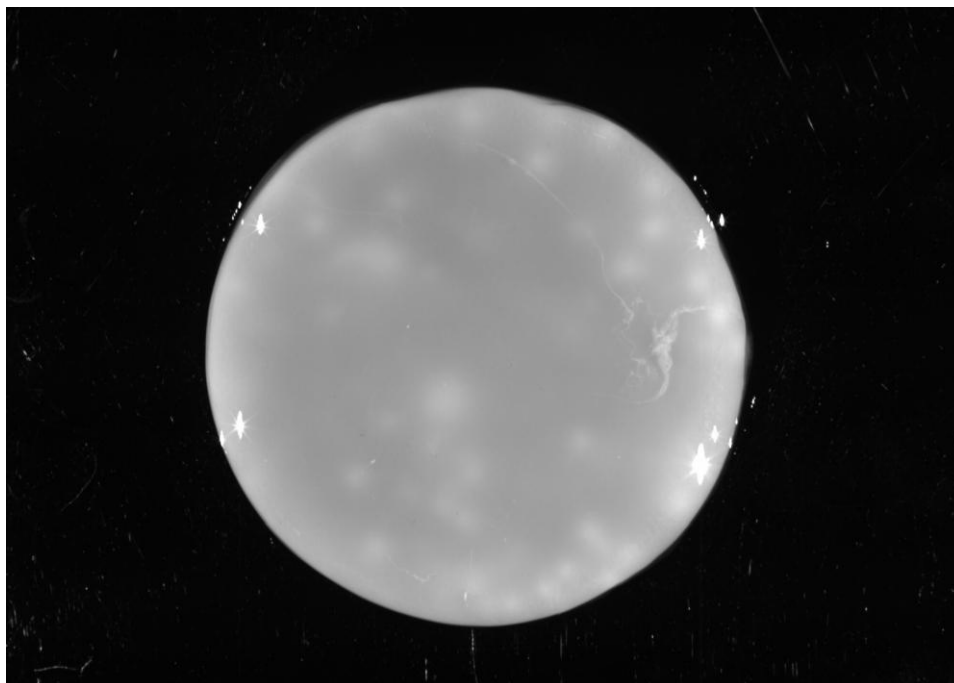


Figura 13: Discos de celulose bacteriana (CB) produzidos pela cepa *LaBS_1* em monocultivo, em estado hidratado.

Fonte: Autoria própria (2023).

Os monocultivos com as cepas produtoras *LaBS_1*, *LaBS_3* e *K. xylinus* apresentaram uma produtividade média de 11,11 g/L, 10,67 g/L e 7,99 g/L, respectivamente. Como mostrado na Figura 14, as cepas isoladas do chá de Kombucha durante esse projeto, *LaBS_1* e *LaBS_3*, exibiram uma produção de aproximadamente 28,08% e 25,12%, respectivamente, superior a bactéria *K. xylinus*.

Monocultivos - Produção Celulose Bacteriana (g/L)

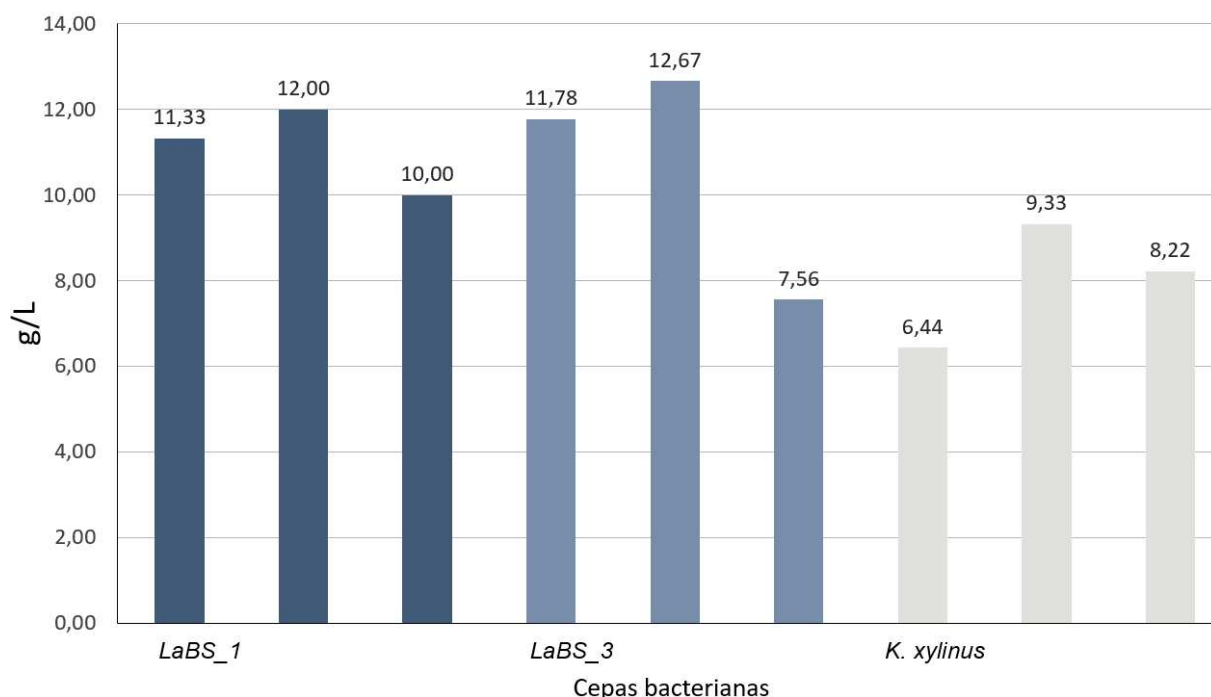


Figura 14: Pesagem de mantas de celulose bacteriana em monocultivos (gramas/litro) realizados em triplicatas. As colunas azuis-escuros representam a cepa *LaBS_1* e azuis claro a cepa *LaBS_3*, enquanto colunas cinzas a cepa *K. xylinus*.

Fonte: Autoria própria (2024).

As cepas isoladas foram identificadas como bactérias da espécie *K. rhaeticus*. Quando comparamos a síntese de celulose das cepas isoladas, com exemplos da mesma espécie encontrados na literatura, podemos notar que as estirpes *LaBS_1* e *LaBS_3* apresentam um alto desempenho de sintetizar o exopolímeros de interesse.

Um estudo demonstrou que a cepa *K. rhaeticus* MSCL 1463 cultivada em meio HS padrão, por 10 dias apresentou um valor de aproximadamente 3,32 g/L de celulose sintetizada (KOLESOVS; RUKLISHA; SEMJONOV, 2023). Outro exemplo encontrado é a cepa *K. rhaeticus* P 1463 que obteve como produto o valor de 4,40 g/L de CB em meio HS após o período de 5 dias (SEMJONOV et al., 2017). Além dessas, a literatura relata o caso de uma bactéria *K. rhaeticus* com uma síntese avaliada em 7,89 g/L de celulose secretada após 10 dias de cultivo em meio HS também, sendo o maior valor encontrado na literatura (YE et al., 2023).

Com base nisso, podemos observar que as cepas isoladas do chá de Kombucha, cultivadas em meio HS por 5 dias, apresentaram um excelente

volume de celulose, sendo uma média de 11,11 g/L e 10,67 g/L para *LaBS_1* e *LaBS_3*, respectivamente.

Além disso, as cepas *LaBS_1* e *LaBS_3* demonstraram uma produção média de CB superior à observada para a cepa *K. xylinus*. Vale lembrar que a bactéria *K. xylinus* é conhecida como a bactéria mais eficiente na produção de CB (CAMPANO et al., 2016; GAO et al., 2019). As cepas isoladas nesse projeto não tiveram sua eficiência produtiva calculada, mas foi possível observar que sob as mesmas condições de cultivo que a cepa *K. xylinus*, as cepas isoladas geraram mais celulose, apontando que possivelmente apresentam uma maior eficácia em converter nutrientes em celulose. Demonstrando um potencial como alvos para maiores investigações no âmbito genético e metabólico, visando o maior entendimento da linhagem afim de elaborar estratégias para a otimização do processo de produção em larga escala.

4.4.2. Co-cultivos

Os co-cultivos com a levedura presente e isolada do chá de Kombucha (*LaBS_2*), apresentaram em média uma pesagem de gramas por litro de celulose de 25,77, 27,92 e 18,51, para as cepas *LaBS_1*, *LaBS_3* e *K. xylinus*, respectivamente. É importante destacar que o co-cultivo de *LaBS_1* com *LaBS_2* levou à produção de celulose superior à observada em culturas de *K. xylinus*. Os cultivos em associação com a levedura *S. cerevisiae* BY4743 obtiveram o desempenho de 6,96 g/L com a *LaBS_1*, 3,1 g/L com a *LaBS_3* e por fim, 3,77 g/L com a *K. xylinus*.

As amostras de celulose bacteriana coletadas sob diferentes condições, sendo o monocultivo, co-cultivo com cepa fúngica isolada *LaBS_2* e a cepa fúngica de *S. cerevisiae* BY4743, apresentaram diferenças significativas em questão de volume de polímero sintetizados, como mostra a Fig. 15.

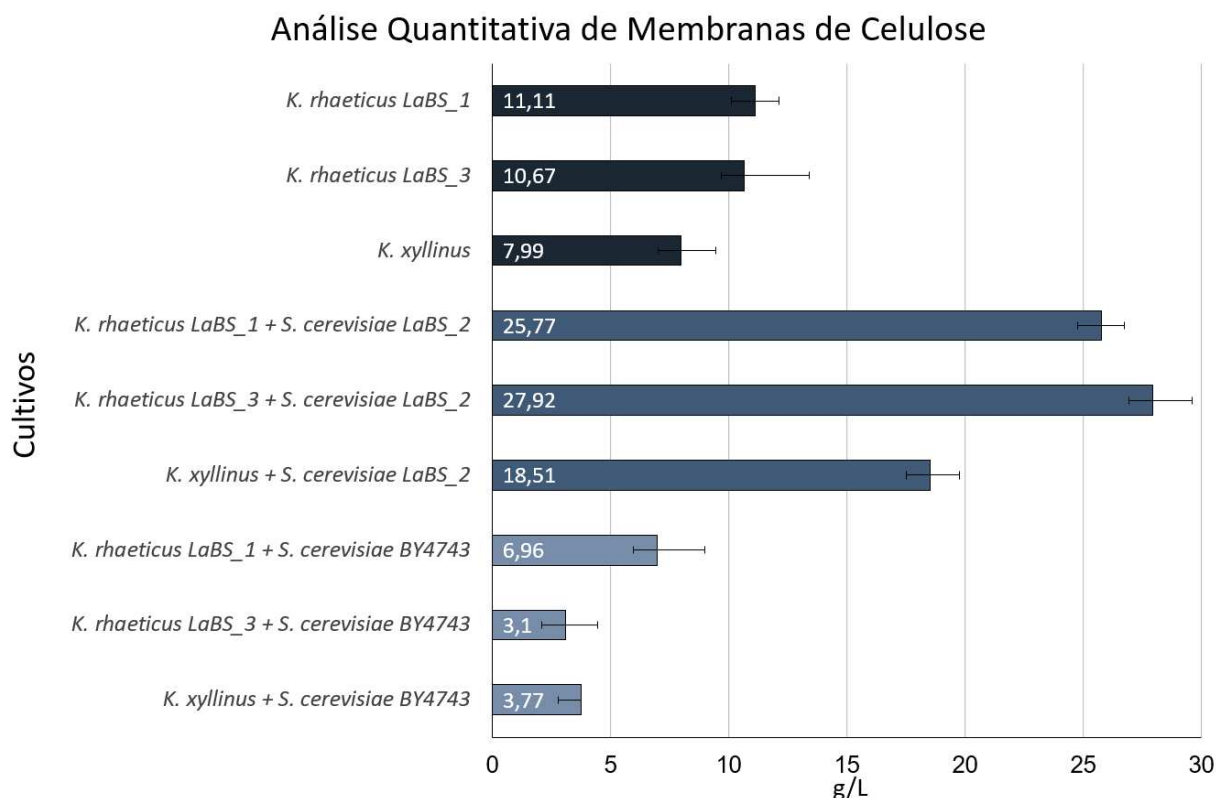


Figura 15: Pesagem de mantas de celulose bacteriana (gramas/litro). As colunas azuis-escuras representam monoculturas das cepas bacterianas *K. rhaeticus* LaBS_1, *K. rhaeticus* LaBS_3 e *K. xylinus*, enquanto as colunas azuis e azuis claro representam co-culturas com diferentes tipos de levedura associadas às cepas bacterianas, *S. cerevisiae* LaBS_2 e *S. cerevisiae* BY4743, respectivamente.

Fonte: Autoria própria (2024).

Neste estudo, observamos um aumento substancial na produção de celulose pelas três bactérias empregadas – *LaBS_1*, *LaBS_3* e *K. xylinus* – quando em consórcio com a levedura isolada *LaBS_2*. Especificamente, as taxas de produção de celulose aumentaram 131,88%, 139,39% e 131,66%, respectivamente, em relação ao seu desempenho nas monoculturas. No entanto, esta tendência positiva não foi replicada em culturas com *S. cerevisiae* BY4743, em que notamos uma diminuição na produção de celulose de 37,44% em *LaBS_1*, 73,77% em *LaBS_3* e 52,70% em *K. xylinus*, indicando que essa levedura exerceu um efeito inibitório na produção de CB.

Os resultados obtidos demonstram um padrão interessante nas interações microbianas na biossíntese de CB, em que podemos observar que dentro de uma mesma espécie podem ser observados interações impulsionadoras e repressoras da produção do polímero.

Os efeitos positivos da cepa fúngica isolada contrasta com alguns artigos que relatam a ação de leveduras isoladas de chás de Kombuchá sobre a produção de celulose bacteriana de forma negativa, como neste caso em que os autores realizaram o isolamento de uma levedura *Dekkera bruxellensis* originária de um fermentado de Kombuchá, e após o isolamento realizaram o co-cultivo com a cepa *Komagataeibacter intermedius* e concluíram que houve uma redução de 24% do rendimento da produção de celulose (DEVANTHI et al., 2021).

Os caminhos para uma produção acessível e eficiente não se restringem aos co-cultivos. Além disso, os pesquisadores estão debruçados em busca de estratégias de melhoramento através de abordagens aplicando engenharia metabólica e genética. Inclusive, artigos que apontam a engenharia genética como ferramenta de modelação da celulose bacteriana em co-cultivos com *K. rhaeticus* e *S. cerevisiae*, em que a levedura foi modificada geneticamente para secretar enzimas na matriz do polímero, de forma a alterar suas propriedades e/ou permitindo respostas à estímulos químicos e ópticos. Dessa forma, obtendo materiais “vivos” feitos de celulose, sendo materiais com organismos vivos que tem a capacidade de responder a estímulos de forma dinâmica, apresentando aplicações promissoras em áreas como biossensores e biocatálise (GILBERT et al., 2021; HORWITZ, 2006).

A complexidade por trás da biossíntese de celulose, associada aos co-cultivos e seus efeitos diversos na produção e morfologia estrutural da manta, demonstram a amplitude de campo de estudo que essas interações apresentam, dado que seu entendimento resulta em um maior compreensão do maquinário biológico por trás do alto e do baixo rendimento de celulose bacteriana.

4.5. Caracterização das propriedades físico-químicas da celulose bacteriana

As mantas de celulose em monocultivos e co-cultivos com a levedura *LaBS_2* foram submetidas a análises físico-químicas, em que foi obtido o valor da atividade de água (A_w), conteúdo de água e solubilidade em água das amostras, como mostrado na Tabela 4.

Tabela 4: Média e desvio padrão das propriedades físico-químicas dos filmes de celulose bacteriana

Filme	Aw	Conteúdo de água (g.100g ⁻¹)	Solubilidade em água (g.100g ⁻¹)
Monocultivos			
1 - <i>LaBS_1</i>	0,5331±0,0010	38,8674±10,3968	27,7142±3,0307
2 - <i>K. xylinus</i>	0,5230±0,0059	30,2176±4,2699	23,9951±3,0561
3 - <i>LaBS_3</i>	0,4802±0,0015	31,4150±11,5291	10,9248±2,8842
Co-cultivos			
4 - <i>LaBS_1</i> + <i>LaBS_2</i>	0,5365±0,0052	18,5621±2,4920	29,7007±2,1268
5 - <i>K. xylinus</i> + <i>LaBS_2</i>	0,5147±0,0079	21,5952±4,8428	49,4964±17,4645
6 - <i>LaBS_3</i> + <i>LaBS_2</i>	0,4969±0,0046	13,4323±2,3631	29,2194±17,7883

Fonte: Autoria própria (2024).

O valor de Aw não apresentou diferenças significativas quando comparamos as cepas em monocultivos entre si ou em co-cultivos, sendo que a cepa que apresentou maior valor da atividade de água em monocultivo e em co-cultivo foi a *LaBS_1*.

O conteúdo de água presente nas mantas houve redução na presença da levedura *LaBS_2* em todos os ensaios, sendo que em consórcio com a *LaBS_1*, *K. xylinus* e *LaBS_3* reduziu 52,24%, 28,53% e 57,24%, respectivamente. A solubilidade das mantas oriundas dos co-cultivos foi maior que as de monocultivos, sendo um aumento de 7,17% para *LaBS_1*, 106,28% para *K. xylinus* e *LaBS_3* de 167,46%, ou seja, o co-cultivo ocasionou mantas que se apresentam uma facilidade maior de se desintegrar ou se dispersar na água.

O estudo sobre as propriedades hídricas das mantas de celulose nos ajuda a compreender e especificar aplicações mais específicas, além disso, a diferença de comportamento das fibras do material na presença e ausência da levedura, instiga a investigação dessa interação e sua relação com a deposição das cadeias de celulose.

4.6. Caracterização das propriedades mecânicas da celulose bacteriana

As mantas de celulose em monocultivos e co-cultivos com a levedura *LaBS_2* foram submetidas a análises mecânicas, em que obtivemos os valores

de espessura, resistência à tração, alongamento na ruptura e Módulo de Young, como mostrado na Tabela 5.

Tabela 5: Média e desvio padrão das propriedades mecânicas dos filmes de celulose bacteriana

Filme	Espessura (mm)	Resistência à tração (Mpa)	Alongamento na ruptura(%)	Módulo de Young (Mpa)
Monocultivos				
1 - <i>LaBS_1</i>	0,059±0,008	54,18±12,54	6,7±3,96	1261,31 ±308,55
2 - <i>K. xylinus</i>	0,048±0,010	51,68±18,91	2,1±0,69	2574,87 ±964,26
3 - <i>LaBS_3</i>	0,035±0,007	30,88±14,03	1,0 ±0,26	2989,11±1270,39
Co-cultivos				
4 - <i>LaBS_1</i> + <i>LaBS_2</i>	0,079±0,005	104,70 ±45,24	5,3 ±2,76	2233,17 ±377,50
5 - <i>K. xylinus</i> + <i>LaBS_2</i>	0,044±0,001	80,48 ±7,41	9,2 ±3,14	1276,90 ±178,57
6 - <i>LaBS_3</i> + <i>LaBS_2</i>	0,080±0,006	70,230±11,26	4,0 ±1,01	2058,23 ±134,25

Fonte: Autoria própria (2024).

O co-cultivos apresentou diferente influência na espessura, sendo que a levedura em conjunto com a cepa *LaBS_1* e *LaBS_3* aumentaram a espessura, em 33,90% e 128,57%, respectivamente. Em contrapartida, com a *K. xylinus* a espessura da manta diminuiu em 8,33% na presença da cepa fúngica.

A resistência à tração aumentou em todos os ensaios de co-cultivo quando comparadas as mantas sintetizadas pelos ensaios de monocultivo, em que obtivemos aumentos de 93,24%, 55,79% e 127,47% oriundas das cepas *LaBS_1*, *K. xylinus* e *LaBS_3*, respectivamente. Esse aumento indica que o consórcio com a levedura aprimorou as mantas de celulose, tornando-as mais resistentes e capazes de suportar uma tensão maior antes de se romperem.

O alongamento da ruptura indica o quanto um material aguenta de deformação na sua estrutura antes de romper, dado em porcentagem que representa o quanto o material foi alongado em relação ao seu comprimento original antes de falhar. O co-cultivo aumentou essa propriedade em dois ensaios, sendo o primeiro *K. xylinus* com 338,10% e *LaBS_3* com 300% de aumento. Em contrapartida, observamos que no ensaio com a cepa *LaBS_1* houve uma diminuição de 20,90% na capacidade de deformação da manta, sugerindo uma

sinergia entre as cepas resultou em um material com melhor desempenho mecânico de alongamento.

O Módulo de Young, também conhecido como Módulo de elasticidade, apresentou alterações opostas ao alongamento da ruptura, ou seja, os ensaios que anteriormente aumentaram, nesse ponto diminuíram, e vice e versa. Com isso, a cepa *LaBS_1* em co-cultivo teve um aumento na elasticidade de 77,05%. E as cepas *LaBS_3* e *K. xylinus* obtiveram valores reduzidos na elasticidade.

Nas mantas analisadas, observa-se que as amostras com um Módulo de Young mais elevado, como o monocultivo *LaBS_3* (2989,11 MPa), tendem a ser mais rígidas e apresentam um menor alongamento na ruptura (1,0%), indicando que esses materiais são mais resistentes à deformação, mas se rompem rapidamente quando submetidos à tensão. Em contraste, amostras com um Módulo de Young mais baixo, como o co-cultivo *K. xylinus + LaBS_2* (1276,90 MPa), exibem um maior alongamento na ruptura (9,2%), sugerindo que esses materiais são mais flexíveis e capazes de absorver mais deformação antes da ruptura. Isso demonstra que a combinação das cepas pode gerar mantas com melhor equilíbrio entre rigidez e flexibilidade, o que pode ser vantajoso em aplicações que demandam maior resistência à tração e a capacidade de deformação.

Os resultados das mantas de celulose bacteriana revelam diferenças significativas nas propriedades mecânicas entre monocultivos e co-cultivos.

Assim como o tópico anterior a respeito das características físico-químicas, a caracterização mecânica apresenta a personalidade de aplicabilidade que este polímero pode ser empregado, como por exemplo a implementação em engenharia de tecidos cardiovascular e nervoso (FOOLADI et al., 2023; JABBARI; BABAEIPOUR; BAKHTIARI, 2022).

O desenvolvimento de estratégias de otimização de produção em conjunto com o entendimento da estrutura e capacidade estrutural, auxilia no direcionamento da produção alinhada à aplicação final do nanomaterial.

5. Conclusão

Este estudo revelou que o consórcio entre *Saccharomyces cerevisiae LaBS_2* e as bactérias produtoras de celulose resultou em um aumento

expressivo na produção de celulose. Além de evidenciar a complexidade dessas interações coexistentes, observamos que duas cepas da espécie *S. cerevisiae* desencadeiam efeitos opostos sobre o mecanismo de síntese e a morfologia estrutural da celulose, destacando o comportamento distinto das leveduras na modulação desse processo.

Em suma, este estudo destaca a importância das interações microbianas na produção de celulose bacteriana, sugerindo que a escolha adequada de consórcios pode aumentar significativamente a eficiência dos processos biotecnológicos. O aprofundamento dessas descobertas será essencial para maximizar o potencial produtivo desses sistemas.

6. Próximos passos

Em um futuro, os estudos devem focar na elucidação dos mecanismos moleculares por trás das interações observadas em co-cultivos que impulsionaram a produção do polímero, bem como investigar o impacto negativo causado na produção.

Podemos ter como aliado na busca de maior entendimento dessa dinâmica as metodologias de ômicas, em busca principalmente de metabólitos. O sequenciamento genômico das cepas para análise comparativa, para entender as bases moleculares das interações observadas nos co-cultivos, como identificação de genes, mapeamento de redes metabólicas e sinais químicos.

Analisar as fibras de celulose através da técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), com o intuito de entendermos a deposição da celulose, visualizar as interações microbianas e porosidade das amostras nos diferentes cultivos.

Outro ponto que requer nossa atenção, é a otimização dos meios de cultura em busca de baratear o processo. Assim como destacado anteriormente, os resíduos industriais são excelentes opções, e no Brasil isso se torna ainda mais atrativo devido a força na agricultura e produtos naturais que resultam em subprodutos ricos em açúcares.

Em meio às nanofibras de celulose encontramos um mundo de possibilidades, com isso, existem caminhos para inovações que vão da biotecnologia à valorização de resíduos.

7. REFERÊNCIAS

- ALIBABA. **Nata de coco in white syrup**. Disponível em: <https://portuguese.alibaba.com/product-detail/NATA-DE-COCO-IN-WHITE-SYRUP-10000007323898.html>. Acesso em: 3 nov. 2024.
- ASWINI, K.; GOPAL, N. O.; UTHANDI, S. Optimized culture conditions for bacterial cellulose production by *Acetobacter senegalensis* MA1. **BMC Biotechnology**, v. 20, n. 1, 26 ago. 2020.
- ATTA, O. M. et al. Biobased materials for active food packaging: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 125, 1 abr. 2022a.
- ATTA, O. M. et al. Development and characterization of plant oil-incorporated carboxymethyl cellulose/bacterial cellulose/glycerol-based antimicrobial edible films for food packaging applications. **Advanced Composites and Hybrid Materials**, v. 5, n. 2, p. 973–990, 1 jun. 2022b.
- BUENO, R. R. L. et al. **Evaluation of the Efficacy and Safety of a Stent Covered with Biosynthetic Cellulose in a Rabbit Iliac Artery Model**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.hmpgloballearningnetwork.com/site/jic/articles/evaluation-efficacy-and-safety-stent-covered-biosynthetic-cellulose-rabbit-iliac-artery>>.
- BULDUM, G.; BISMARCK, A.; MANTALARIS, A. Recombinant biosynthesis of bacterial cellulose in genetically modified *Escherichia coli*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 41, n. 2, p. 265–279, 1 fev. 2018.
- CACICEDO, M. L. et al. Progress in bacterial cellulose matrices for biotechnological applications. **Bioresource Technology**, v. 213, p. 172–180, 1 ago. 2016.
- CAMPANO, C. et al. **Enhancement of the fermentation process and properties of bacterial cellulose: a review**. *Cellulose* Springer Netherlands, , 1 fev. 2016.
- CAVALCANTI, L. M. et al. Eficácia da membrana de celulose bacteriana no tratamento de úlceras venosas de membros inferiores: Estudo randomizado e controlado. **Revista do Colegio Brasileiro de Cirurgioes**, v. 44, n. 1, p. 72–80, 1 jan. 2017.
- CHEN, L. et al. Biotransformation of wheat straw to bacterial cellulose and its mechanism. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 464–468, 2013.
- CHEN, S. Q. et al. Characterisation of bacterial cellulose from diverse *Komagataeibacter* strains and their application to construct plant cell wall analogues. **Cellulose**, v. 24, n. 3, p. 1211–1226, 1 mar. 2017.
- CHEN, S.-Q. et al. Mechanical properties of bacterial cellulose synthesised by diverse strains of the genus *Komagataeibacter*. **Food Hydrocolloids**, v. 81, p. 87–95, ago. 2018.

CHO, S.; ALMEIDA, N. **Dietary fiber and health**. [s.l.] CRC Press, 2012.

DAHMAN, Y. **Nanostructured biomaterials and biocomposites from bacterial Cellulose nanofibers**. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, set. 2009.

DANESI, E. D. G.; WOSIACKI, G. Otimização da produção de nata (celulose bacteriana) por fermentação em superfície. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 1, p. 131–139, abr. 1998.

DE WULF, P.; JORIS, K.; VANDAMME, E. J. Improved cellulose formation by an *Acetobacter xylinum* mutant limited in (keto)gluconate synthesis. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 67, n. 4, p. 376–380, dez. 1996.

DEVANTHI, P. V. P. et al. Do kombucha symbiotic cultures of bacteria and yeast affect bacterial cellulose yield in molasses? **Journal of Fungi**, v. 7, n. 9, 1 set. 2021.

DONINI, Í. A. N. et al. **BIOSSÍNTESE E RECENTES AVANÇOS NA PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA** Artigo/Article **Ecl. Quím.** [s.l.: s.n.]. Disponível em: <www.scielo.br/eq>.

EVARISTO, R. B. W. et al. Materials from Cellulose: Origin, Synthesis and Applications. **Revista Virtual de Química**, v. 15, n. 6, p. 1154–1162, 2023.

FERNÁNDEZ, J. et al. Microbial Cellulose from a *Komagataeibacter intermedius* Strain Isolated from Commercial Wine Vinegar. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 27, n. 5, p. 956–967, 1 maio 2019.

FLOREA, M. et al. Genome sequence and plasmid transformation of the model high-yield bacterial cellulose producer *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 53582. **Scientific Reports**, v. 6, 24 mar. 2016.

FOOLADI, S. et al. Bacterial Cellulose-Based Materials: A Perspective on Cardiovascular Tissue Engineering Applications. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, v. 9, n. 6, p. 2949–2969, 12 jun. 2023.

GAO, M. et al. A natural in situ fabrication method of functional bacterial cellulose using a microorganism. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, 1 dez. 2019.

GILBERT, C. et al. Living materials with programmable functionalities grown from engineered microbial co-cultures. **Nature Materials**, v. 20, n. 5, p. 691–700, 1 maio 2021.

GOERS, L.; FREEMONT, P.; POLIZZI, K. M. **Co-culture systems and technologies: Taking synthetic biology to the next level**. **Journal of the Royal Society Interface** Royal Society, , 6 jul. 2014.

GONTARD, N. et al. Edible composite films of wheat gluten and lipids: water vapour permeability and other physical properties. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 29, n. 1, p. 39–50, 13 fev. 1994.

GOPU, G.; GOVINDAN, S. Production of bacterial cellulose from *Komagataeibacter saccharivorans* strain BC1 isolated from rotten green grapes. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 48, n. 9, p. 842–852, 21 out. 2018.

GRESER, A. B.; AVCIOGLU, N. H. Optimization and physicochemical characterization of bacterial cellulose by *Komagataeibacter nataicola* and *Komagataeibacter maltaceti* strains isolated from grape, thorn apple and apple vinegars. **Archives of Microbiology**, v. 204, n. 8, 1 ago. 2022.

HASSAN, E. et al. The Characterization of Bacterial Cellulose Produced by *Acetobacter xylinum* and *Komagataeibacter saccharovorans* under Optimized Fermentation Conditions. **British Microbiology Research Journal**, v. 9, n. 3, p. 1–13, 10 jan. 2015.

HASUNUMA, T.; KONDO, A. Development of yeast cell factories for consolidated bioprocessing of lignocellulose to bioethanol through cell surface engineering. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1207–1218, 1 nov. 2012.

HORWITZ, WILLIAM. **Official methods of analysis of AOAC International**. 18. ed. [s.l.] AOAC International, 2006, 2006.

HUANG, Y. et al. **Recent advances in bacterial cellulose**. **Cellulose**, fev. 2014.

HUANG, Y.-C. et al. Production of bacterial cellulose (BC)/nisin composite with enhanced antibacterial and mechanical properties through co-cultivation of *Komagataeibacter xylinum* and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 258, p. 128977, fev. 2024.

HUR, D. H. et al. Enhanced production of bacterial cellulose in *Komagataeibacter xylinus* via tuning of biosynthesis genes with synthetic RBS. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 9, p. 1430–1435, 28 set. 2020.

IGUCHI, M.; YAMANAKA, S.; BUDHIONO, A. **Review Bacterial cellulose-a masterpiece of nature's arts**. [s.l.: s.n.].

JABBARI, F.; BABAEIPOUR, V.; BAKHTIARI, S. **Bacterial cellulose-based composites for nerve tissue engineering**. **International Journal of Biological Macromolecules** Elsevier B.V., , 30 set. 2022.

JIANG, H. et al. Effect of co-culture of *Komagataeibacter nataicola* and selected *Lactobacillus fermentum* on the production and characterization of bacterial cellulose. **LWT**, v. 173, 1 jan. 2023.

KEISKI, C. L. et al. AlgK Is a TPR-Containing Protein and the Periplasmic Component of a Novel Exopolysaccharide Secretin. **Structure**, v. 18, n. 2, p. 265–273, 10 fev. 2010.

KESHK, S. M. Bacterial Cellulose Production and its Industrial Applications. **Journal of Bioprocessing & Biotechniques**, v. 04, n. 02, 2014.

KESHK, S.; SAMESHIMA, K. Influence of lignosulfonate on crystal structure and productivity of bacterial cellulose in a static culture. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 1, p. 4–8, dez. 2006.

KOLESOVS, S.; RUKLISHA, M.; SEMJONOV, P. Synthesis of bacterial cellulose by *Komagataeibacter rhaeticus* MSCL 1463 on whey. **3 Biotech**, v. 13, n. 3, p. 105, 28 mar. 2023.

LANDIM FRITOLI, C.; KRÜGER, E.; KÜSTER DE PAULA CARVALHO, S. História do papel: panorama evolutivo das técnicas de produção e implicações para sua preservação. **Revista Ibero-Americana de Ciência da Informação**, v. 9, n. 2, p. 475–502, 2016.

LI, W. et al. Improvement in bacterial cellulose production by co-culturing *Bacillus cereus* and *Komagataeibacter xylinus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 313, 1 ago. 2023.

LIMA, F. DE M. T. DE et al. Biocompatible bacterial cellulose membrane in dural defect repair of rat. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 28, n. 3, 1 mar. 2017.

LIN, S.; CHEN, L.; CHEN, H. PHYSICAL CHARACTERISTICS OF SURIMI AND BACTERIAL CELLULOSE COMPOSITE GEL. **Journal of Food Process Engineering**, v. 34, n. 4, p. 1363–1379, 21 ago. 2011.

LIN, W. C. et al. Bacterial cellulose and bacterial cellulose–chitosan membranes for wound dressing applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, n. 1, p. 603–611, 15 abr. 2013.

LIU, K.; CATCHMARK, J. M. Enhanced mechanical properties of bacterial cellulose nanocomposites produced by co-culturing *Gluconacetobacter hansenii* and *Escherichia coli* under static conditions. **Carbohydrate Polymers**, v. 219, p. 12–20, 1 set. 2019.

LOPEZ-SANCHEZ, P. et al. Micromechanics and Poroelasticity of Hydrated Cellulose Networks. **Biomacromolecules**, v. 15, n. 6, p. 2274–2284, 9 jun. 2014.

LU, T. et al. Characterization and optimization of production of bacterial cellulose from strain CGMCC 17276 based on whole-genome analysis. **Carbohydrate Polymers**, v. 232, p. 115788, mar. 2020.

LUO, M.-T. et al. Efficient Using Durian Shell Hydrolysate as Low-Cost Substrate for Bacterial Cellulose Production by *Gluconacetobacter xylinus*. **Indian Journal of Microbiology**, v. 57, n. 4, p. 393–399, 20 dez. 2017.

MAKOTO SHODA; YASUSHI SUGANO. Recent advances in bacterial cellulose production. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, p. 1–8, 2005.

MANEERUNG, T.; TOKURA, S.; RUJIRAVANIT, R. Impregnation of silver nanoparticles into bacterial cellulose for antimicrobial wound dressing. **Carbohydrate Polymers**, v. 72, n. 1, p. 43–51, abr. 2008.

MARCHESSAULT, R. H.; SUNDARARAJAN, P. R. Cellulose. p. 11–95, 1 jan. 1983.

M.C. S, P.; E.F, S.; L.M.F, G. AVALIAÇÃO DO CUSTO DE PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA USANDO SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS. Em: **Inovação Gestão e Sustentabilidade na Agroindústria**. [s.l.] Instituto Internacional Despertando Vocações, 2021. p. 405–410.

MORGAN, J. L. W.; STRUMILLO, J.; ZIMMER, J. Crystallographic snapshot of cellulose synthesis and membrane translocation. **Nature**, v. 493, n. 7431, p. 181–186, 10 jan. 2013.

NAPITUPULU, T. P. et al. Production of Bacterial Cellulose by *Komagataeibacter xylinus* InaCC B404 using Different Carbon Sources. **Current Applied Science and Technology**, v. 22, n. 4, 2022.

OHAD, I.; DANON, D.; HESTRIN, S. **Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum* - Ultrastructure of Polymer**. Israel: [s.n.].

OMADJELA, O. et al. BcsA and BcsB form the catalytically active core of bacterial cellulose synthase sufficient for in vitro cellulose synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 44, p. 17856–17861, 29 out. 2013.

RAISZADEH-JAHROMI, Y. et al. Optimization of bacterial cellulose production by *Komagataeibacter xylinus* PTCC 1734 in a low-cost medium using optimal combined design. **Journal of Food Science and Technology**, v. 57, n. 7, p. 2524–2533, 1 jul. 2020.

Research Moz QY Research.

RIVAS, B. et al. 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**, v. 97, n. 1, p. 93–98, dez. 2004.

RÖMLING, U.; GALPERIN, M. Y. **Bacterial cellulose biosynthesis: Diversity of operons, subunits, products, and functions**. **Trends in Microbiology** Elsevier Ltd, , 1 set. 2015.

RUKA, D. R.; SIMON, P. G.; DEAN, K. M. **Bacterial cellulose and its use in renewable composites**. **Nanocellulose Polymer Nanocomposites: Fundamentals and Applications**. [s.l.] Bacterial Cellulose and its use in renewable composites, 2014.

SALEH, A. K. et al. A low-cost effective media from starch kitchen waste for bacterial cellulose production and its application as simultaneous absorbance for methylene blue dye removal. **Biomass Conversion and Biorefinery**, 2021.

SAMBO, F. et al. Optimizing PCR primers targeting the bacterial 16S ribosomal RNA gene. **BMC Bioinformatics**, v. 19, n. 1, p. 343, 29 dez. 2018.

SCHRAMM, M.; HESTRIN, S. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. v. 56, p. 163–166, 1953.

SEMJONOV, P. et al. Cellulose synthesis by *Komagataeibacter rhaeticus* strain P 1463 isolated from Kombucha. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 3, p. 1003–1012, 27 fev. 2017.

SERAFICA, G.; MORMINO, R.; BUNGAY, H. Inclusion of solid particles in bacterial cellulose. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, n. 6, p. 756–760, 2002.

SHARMA, H. K.; XU, C.; QIN, W. **Biological Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Biofuels and Bioproducts: An Overview. Waste and Biomass Valorization** Springer Netherlands, , 15 fev. 2019.

SHI, Z. et al. **Utilization of bacterial cellulose in food. Food Hydrocolloids**, mar. 2014.

SHPICHKA, A. et al. **Skin tissue regeneration for burn injury. Stem Cell Research and Therapy** BioMed Central Ltd., , 15 mar. 2019.

SINGHANIA, R. R. et al. Developments in bioprocess for bacterial cellulose production. **Bioresource Technology**, v. 344, p. 126343, jan. 2022.

STANDAL, R. et al. A new gene required for cellulose production and a gene encoding cellulolytic activity in *Acetobacter xylinum* are colocalized with the bcs operon. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 3, p. 665–672, fev. 1994.

SUTHERLAND, I. W. Novel and established applications of microbial polysaccharides. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 41–46, jan. 1998.

SWINGLER, S. et al. **Recent advances and applications of bacterial cellulose in biomedicine. Polymers** MDPI AG, , 1 jan. 2021.

Test Method for Tensile Properties of Plastics. West Conshohocken, PA ASTM International, , 15 dez. 2014.

THORAT, M. N.; DASTAGER, S. G. High yield production of cellulose by a: *Komagataeibacter rhaeticus* PG2 strain isolated from pomegranate as a new host. **RSC Advances**, v. 8, n. 52, p. 29797–29805, 2018.

TRACHE, D. et al. Recent progress in cellulose nanocrystals: sources and production. **Nanoscale**, v. 9, n. 5, p. 1763–1786, 2017.

TSOUKO, E. et al. Bacterial cellulose production from industrial waste and by-product streams. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 7, p. 14832–14849, 1 jul. 2015.

TURECK, B. C. et al. Obtaining and characterization of bacterial cellulose synthesized by *Komagataeibacter hansenii* from alternative sources of nitrogen and carbon. **Revista Materia**, v. 26, n. 4, 2021.

TYAGI, N.; SURESH, S. **Isolation and characterization of cellulose producing bacterial strain from orange pulp**. Advanced Materials Research. **Anais...**2013.

TYAGI, N.; SURESH, S. Production of cellulose from sugarcane molasses using *Gluconacetobacter intermedius* SNT-1: Optimization & characterization. **Journal of Cleaner Production**, v. 112, p. 71–80, 20 jan. 2016.

UL-ISLAM, M. et al. Production of bacterial cellulose from alternative cheap and waste resources: A step for cost reduction with positive environmental aspects. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 37, n. 6, p. 925–937, 2 jun. 2020.

ULLAH, H.; SANTOS, H. A.; KHAN, T. Applications of bacterial cellulose in food, cosmetics and drug delivery. **Cellulose**, v. 23, n. 4, p. 2291–2314, 18 ago. 2016.

UMEDA, Y. et al. **Cloning of Cellulose Synthase Genes from *Acetobacter xylinum* JCM 7664: Implication of a Novel Set of Cellulose Synthase Genes**DNA RESEARCH. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://academic.oup.com/dnaresearch/article/6/2/109/526250>>.

Unicamp_Brazil - iGEM. Disponível em: <https://2022.igem.wiki/unicamp-brazil/model>. Acesso em: 5 nov. 2024.

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, 1 jun. 2013.

WANG, B. et al. **Kombucha: Production and Microbiological Research** †. **Foods**MDPI, , 1 nov. 2022.

WANG, S. S. et al. Physicochemical characterization of high-quality bacterial cellulose produced by *Komagataeibacter* sp. strain W1 and identification of the associated genes in bacterial cellulose production. **RSC Advances**, v. 7, n. 71, p. 45145–45155, 2017.

WONG, H. C. et al. **Genetic organization of the cellulose synthase operon in *Acetobacter xylinum* (cellulose biogenesis/cloning/sequencing)** **Proc. Nati. Acad. Sci. USA**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.pnas.org>>.

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

XIMENES, E. et al. Deactivation of cellulases by phenols. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, n. 1, p. 54–60, 5 jan. 2011.

YAMADA, Y. et al. **Description of Komagataeibacter gen. nov., with proposals of new combinations (Acetobacteraceae)** *J. Gen. Appl. Microbiol.* [s.l: s.n.].

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, jun. 2012b.

YANG, Y. et al. Isolation and characteristics analysis of a novel high bacterial cellulose producing strain *Gluconacetobacter intermedius* Cls26. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 2012–2017, 15 fev. 2013.

YE, J. et al. Bacterial cellulose production by a strain of *Komagataeibacter rhaeticus* isolated from residual loquat. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 107, n. 5–6, p. 1551–1562, 1 mar. 2023.

ZHONG, C. Industrial-Scale Production and Applications of Bacterial Cellulose. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, 22 dez. 2020.

ANEXO A

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **"Co-culturas e seus impactos sobre biossíntese de celulose por Komagataebacter"**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 30 de Abril de 2025.

 Documento assinado digitalmente
LARISSA FERNANDES MONTEIRO
Data: 26/05/2025 19:19:08-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Assinatura : _____

Nome do(a) autor(a): **Larissa Fernandes Monteiro**

RG n.º 53.812.354-0

 Documento assinado digitalmente
ELIZABETH BILSLAND
Data: 17/05/2025 19:00:57-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Assinatura : _____

Nome do(a) orientador(a): **Elizabeth Bilsland**

RG n.º 19539646-7

ANEXO B

INFORMAÇÃO IB/CIBIO nº 5/2023



INFORMAÇÃO

INFORMAMOS que o projeto CIBio/IB 2021/03 – “Bioprospecção e biologia sintética para a descoberta de novos antimicrobianos”, cujo pesquisador responsável é a Profa. Dra. Elizabeth Bilsland, sub-projeto “OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA POR KOMAGATAEIBACTER,” da aluna: **Larissa Fernandes Monteiro**, encontra-se devidamente aprovado e regularizado junto a CIBio/IB-UNICAMP e a CTNBio, conforme legislação vigente.

Cidade Universitária “Zeferino Vaz”,
15 de junho de 2023.

Prof. Dr. José Luiz Proença Módena
Presidente da CIBio/Instituto de Biologia - Unicamp

CIBio/IB-Unicamp
Comissão Interna de Biossegurança
Instituto de Biologia - Unicamp
Caixa Postal 6109 - 13063-862 Campinas SP
Tel.: (19) 3521-6359 – e-mail: comisib@unicamp.br

Documento assinado. Verificar autenticidade em sigad.unicamp.br/verifica
Informar código A4AD325F 84654DC0 8920DA8C 37032405

ANEXO C

OF. IB/CIBIO nº 3/2022



Cidade Universitária "Zeferino Vaz",
24 de maio de 2022.

Profa. Dra. Elizabeth Bilsland
Departamento Biologia Estrutural e Funcional
Instituto de Biologia
UNICAMP

Prezado Professor:

Informamos que o projeto CIBio 2021/03/Tipo 1 - "Bioprospecção e biologia sintética para a descoberta de novos antimicrobianos", sob sua responsabilidade, envolvendo OGM do tipo I, foi aprovado pela CIBio-IB/Unicamp para ser desenvolvido nas dependências do Laboratório de Biologia Sintética do Departamento Biologia Estrutural e Funcional do Instituto de Biologia/IB/UNICAMP, nível de biossegurança 1:

Transcrição do parecer

Instalações usadas no projeto:

Biologia Sintética do Departamento Biologia Estrutural e Funcional do Instituto de Biologia.

OGMs:

bactérias - *Escherichia coli* - diversas actinobactérias

levedura - *Saccharomyces cerevisiae* - microorganismos não patogênicos encontrados no solo ou em simbiose com insetos

levedura - *Saccharomyces cerevisiae* - genes sintéticos

RESUMO: A resistência a medicamentos antimicrobianos prejudica nossos avanços contra doenças infecciosas e há uma necessidade urgente de novos candidatos a medicamentos antimicrobianos. Em parceria com a EMBRAPA, exploraremos a rica biodiversidade do Brasil como fonte de novos compostos com a atividade biológica desejada. Actinobactérias e fungos filamentosos microscópicos representam um grande reservatório de moléculas bioativas que podem ser mineradas para novos antimicrobianos com potencial farmacêutico. As equipes da EMBRAPA vão preparar fitoextratos como uma fonte potencial de novos antimicrobianos naturais. Teremos também acesso a microrganismos e amostras de solo coletadas pela EMBRAPA. Tentaremos seu cultivo para preparação de extratos e DNA genômico para sequenciamento. Contudo microrganismos desconhecidos podem ser difíceis de cultivar em laboratório, portanto, nesses casos, prepararemos DNA ambiental para metagenômica. Nosso objetivo é identificar regiões de agrupamento biossintético em tais genomas bacterianos ou fúngicos. Esses fragmentos genômicos podem ser transferidos para hospedeiros não patogênicos de fácil cultivo (bactérias ou leveduras) para edição de genoma criando uma arquitetura adequada para otimização da biossíntese das moléculas em questão.

Decisão: DEFERIDO

Recomendamos que sejam observadas as instruções normativas referentes transporte e contenção da OGMs, disponíveis na webpage da CTNBio <www.ctnbio.gov.br>.

O projeto encontra-se devidamente aprovado e regularizado junto à CIBio/IB-UNICAMP e a CTNBio, conforme legislação vigente.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Luiz Proença Mófena
Presidente da CIBio/Instituto de Biologia – UNICAMP

cc chefe do Departamento Biologia Estrutural e Funcional: Profa. Dra. Cristina Pontes Vicente

CIBio/IB-UNICAMP
Comissão Interna de Biossegurança
Instituto de Biologia - Unicamp
Caixa Postal 6109 - 13083-862 Campinas SP
Tel.: (19) 3521-6359 - e-mail: comiso@unicamp.br