



CARACTERIZAÇÃO TOPOGRÁFICA DA BIOCELULOSE PRODUZIDA POR *KOMAGATAEIBACTER HANSENI* EM MEIO DE SORO DE QUEIJO

MARYANA ROGÉRIA DOS SANTOS; ANDREA FERNANDA DE SANTANA COSTA;
ITALO JOSÉ BATISTA DURVAL; CLÁUDIO JOSÉ GALDINO DA SILVA JUNIOR;
LEONIE ASFORA SARUBBO

RESUMO

A biocelulose é um polímero biodegradável produzido por bactérias do gênero *Komagataeibacter* que apresenta potencial de aplicabilidade em diversas áreas, incluindo embalagens sustentáveis. Este estudo teve como objetivo avaliar a influência da composição do meio de cultivo à base de soro de queijo na topografia superficial dos biofilmes de celulose bacteriana produzidos pela cepa *Komagataeibacter hansenii* UCP1619. O soro de queijo foi suplementado com constituintes do meio HS, formando três diferentes composições: S1 (soro de leite bovino puro), S2 (HS em soro de leite bovino), e S3 (HS em soro de leite bovino sem glicose). Os biofilmes foram cultivados em condições estáticas a 30 °C por 16 dias, seguidos de purificação em NaOH 0,1 M a 80 °C. A análise da topografia superficial foi realizada por microscopia de força atômica e os resultados indicaram que a presença de glicose e peptona no meio S1 levou à formação de um biofilme com maior rugosidade (125,8 nm), sugerindo uma deposição mais intensa, porém desordenada, das fibras de CB. A remoção da glicose no meio S2 reduziu a rugosidade para 27,23 nm, promovendo uma estrutura mais homogênea. No meio S3, a ausência simultânea de glicose e peptona resultou na menor rugosidade (12,43 nm), indicando uma deposição mais regular. Logo, a composição do meio influencia diretamente a morfologia da CB e a modulação dos componentes do meio de cultivo pode ser uma estratégia viável para controlar as propriedades físico-mecânicas, permitindo ajustes conforme a aplicação desejada. Além disso, o soro de queijo se mostrou uma matriz promissora para a produção sustentável de CB, agregando valor a um subproduto da indústria de laticínios.

Palavras-chave: celulose; resíduo; laticínio.

1 INTRODUÇÃO

A celulose bacteriana (CB) é um biopolímero que possui propriedades de grande interesse no setor industrial, como alta pureza, biocompatibilidade e capacidade de retenção de água (YANG *et al.*, 2024). Essas características tornam a CB um material promissor para diversas aplicações, incluindo embalagens sustentáveis e revestimentos funcionais para alimentos (INFANTE-NETA, D'ALMEIDA E ALBUQUERQUE, 2024). Dentre as bactérias produtoras de CB, o gênero *Komagataeibacter* destaca-se pela sua eficiência na síntese de nanocelulose (KHIABANI *et al.*, 2024). *Komagataeibacter hansenii*, por exemplo, possui capacidade de produzir biocelulose com alta cristalinidade, transparência, termoestabilidade e com estrutura altamente porosa, características que influenciam diretamente em propriedades mecânicas e funcionais (VAN *et al.*, 2023; SUNDARAM *et al.*, 2023).

O meio de cultivo utilizado para a produção da biocelulose desempenha um papel fundamental na modulação de suas propriedades estruturais. O soro de queijo, um subproduto da indústria de laticínios, apresenta-se como um meio rico em lactose, proteínas e minerais, composição rica e importante no crescimento microbiano e na biossíntese da celulose (TSERMOULA *et al.*, 2021). No entanto, apesar de seu valor nutricional, o soro de queijo é

frequentemente descartado inadequadamente, contribuindo para impactos ambientais negativos devido à sua alta carga orgânica (CALTZONTZIN-RABELL, FEREGRINO-PÉREZ E GUTIÉRREZ-ANTONIO, 2024). Assim, a utilização desse subproduto lácteo como substrato para a produção de CB representa uma abordagem sustentável, promovendo a valorização de resíduos agroindustriais e a redução de poluentes.

A análise de propriedades da biocelulose para a construção e aplicação industrial do biomaterial é indispensável no processo. A rugosidade superficial, por exemplo, é um parâmetro importante que influencia na adesão do polímero a substratos, nas propriedades mecânicas e na interação com compostos bioativos (PŁOSKA *et al.*, 2024). O uso da Microscopia de Força Atômica (AFM) permite uma análise tridimensional da superfície com resolução nanométrica, possibilitando a avaliação da altura média das irregularidades, a distribuição dos picos e a homogeneidade do material, ou seja, oferece uma visão detalhada da organização estrutural da superfície de um biofilme (WANG *et al.*, 2024).

De acordo com o contexto apresentado, há uma necessidade de desenvolver estratégias sustentáveis para o aproveitamento do soro de queijo, convertendo-o em tecnologia. Além disso, a caracterização de determinados parâmetros, como organização superficial de biopolímeros, permitirá a otimização e melhor direcionamento para aplicações industriais, especialmente no desenvolvimento de embalagens e revestimentos biodegradáveis. Dessa forma, este trabalho busca caracterizar a topografia do filme de biocelulose obtida a partir do cultivo de *K. hansenii* em meio de soro de queijo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Materiais e Reagentes

A bactéria *Komagataeibacter hansenii* UCP1619, fornecida pela Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP), foi utilizada para a produção de celulose bacteriana. O meio de cultura consistiu em 100 mL de soro de queijo suplementado com os componentes do meio HS (Schramm & Hestrin, 1954), resultando em quatro formulações distintas: S1 (HS em soro de leite bovino), S2 (HS em soro de leite bovino sem glicose) e S3 (HS em soro de leite bovino sem glicose e peptona). Todas as formulações foram autoclavadas a 121°C por 20 minutos (Tabela 1).

Tabela 1. Constituintes presentes nos meios de soro de queijo.

| Componente | S1 | S2 | S3 |
|----------------------------|----|----|----|
| D-Glicose (2%) | X | - | - |
| Extrato de levedura (0,5%) | X | X | X |
| Peptona (0,5%) | X | X | - |
| Ácido cítrico (0,15%) | X | X | X |
| Fosfato dissódico (0,27%) | X | X | X |

2.2. Produção da CB em Meio de Soro de Queijo

Após a autoclavagem, 3 mL da suspensão do microrganismo em meio HS (ativado por 72 horas em estufa a 30 °C) foram adicionados a cada meio de cultura. As culturas foram mantidas em estufa a 30 °C por 10 dias, em condições estáticas. Ao final do período de incubação, as membranas de celulose produzidas foram retiradas do meio, lavadas em água corrente e tratadas com NaOH 0,1 M a 80 °C por 2 horas. Em seguida, foram submersas em água destilada até atingirem pH 7. Após a neutralização, as membranas foram submetidas à secagem em estufa a 40 °C por 18 horas.

2.3. Microscopia de Força Atômica

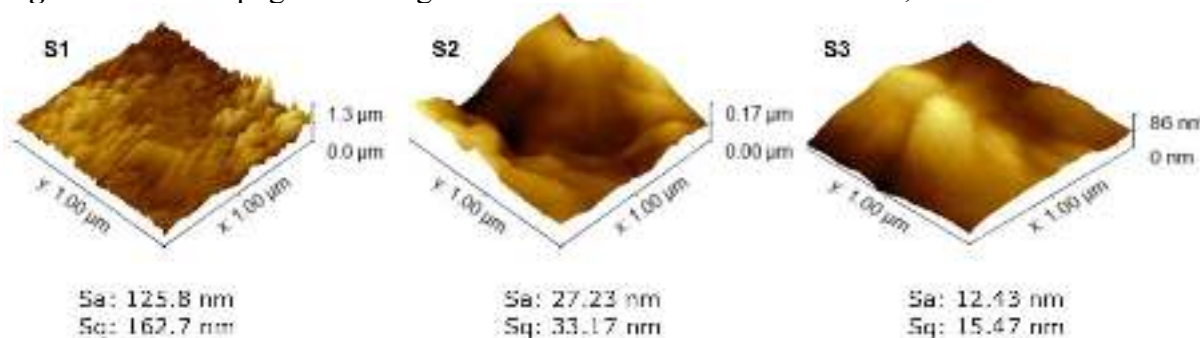
Microscópio de força atômica SPM-9500J2 (Shimadzu Corporation, Japão) foi utilizado, possuindo cantilevers com sonda de silício (modelos Multi 75AL e NCHR). Esses cantilevers apresentam uma frequência ressonante de 75 kHz e constante de força de $3 \text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$. A análise foi conduzida em temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) e a área de digitalização foi de $5 \times 5 \mu\text{m}$, permitindo a obtenção de imagens com resolução lateral de 512×512 pixels. As imagens obtidas foram processadas e analisadas utilizando o software AFM Gwyddion (AVELINO *et al.*, 2022).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A microscopia de força atômica (AFM) permitiu a obtenção de imagens em escala nanométrica, possibilitando a avaliação da influência da composição do meio de cultivo na organização estrutural das fibras de celulose, bem como a quantificação da rugosidade média (Sa) e da rugosidade média quadrática (Sq) (Figura 1). Esse tipo de análise tem sido amplamente utilizado para avaliar propriedades nanomecânicas da superfície e investigar interações biomoleculares em materiais biopoliméricos (ZHAO, KRISTI e YE, 2021).

A Figura 1 demonstra que o biofilme cultivado no meio S1 apresentou a maior rugosidade superficial, com um valor de 125,8 nm. Essa irregularidade pode estar relacionada a uma deposição heterogênea das fibras de celulose, possivelmente influenciada pela presença de glicose e peptona no meio de cultura, que podem ter favorecido um crescimento menos organizado da matriz polimérica. Resultados semelhantes foram reportados por Płoska *et al.* (2024), que observaram uma rugosidade de 281,88 nm em celulose bacteriana obtida por fermentação em soro ácido utilizando *K. xylinus* K2G30 após 14 dias a 28°C sob condições estáticas. Abol-Fotouh *et al.* (2020), por sua vez, relataram uma rugosidade média de $0,55 \mu\text{m}$ em celulose bacteriana produzida por *K. saccharivorans* MD1 em meio HS, após 7 dias de fermentação a 28°C . Nesse último estudo, a maior disponibilidade de macro e micronutrientes do meio HS influenciou significativamente a rugosidade, resultando em valores superiores aos observados no presente trabalho.

Figura 1. Perfil topográfico e rugosidade dos biofilmes celulósicos S1, S2 e S3.



O biofilme formado no meio S2, que não continha glicose, apresentou uma superfície mais homogênea, com um perfil de rugosidade mais regular e um valor de 27,23 nm, significativamente inferior ao observado no meio S1. A ausência de glicose pode ter resultado em uma deposição mais controlada da celulose, favorecendo a formação de uma estrutura menos irregular. No caso do biofilme cultivado no meio S3, no qual tanto a glicose quanto a peptona foram removidas, a rugosidade foi ainda menor, atingindo 12,43 nm. Esses resultados sugerem que, embora a ausência desses componentes tenha influenciado a deposição das fibras, ainda houve a formação de uma superfície relativamente organizada. A redução na rugosidade pode estar associada a um crescimento celular mais lento e controlado, limitando a formação de agregados estruturais na matriz polimérica.

Segundo Cui, Yao e Yim (2021), superfícies de menor rugosidade tendem a apresentar

menor capacidade de absorção de água e menor adesão de microrganismos, o que pode ser vantajoso para aplicações que exigem propriedades antimicrobianas ou resistência à umidade. Por outro lado, uma maior rugosidade pode aumentar a área de contato com outras moléculas, favorecendo modificações superficiais e aumentando a hidrofiliabilidade do material (Płoska et al., 2024).

A comparação entre as amostras reforça a influência determinante da composição do meio de cultura na morfologia superficial da biocelulose. A presença ou ausência de glicose e peptona afeta diretamente a organização das fibras, impactando a rugosidade e, conseqüentemente, as propriedades físico-mecânicas do material. Esses achados são essenciais para o desenvolvimento de aplicações específicas da biocelulose, especialmente na formulação de filmes e revestimentos biodegradáveis, nos quais a rugosidade pode influenciar características como adesão, flexibilidade, molhabilidade e interação com outros materiais.

4 CONCLUSÃO

A análise topográfica revelou que a adição conjunta de glicose e peptona atuou como um fator determinante na promoção da rugosidade do biofilme. Assim, o material cultivado no meio S1, contendo esses componentes, apresentou a maior irregularidade, refletindo uma deposição mais intensa, porém desordenada, das fibras de celulose. A remoção da glicose no meio S2 resultou em uma superfície mais homogênea e menos rugosa, enquanto a eliminação simultânea de glicose e peptona no meio S3 acentuou a regularidade estrutural. Os resultados confirmam que o soro de queijo é uma matriz viável para a produção de celulose e que a composição do meio de cultivo influencia diretamente a morfologia superficial do polímero. Dessa forma, a modulação da formulação do meio surge como uma estratégia promissora para o ajuste das propriedades físico-mecânicas da biocelulose, permitindo sua adaptação conforme a aplicação desejada.

REFERÊNCIAS

- ABOL-FOTOUH, D., HASSAN, M. A., SHOKRY, H., ROIG, A., AZAB, M. S., & KASHYOUT, A. E. H. B. Bacterial nanocellulose from agro-industrial wastes: low-cost and enhanced production by *Komagataeibacter saccharivorans* MD1. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 3491, 2020.
- AVELINO, K. Y., OLIVEIRA, L. S., SANTOS, M. R., LUCENA-SILVA, N., ANDRADE, C. A., & OLIVEIRA, M. D. Electrochemical DNA biosensor for chronic myelocytic leukemia based on hybrid nanostructure. **Bioelectrochemistry**, v. 147, p. 108176, 2022.
- CALTZONTZIN-RABELL, V., FEREGRINO-PÉREZ, A. A., & GUTIÉRREZ-ANTONIO, C. Bio-upcycling of cheese whey: Transforming waste into raw materials for biofuels and animal feed. **Heliyon**, v. 10, n. 12, 2024.
- CUI, L.; YAO, Y.; YIM, E. K. The effects of surface topography modification on hydrogel properties. **APL bioengineering**, v. 5, n. 3, 2021.
- INFANTE-NETA, A. A.; D'ALMEIDA, A. P.; ALBUQUERQUE, T. L. Bacterial Cellulose in Food Packaging: A Bibliometric Analysis and Review of Sustainable Innovations and Prospects. **Processes**, v. 12, n. 9, p. 1975, 2024.
- KHIABANI, A., SARABI-JAMAB, M., SHAKERI, M. S., PAHLEVANLO, A., & EMADZADEH, B. Exploring the Acetobacteraceae family isolated from kombucha SCOBYs

worldwide and comparing yield and characteristics of biocellulose under various fermentation conditions. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 26616, 2024.

PŁOSKA, J., GARBOWSKA, M., RYBAK, K., BERTHOLD-PLUTA, A., & STASIAK-RÓŻAŃSKA, L. Study on application of biocellulose-based material for cheese packaging. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 264, p. 130433, 2024.

SUNDARAM, M. K., NEHRU, G., TADI, S. R. R., KATSUNO, N., NISHIZU, T., & SIVAPRAKASAM, S. (2023). Bacterial cellulose production by *Komagataeibacter hansenii* utilizing agro-industrial residues and its application in coffee milk stabilization. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 13, n. 9, p. 7971-7981, 2023.

TSERMOULA, P., KHAKIMOV, B., NIELSEN, J. H., & ENGELSEN, S. B. (2021). WHEY-The waste-stream that became more valuable than the food product. **Trends in Food Science & Technology**, v. 118, p. 230-241, 2021.

VAN ZYL, E. M., Kennedy, M. A., Nason, W., Fenlon, S. J., Young, E. M., Smith, L. J., BHATIA, S. R., COBURN, J. M. Structural properties of optically clear bacterial cellulose produced by *Komagataeibacter hansenii* using arabinol. **Biomaterials advances**, v. 148, p. 213345, 2023.

Wang, X., Xue, J., Zhu, H., Chen, S., Wang, Y., Xiao, Z., & Luo, Y. Advances in biofilm characterization: utilizing rheology and atomic force microscopy in foods and related fields. **Advanced Composites and Hybrid Materials**, v. 7, n. 5, p. 143, 2024.

YANG, S., DING, Q., LI, Y., & HAN, W. Bacterial cellulose/gelatin-based pH-responsive functional film for food freshness monitoring. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 259, p. 129203, 2024.

ZHAO, L., KRISTI, N., & YE, Z. (2021). Atomic force microscopy in food preservation research: New insights to overcome spoilage issues. **Food Research International**, v. 140, p. 110043, 2021.