

(12) **PEDIDO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2020.04.08**

(30) Prioridade(s):

(43) Data de publicação do pedido: **2021.10.08**

(45) Data e BPI da concessão: /

(73) Titular(es):

UNIVERSIDADE DO MINHO

LARGO DO PAÇO 4704-553 BRAGA

RAIZ - INSTITUTO DE INVESTIGAÇÃO DA

FLORESTA E PAPEL

PT

PT

(72) Inventor(es):

FRANCISCO MIGUEL PORTELA DA GAMA

FERNANDO OCTÁVIO DE QUEIRÓS DOURADO

PAULA CRISTINA DE OLIVEIRA RODRIGUES PINTO

PEDRO MIGUEL SENA DA COSTA BRANCO

ALEXANDRE MIGUEL RICARDO GASPAR

PT

PT

PT

PT

PT

(74) Mandatário:

MARIANA BELO DE OLIVEIRA

RUA DOMINGOS FERREIRA PINTO BASTO, Nº 45 3830-176

ÍLHAVO

PT

(54) Epígrafe: **PROCESSO DE PRODUÇÃO DE NANOCELULOSE BACTERIANA A PARTIR DE BIOMASSA LENHOCELULÓSICA DE EUCALYPTUS GLOBULUS**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE A UM PROCESSO DE PRODUÇÃO DE NANOCELULOSE BACTERIANA ATRAVÉS DE XAROPES DE AÇÚCAR DE BIOMASSA LENHOCELULÓSICA DE EUCALYPTUS GLOBULUS. ESTE PROCESSO CONSISTE NO COZIMENTO DE BIOMASSA LENHOCELULÓSICA DE EUCALYPTUS GLOBULUS, NA HIDRÓLISE DA PASTA RESULTANTE, NA CONSTITUIÇÃO DE MEIOS DE CULTURA QUE INCLUEM OS XAROPES DE AÇÚCAR RESULTANTES, NA INOCULAÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA, NA FERMENTAÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA E NA LAVAGEM DA NANOCELULOSE BACTERIANA OBTIDA. O PROCESSO DESCRITO E MEIOS DE CULTURA ASSOCIADOS PERMITEM A PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA EM RENDIMENTOS COMPARÁVEIS OU MESMO SUPERIORES A OUTROS MEIOS DE CULTURA COMUNS, NÃO NECESSITANDO DE QUALQUER PASSO DE DESINTOXICAÇÃO E SEM POTENCIAR QUALQUER EFEITO INIBITÓRIO NA PRODUÇÃO DE NANOCELULOSE. ADICIONALMENTE PERMITE UMA MAIOR SUSTENTABILIDADE DA INDÚSTRIA DA PASTA E DO PAPEL E NA PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA, AO POSSIBILITAR O USO DE BIOMASSA RESIDUAL.

RESUMO

“PROCESSO DE PRODUÇÃO DE NANOCELULOSE BACTERIANA A PARTIR DE BIOMASSA LENHOCELULÓSICA DE *EUCALYPTUS GLOBULUS*”

A presente invenção refere-se a um processo de produção de nanocelulose bacteriana através de xaropes de açúcar de biomassa lenhocelulósica de *Eucalyptus globulus*. Este processo consiste no cozimento de biomassa lenhocelulósica de *Eucalyptus globulus*, na hidrólise da pasta resultante, na constituição de meios de cultura que incluem os xaropes de açúcar resultantes, na inoculação dos meios de cultura, na fermentação dos meios de cultura e na lavagem da nanocelulose bacteriana obtida. O processo descrito e meios de cultura associados permitem a produção de celulose bacteriana em rendimentos comparáveis ou mesmo superiores a outros meios de cultura comuns, não necessitando de qualquer passo de desintoxicação e sem potenciar qualquer efeito inibitório na produção de nanocelulose. Adicionalmente permite uma maior sustentabilidade da indústria da pasta e do papel e na produção de celulose bacteriana, ao possibilitar o uso de biomassa residual.

DESCRIÇÃO

“PROCESSO DE PRODUÇÃO DE NANOCELULOSE BACTERIANA A PARTIR DE BIOMASSA LENHOCELULÓSICA DE *EUCALYPTUS GLOBULUS*”

Área da Invenção

A presente invenção refere-se a um processo de produção de nanocelulose bacteriana, mais particularmente no que diz respeito a um processo de produção que envolve o uso de biomassa lenhocelulósica de *Eucalyptus globulus*, a meios de cultura que incluem xaropes de açúcar de biomassa lenhocelulósicas de *Eucalyptus globulus* e a nanocelulose bacteriana produzida com o processo e meios de cultura descritos.

Estado da arte

A nanocelulose bacteriana (BNC) é uma forma de celulose sintetizada naturalmente por diferentes espécies de bactérias. Este biopolímero tem um enorme potencial de aplicação em diferentes áreas, como nas indústrias médicas e de cosméticos, em compósitos, nos segmentos alimentares e electrónicos (Jozala et al., 2016). Este potencial de aplicação deve-se a características únicas da nanocelulose bacteriana como, por exemplo, um elevado grau de pureza, porosidade, cristalinidade, elevado grau de polimerização, alta resistência mecânica no estado húmido, alta capacidade de retenção de água, baixa densidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade e não toxicidade (Campano et al., 2016; Hong et al., 2011; Jozala et al., 2016; Tsouko et al., 2015; Yamanaka et al., 1989).

Diferentes estirpes de bactérias têm sido estudadas na produção deste biopolímero. As estirpes *Komagataeibacter* têm sido intensamente estudadas devido à elevada capacidade

de produção de nanocelulose. Estes estudos passam muito pela otimização dos meios de cultura e de todo processo fermentativo, a fim de obter rendimentos superiores, aos habitualmente obtidos.

Apesar das suas propriedades únicas e do seu potencial de aplicação, ainda existem limitações associadas à sua produção industrial devido aos altos custos operacionais e aos baixos rendimentos em nanocelulose bacteriana. Múltiplos esforços têm sido direcionados para promover maiores produtividades e rendimentos, usando matérias-primas de baixo custo, como frutas podres, soro de leite de alfarroba, feijão, e licor de milho como fonte de proteína, melão como fonte de carbono, fermento para cerveja, resíduos de bebidas industriais, cascas de frutas, casca de arroz e sumos de frutas como resíduos industriais de alimentos (Bilgi et al, 2016; Fane et al, 2016; Kumbhar et al, 2015; Kurosumi et al, 2009; Lin et al, 2014). Também foi relatado o uso de efluentes de uma destilaria, do glicerol presente no biodiesel, de lamas com fibras residuais, palha de trigo, milho agrícola, e resíduos de têxteis à base de algodão e águas residuais (Jozala et al, 2015; Chen et al, 2013; Cheng G. et al, 2017; Cheng Z. et al, 2017; Dahman et al, 2010; Hong et al, 2012; Huang et al, 2016; Kongruang et al, 2007; Ruka et al, 2012; Vazquez et al, 2013; Zhao et al, 2018;).

O trabalho de Guo e co-autores descreve diferentes métodos de desintoxicação do hidrolisado de abeto para a produção de nanocelulose bacteriana, sendo esta desintoxicação necessária para se obterem rendimentos elevados (Xiang et al, 2013). A utilização de meio de cultura com hidrolisados de palha de trigo exige também uma desintoxicação, que pode ser conseguida por tratamento com vários compostos alcalinos, incluindo hidróxido de cálcio, hidróxido de

sódio e amônia, e a sua combinação com carvão ativado ou a enzima lacase (Hong et al, 2011).

O documento do pedido de patente US20170283842A1 descreve a produção de nanocelulose bacteriana através do hidrolisado de bagaço de mandioca. No entanto, como descrito no documento em causa, este hidrolisado é ainda sujeito a uma desintoxicação através de, por exemplo, hidróxido de sódio e uma enzima.

O documento US20170283764A1 tem em conta a descrição do processamento de material vegetal para matéria-prima de produção de celulose bacteriana. Mais uma vez, temos aqui a necessidade de passos de desintoxicação com hidróxido de sódio e carvão ativado.

Descrição da invenção

Sumário da Invenção

A presente invenção refere-se a um processo de produção de nanocelulose bacteriana através de xaropes de açúcar de biomassa lenhocelulósica de *Eucalyptus globulus*. Este processo consiste no cozimento de biomassa lenhocelulósica de *Eucalyptus globulus*, na hidrólise da pasta resultante, na constituição de meios de cultura que incluem os xaropes de açúcar resultantes, na inoculação dos meios de cultura, na fermentação dos meios de cultura e na lavagem da nanocelulose bacteriana obtida.

Diferentes biomassas lenhocelulósicas de *Eucalyptus globulus* como fontes de açúcares podem ser usadas, desde casca de *Eucalyptus globulus* até licores resultantes de processos de cozimento da biomassa, como ao sulfato, Kraft, e ao sulfito. De facto, o cozimento envolvido num dos passos da invenção apresentada neste documento pode ser levado a cabo por um destes processos de deslenhificação.

Formas preferenciais desta invenção consideram casca de *Eucalyptus globulus* como a biomassa lenhocelulósica selecionada, cozimento ao sulfato e hidrólise enzimática.

Outro aspecto desta invenção refere-se ao meio de cultura que inclui os xaropes de açúcar de biomassa lenhocelulósica de *Eucalyptus globulus*.

Outro aspecto desta invenção refere-se ainda à nanocelulose produzida através do processo descrito neste documento, que apresenta uma série de propriedades texturais de interesse, e adaptáveis de acordo com a aplicação desejada, no que diz respeito a, por exemplo, resistência à compressão, coesão, resiliência e capacidade de retenção de água.

Olhando com mais detalhe o processo descrito nesta invenção quando considerando o uso de casca de *Eucalyptus globulus*, na indústria da pasta e do papel, cerca de 35% do material que entra nas fábricas de celulose e papel tornam-se resíduos, dos quais, cerca de 56% são usados para recuperação de energia e os restantes 44% não têm uma solução ambiental sustentável (Kamali et al, 2015, Scott et al, 1995). O descarte dos resíduos em aterros sanitários é uma solução cara e prejudicial para o ambiente. Portanto, encontrar novas alternativas para o uso dos resíduos gerados representa uma prioridade emergente na indústria de papel.

A estratégia de usar resíduos como fonte de carbono ou fonte proteica para o meio de cultura permite-lhes dar um destino mais sustentável. Estes resíduos, que não têm valor como produto, trazem custos operacionais devido a tratamentos adicionais para que estes possam ser descartados. Mesmo assim, o descarte será prejudicial para o ambiente. Portanto, o aproveitamento destes resíduos

permite uma maior sustentabilidade de todo o processo, sendo sobretudo benéfico para o ambiente.

É possível verificar que os xaropes de açúcar de biomassa lenhocelulósica de *Eucalyptus globulus* permitem a produção de celulose bacteriana com rendimentos comparáveis ou mesmo superiores a outros meios de cultura comuns e não necessitando de qualquer passo de desintoxicação para a produção de celulose bacteriana, ao contrário do que é documentado na literatura sobre a necessidade de passos de desintoxicação de meios de cultura derivados de outras matérias lenhocelulósicas. Sem potenciar qualquer efeito inibitório na produção de biomassa e de celulose bacteriana, o uso de biomassa de *Eucalyptus globulus* como fonte de carbono, promove uma maior sustentabilidade de todo processo, quer na indústria da pasta e do papel, quer no processo fermentativo de celulose bacteriana.

Descrição Detalhada da Invenção

Descrição das Figuras

Figura 1 - Rendimento de BNC (g/L) produzida com *K.xylinus* ATCC 700178 nos diferentes meios de cultura.

Figura 2 - Rendimento de BNC (g/L) produzida com *K.hansenii* ATCC 53582 nos diferentes meios de cultura.

Exemplos

São apresentados de seguida casos práticos de aplicação da invenção descrita neste documento, em detalhe, mas não limitados a, de acordo com formas preferidas de sua realização.

Os exemplos seguintes têm em conta como exemplo de biomassa lenhocelulósica o uso de uma biomassa residual, a casca de *Eucalyptus globulus*, a inclusão ou não de pré-tratamentos desta biomassa como, por exemplo, extração com água e

álcool, meios de cultura e estirpes bacterianas, cozimento da biomassa ao sulfato, também chamado processo Kraft, que exemplificam a adequabilidade de xaropes de açúcares de biomassa de *Eucalyptus globulus* para a produção de nanocelulose bacteriana, com rendimentos comparáveis ou mesmo superiores a outros meios de cultura comuns e sem ser necessário o processo de desintoxicação característico ao uso de meios de cultura derivados de matéria lenhocelulósica.

Preparação do hidrolisado a partir de casca de *Eucalyptus globulus*

Dois hidrolisados foram obtidos a partir da casca de *Eucalyptus globulus*. A diferença reside na extração prévia realizada na casca de *Eucalyptus globulus*. Hidrolisados obtidos com extração com etanol:água (xaropes de açúcar de biomassa lenhocelulósicas de *Eucalyptus globulus*, EBH₁) e sem extração prévia da casca (xaropes de açúcar de biomassa lenhocelulósicas de *Eucalyptus globulus*, EBH₂). Relativamente a EBH₁, foi levada a cabo uma extração com etanol e água da casca de *Eucalyptus globulus*, num digestor rotativo, com 52% de etanol e 48% de água, v/v, durante 264 minutos à temperatura máxima de 83 °C. Posteriormente, a casca de *Eucalyptus globulus* extraída foi sujeita a cozimento Kraft também em digestor rotativo, a 170°C durante 60 minutos, com carga alcalina de 0,22 (razão entre a massa de alcali ativo, em equivalentes de Na₂O, e a massa de biomassa) e uma razão líquido-sólido de 8:1.

A pasta produzida após cozimento Kraft, à consistência de 5% (percentagem mássica de pasta relativamente ao volume total da hidrólise), foi sujeita a hidrólise enzimática em meio tamponado (tampão citrato de sódio 0,05M), utilizando-se o cocktail enzimático comercial Cellic CTec2® da

Novozymes (carga enzimática de 20 FPU/g hidratos de carbono), à temperatura ótima de 50 °C, com agitação mecânica, durante 24 h.

Preparação de inóculo e fermentação estática das culturas

Duas estirpes de bactérias foram utilizadas para a produção de celulose bacteriana, a *Komagataebacter hansenii* ATCC 53582 e a *Komagataebacter xylinus* ATCC 700178. Ambas as estirpes foram mantidas em meio de cultura Hestrin-Schramm (HS) (Hestrin et al, 1954), no estado sólido com 20.0 (g/L) de ágar (Acros Organics).

As células foram cultivadas em erlenmeyers de 1L, contendo 100 mL de HS com a seguinte composição (em g/L): glicose 20.0 (Fischer chemical), peptona 5.0 (Liofilchem), extrato de levedura (Liofilchem) 5.0, fosfato dissódico 2.27 (Labkem) e ácido cítrico 1.26 (Panreac). O meio de cultura HS trata-se do meio de cultura sintético mais comumente usado para a produção de BNC. Antes do inóculo, o meio HS foi autoclavado a 121 °C durante 20 minutos. Após o inóculo em condições estéreis, as culturas foram incubadas durante 48 h a 30 °C. De seguida, as membranas de celulose formadas, foram agitadas a fim de libertar as bactérias aprisionadas dentro da matriz de celulose, para o meio residual. Este meio residual foi usado como inóculo, correspondendo a 10% (v/v) do volume final a fermentar. Os meios inoculados foram incubados a 30 °C durante 9 dias (a uma profundidade fixa dos meios de cultura de 1 cm de altura em erlenmeyers de 100 mL).

Nas tabelas 1 e 2 está descrito a composição dos diferentes meios de cultura testados para *K. xylinus* 700178 e *K. hansenii* 53582, respetivamente. Para além dos xaropes de açúcar de biomassa lenhocelulósicas de *Eucalyptus globulus* (EBH), também se testou meios de cultura que têm na sua

composição melação, fornecido pela RAR Refinarias de Açúcar Reunidas, S.A. e licor de milho (CSL), fornecido pela COPAM Companhia Portuguesa de Amidos, S.A.; Portugal. A quantidade de açúcares (total e discriminada) foi quantificada por HPLC (descrito em métodos analíticos), no início e fim da fermentação (tabela 3). Aos meios testados com *K. xylinus*, foi adicionado etanol 1.5%(v/v) (tabela 1). Tal como o etanol, a adição de sulfato de amónia apresenta aumentos de rendimento de BNC para a estirpe *K.xylinus* (Rodrigues et al, 2019). Logo, nos meios com os xaropes de açúcar de biomassa lenhocelulósicas de *Eucalyptus globulus*, também foi adicionado o sulfato de amónia (tabela 1). No entanto para a estirpe *K. hansenii*, não foi adicionado etanol nem sulfato de amónia, visto que não é conhecida a influência destes componentes para a estirpe *K. hansenii* (tabela 2). O objetivo deste ensaio, é potenciar a produção de celulose bacteriana com os xaropes de açúcar de biomassa lenhocelulósica de *Eucalyptus globulus* (EBH).

Tabela 1 - Composições dos meios de cultura usados para a estirpe *K. xylinus* 700178.

<i>HS_1</i>	<i>HS_2</i>	<i>Mel_CSL</i>	<i>EBH₁_HS</i>	<i>EBH₂_HS</i>	<i>EBH₁_CSL</i>	<i>EBH₂_CSL</i>
<i>Glicose*</i>	<i>Glicose*</i>	<i>Melão* (total de açucares)</i>	<i>Total de açúcares*</i>			
<i>Extrato de levedura</i> 5.0 g/L		<i>Licor de milho (CSL)</i> 7.0 g/L <i>(total proteína)</i>	<i>Extrato de levedura</i> 5.0 g/L		<i>Licor de milho (CSL)</i> 7.0 g/L <i>(total proteína)</i>	
<i>Peptona</i> 5.0 g/L		-	<i>Peptona</i> 5.0 g/L		-	
-		<i>Sulfato de amónia</i> 0.5 % (w/v)				
<i>Fosfato disódico (Na₂HPO₄)</i>						

2.27 g/L
Ácido cítrico 1.15 g/L
Etanol 1.5 % (v/v)
*Quantidade de açúcares detalhado na tabela 3

Tabela 2 - Composições dos meios de cultura usados para estirpe *K. hansenii* 53582.

HS_1	HS_2	HS_CSL_2	EBH ₁ _HS	EBH ₂ _HS	EBH ₁ _CSL	EBH ₂ _CSL
Glicose*	Glicose*		Total de hidratos de carbono*			
Extrato de levedura 5.0 g/L	Licor de milho (CSL) 7.0 g/L (total proteína)		Extrato de levedura 5.0 g/L		Licor de milho (CSL) 7.0 g/L (total proteína)	
Peptona 5.0 g/L	-		Peptona 5.0 g/L		-	
Fosfato disódico (Na ₂ HPO ₄) 2.27 g/L						
Ácido cítrico 1.15 g/L						
*Quantidade de açúcares detalhado na tabela 3						

Rendimento volumétrico da BNC

Após 9 dias de fermentação, a celulose bacteriana produzida foi lavada com NaOH 0.1 M (Panreac) à temperatura ambiente para remover resíduos do meio de cultura e células aprisionadas. Posteriormente, as membranas foram lavadas com água destilada, também à temperatura ambiente, até o pH do extrato ficar igual ao da água destilada. Após secagem a 37 °C, as membranas secas foram pesadas para calcular o rendimento volumétrico da BNC (g/L) de acordo com a seguinte equação:

$$BNC \left(\frac{g}{L} \right) = \frac{BNC \text{ (estado seco)}}{\text{volume do meio de cultura}}$$

Métodos analíticos

Quantificação total de açúcar e proteínas

Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC) com a coluna Aminex HPX-87H IEX, bomba PU-2080 Plus (JASCO), desgaseificador DG-2080-53 (JASCO), injetor de amostra automático AS12057-Plus 191 (JASCO) e um 2031 Plus O detector RI (JASCO) foi utilizado para identificar e quantificar as concentrações de celobiose, glicose e xilose no hidrolisado de açúcar EBH (e meios EBH). Também foi utilizado para identificar e quantificar as concentrações de sacarose, frutose e glucose do melaço e do meio Mel_CSL. Para o meio de cultura HS, foi quantificada a glicose. As condições utilizadas para a quantificação dos açúcares inicial e residual nos meios de cultura foram as seguintes: taxa de fluxo da fase móvel (H₂SO₄ 5 mM) a 0.05 ml/min; Temperatura da coluna 35°C. O volume injetado foi de 20 µL. A concentração de celobiose, glicose, xilose, sacarose e frutose foram determinadas com base nas curvas de calibração obtidas usando os compostos puros com concentrações variando de 0.01 g/L a 30 g/L. A composição de açúcar no hidrolisado de EBH₁ foi: glicose 131 g/L, xilose 13.2 g/L e celobiose 3.70 g/L. A composição do hidrolisado EBH₂ foi: glicose 70.0, xilose 14.5 e celobiose 4.1. A composição do melaço (g/L) determinada foi: sacarose 687.7, glicose 20.6 e frutose 12.8. A proteína existente no substrato CSL foi determinada pelo método de Kjeldhal (Bradstreet RB, 1954). A digestão da amostra foi realizada num Digester Foss Tecator /Labtec de oito tubos. A

destilação foi realizada num destilador da Foss, Modelo Kjelttec Unidade do analisador 8400. A proteína total presente no CSL foi de 177.1 g/L.

As Figuras 1 e 2 representam os resultados em termos de rendimento de BNC com diferentes meios de cultura. Para a estirpe *K. xylinus* foram testados os meios sintéticos HS_1 (níveis de glicose de 15.6 g/L) e HS_2 (com 45.6 g/L de glicose presente no meio de cultura). Ambos os meios sintéticos apresentaram baixos rendimentos de nanocelulose bacteriana (2.3-2.4 g/L). A produção da BNC com a estirpe *K. xylinus* 700178 atingiu os 7.6 g/L após 9 dias de fermentação (figura 1). Este rendimento, por sua vez, mostra a capacidade produtiva da *K. xylinus*. Logo, este teste foi feito para efeitos de comparação. Os meios que contêm o hidrolisado, com extração prévia etanol:água (EBH₁_HS, EBH₁_CSL) e sem extração prévia (EBH₂_HS, EBH₂_CSL) apresentaram rendimentos inferiores ao Mel_CSL, e superiores aos meios sintéticos (figura 1). O uso do hidrolisado sem extração prévia da casca de *Eucalyptus globulus* (EBH₂), permitiu rendimentos ligeiramente superiores ao hidrolisado que sofreu uma extração prévia com etanol:água (EBH₁), embora não seja uma diferença significativa (figura 1). Verifica-se também, que a interação do substrato EBH₂ e o licor de milho (CSL) renderam uma produção máxima de 4.3 g/L (EBH₂_CSL) (figura 1). O melaço e o licor de milho (CSL) são fontes de carbono e proteína bastante económicas, comumente usadas em fermentações industriais. Como já mencionado, o melaço é composto por sacarose, glicose e frutose, onde a sacarose é a fonte de carbono predominante. Através da tabela 3, observa-se neste meio, um grande consumo de sacarose (93%) e um consumo inferior de glicose (34%), pela *k. xylinus* (tabela 3). O facto da estirpe *K. xylinus* dar preferência a

sacarose, pode explicar o menor rendimento obtido com os hidrolisados EBH, onde não existe sacarose na sua composição (apenas glicose, xilose e celobiose). Outro fator que potencia maiores rendimentos com a estirpe *K. xylinus* é a adição de CSL. Este é um suplemento rico em aminoácidos, vitaminas e minerais, que oferece uma capacidade tamponante ao meio de cultura. É referido na literatura que a produção de BNC vai diminuindo ao longo da fermentação, devido à produção de ácido glicónico, um subproduto que baixa o pH (Tsouko et al, 2015, da Silva et al, 2019). Portanto, com a adição de CSL, o meio de cultura não só tem um efeito tampão, como também apresenta vitaminas e minerais que podem potenciar a produção de BNC.

Na Figura 2, observa-se os rendimentos de BNC obtidos com a estirpe *K. hansenii* 53582. Os meios sintéticos, HS_1 (25 g/L de glicose presente no meio), HS_2 e HS_CSL_2 (com 50 g/L de glicose presente nos meios) apresentam rendimentos de BNC entre 4.2 e 6.6 g/L, sendo o rendimento de BNC superior com o meio HS de menor concentração de glicose (HS_1) (figura 2). Relativamente aos meios EBH₁ e EBH₂ (com 43 e 49 g/L de açúcares totais, respetivamente) os rendimentos de BNC variaram entre os 3 a 5 g/L (figura 2). Valores superiores foram obtidos com o uso do hidrolisado EBH₁, em vez de a adição de EBH₂, embora a diferença não seja significativa. Adicionalmente, a adição de CSL nos meios EBH não promoveu uma maior produção de BNC (figura 2). Entre os ensaios com os hidrolisados EBH, destaca-se o meio EBH₁_HS, pela maior produção de BNC (5.2 g/L) (figura 2). Foram obtidos rendimentos similares com os meios HS_2 e HS_CSL_2 (figura 2). No caso dos meios sintéticos, também se verifica que a adição de CSL não potenciou a produção de BNC. Porém, foi com o meio HS_1 que se verificou um maior rendimento de BNC (6.7 g/L) (figura 2). Isto pode ser

explicado pelo facto que deste meio ter apenas 25 g/L de glicose, enquanto que os restantes meios (sintéticos e com o hidrolisado EBH₁ e EBH₂) têm 40-50 g/L açúcares totais. Tal como já referido na literatura (Tsouko et al, 2015, da Silva et al, 2019), pode haver uma inibição da produção da BNC, pelo facto de haver excesso de fonte de carbono no meio de cultura. Este excesso pode aumentar a produção de ácido glicónico, que por sua vez, inibe a produção de BNC, fruto da diminuição do pH.

Para além dos rendimentos de BNC obtidos, é importante frisar a percentagem de açúcares consumidos durante a fermentação (tabela 3). Estes dados permitem sobretudo verificar se foi consumida toda a fonte de carbono e que fonte de carbono foi mais consumida pela estirpe. Com a estirpe *K.xylinus* 700178, como já mencionado, observa-se um maior consumo de sacarose do que glicose (tabela 3; Mel_CSL). No entanto, como se verifica nos restantes meios, na ausência de sacarose, a estirpe *K.xylinus* também consome glicose. No caso dos meios sintéticos, apenas 60% a 63% de glicose foi consumida enquanto que nos meios com os hidrolisados EBH, o consumo de glicose variou entre os 82 e 97% ao final de 9 dias de fermentação. Importante frisar que este maior consumo de glicose, nos meios com EBH não refletiu em rendimentos de BNC muito superiores (figura 1; tabela 3). No metabolismo da *K. xylinus* o maior consumo de glicose pode ter levado a uma maior produção de subprodutos como o ácido glicónico, como já mencionado, limita a produção de BNC. Relativamente aos consumos de açúcares com *K. hansenii* 53582, observou-se um elevado consumo de glicose nos meios sintéticos, principalmente no meio HS com 25 g/L (94% de glicose consumida) (tabela 3). Nos meios sintéticos com maiores concentrações iniciais de glicose (50 g/L), observaram-se consumos entre os 74 e 84%.

Relativamente ao consumo de açúcares nos meios com EBH, verificou-se um consumo superior de glicose superior (EBH₁_HS-93%; EBH₂_HS-86%) quando o CSL não foi adicionado ao meio de cultura (tabela 3). Os meios EBH com CSL apresentam uma redução no consumo de glicose para os 64 e 76% (tabela 3). Observando o efeito da adição de CSL e os rendimentos de BNC obtidos, verifica-se também que o CSL não potenciou a produção de BNC, para *K. hansenii* 53582 (figura 2; tabela 3). Em ambas as estirpes, nos meios EBH, observou-se consumos de glicose similares, mas foi na estirpe *K. hansenii* que se observou maiores rendimentos de BNC, fruto deste consumo de glicose (figuras 1 e 2; tabela 3). Também em ambas estirpes, verificou-se que a xilose foi consumida nos meios com os hidrolisados EBH (tabela 3). Este consumo rondou os 50% nas duas estirpes com todos os meios, exceto com o meio EBH₁_CSL, com *K. hansenii* 53582 que foi de 90% (tabela 3). No entanto, este consumo é residual comparando com o consumo de glicose, visto que a concentração inicial de xilose nos vários meios, variou entre 1.3 e 8.5 g/L. Relativamente à celobiose presente nos meios EBH, observa-se que estes representam 3-7% do total de açúcares existentes nos meios EBH (tabela 3). Sendo assim, uma quantidade residual de açúcares não disponíveis para consumo, por parte das estirpes *Komagaebacter*.

Da realização destes ensaios, registou-se que os xaropes de açúcar de biomassa lenhocelulósicas de *Eucalyptus globulus* (EBH) não exercem efeito inibitório na produção de biomassa e BNC. Comparando entre estirpes, observou-se rendimentos de BNC superiores com a *K. hansenii* 53582. De referir que as estirpes testadas são diferentes e por isso os componentes utilizados, como os hidrolisados EBH₁ e EBH₂ e CSL acabam por influenciar a produção de BNC, de maneira distinta. Por um lado, o CSL potenciou a produção de BNC,

na estirpe *K. xylinus* mas não teve uma influência significativa nos rendimentos de BNC, para a estirpe *K.hansenii* 53582. Comparando os ensaios com os meios EBH, verifica-se um maior aproveitamento do consumo de açúcares para a produção de BNC, com a estirpe *K. hansenii* do que com *K. xylinus*. Resultados inferiores foram obtidos com a estirpe *K. xylinus* dado que esta estirpe consome preferencialmente sacarose, para a produção de BNC. Os hidrolisados EBH apresentam um grande potencial para a produção de BNC, uma vez que são produzidos através de matéria-prima de baixo custo. O uso da casca de *Eucalyptus globulus* como fonte de carbono, promove uma maior sustentabilidade de todo processo, quer na indústria da pasta do papel, quer no processo fermentativo de BNC.

Tabela 3 - Resultados obtidos por HPLC, relativo ao consumo de açúcares das estirpes testadas nos diferentes meios de cultura.

Estirpe	Meios de cultura	Fonte de carbono	t _{início} (g/L)	t _{final} (g/L)	Consumo açúcares (%)
<i>K. xylinus</i> ATCC 700178	HS_1	Glicose	15.6	6.1	61
	HS_2		45.6	16.8	63
	Mel_CSL	Sacarose	31.2	2.3	93
		Glicose	5.0	3.3	34
		Frutose	2.6	7.9	-200*
	EBH1_HS	Celobiose	1.3	1.3	0*
		Glicose	38.2	4.1	89
		Xilose	5.1	2.8	46
	EBH1_CSL	Celobiose	1.3	1.2	2**
		Glicose	38,1	3.1	92
		Xilose	5.9	2.7	54
	EBH2_HS	Celobiose	4.1	4.0	2**
		Glicose	48.2	1.3	97
		Xilose	1.3	4.1	66
	EBH2_CSL	Celobiose	1.6	2.4	-48**

		Glicose	52.3	9.2	82
		Xilose	8.1	4.0	51
<i>K. hansenii</i> ATCC 53582	HS_1	Glicose	25.2	1.5	94
	HS_2		49.8	13.0	74
	HS_CSL_2		50.7	8.2	84
	EBH1_HS	Celobiose	1.4	2.2	-61**
		Glicose	35.4	2.6	93
		Xilose	5.5	3.1	44
	EBH1_CSL	Celobiose	1.2	1.7	-37**
		Glicose	35.1	12.8	64
		Xilose	6.0	0.6	90
	EBH2_HS	Celobiose	2.0	3.3	-65**
		Glicose	48.1	6.8	86
		Xilose	7.8	4.3	44
	EBH2_CSL	Celobiose	1.6	3.3	-114**
		Glicose	49.4	11.6	76
		Xilose	8.5	4.3	49
*Frutose formada durante o consumo de sacarose, durante a fermentação;					
**Celobiose não é consumida durante a fermentação;					

Referências

Bilgi, E., et al., Optimization of bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* using carob and haricot bean. *International journal of biological macromolecules*, 2016. 90: p. 2-10.

Bradstreet RB (1954) Kjeldahl method for organic nitrogen. *Anal Chem* 26(1):185-187

Campano, C., et al., Enhancement of the fermentation process and properties of 76 bacterial cellulose: a review. *Cellulose*, 2016. 23(1): p. 57-91.

Chen, L., et al., Biotransformation of wheat straw to bacterial cellulose and its 118 mechanism. *Bioresource technology*, 2013. 135: p. 464-468. 119

Chen, G., et al., Bioconversion of waste fiber sludge to bacterial nanocellulose and use 120 for reinforcement of CTMP paper sheets. *Polymers*, 2017. 9(9): p. 458. 121

Cheng, Z., et al., Green synthesis of bacterial cellulose via acetic acid pre-hydrolysis 115 liquor of agricultural corn stalk used as carbon source. *Bioresource technology*, 2017. 116 234: p. 8-14.

Dahman, Y., K.E. Jayasuriya, and M. Kalis, Potential of biocellulose nanofibers 109 production from agricultural renewable resources: preliminary study. *Applied 110 biochemistry and biotechnology*, 2010. 162(6): p. 1647-1659.

da Silva, F. A. S., et al., Optimization of bacterial nanocellulose fermentation using recycled paper sludge and development of novel composites. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019. 103 (21-22): p. 9143-9154.

Fan, X., et al., Production of nano bacterial cellulose from beverage industrial waste 85 of citrus peel and pomace using *Komagataeibacter xylinus*. *Carbohydrate Polymers*, 86 2016. 151: p. 1068-1072.

Hong, F., et al., Wheat straw acid hydrolysate as a potential cost-effective feedstock for 82 production of bacterial cellulose. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 83 2011. 86(5): p. 675-680.

Hong, F., et al., Bacterial cellulose production from cotton-based waste textiles: enzymatic saccharification enhanced by ionic liquid pretreatment. *Bioresource 101 Technology*, 2012. 104: p. 503-508.

Hestrin, S., et al., Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. 2. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. *Biochem Journal*, 1954. 58(2): p. 345-352.

Huang, C., et al., Using wastewater after lipid fermentation as substrate for bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus*. *Carbohydrate polymers*, 2016. 136: 104 p. 198-202.

Jozala, A.F., et al., Bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* by 128 employing alternative culture media. *Applied microbiology and biotechnology*, 2015. 129 99(3): p. 1181-1190.

Jozala, A.F., et al., Bacterial nanocellulose production and application: a 10-year overview. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016. 100(5): p. 2063-2072.

Kamali, M., et al., Review on recent developments on pulp and paper mill wastewater treatment. *Ecotoxicol Environ Saf.*, 2015. 114: p. 326-42.

Kongruang, S., Bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* strains from 106 agricultural waste products, in *Biotechnology for Fuels and Chemicals*. 2007, 107 Springer. p. 763-774.

Kumbhar, J.V., J.M. Rajwade, and K.M. Paknikar, Fruit peels support higher yield and 88 superior quality bacterial cellulose production. *Applied microbiology and biotechnology*, 2015. 99(16): p. 6677-6691

Kurosumi, A., et al., Utilization of various fruit juices as carbon source for production of bacterial cellulose by

Acetobacter xylinum NBRC 13693. Carbohydrate Polymers, 92 2009. 76(2): p. 333-335.

Lin, D., et al., Production of bacterial cellulose by Gluconacetobacter hansenii 94 CGMCC 3917 using only waste beer yeast as nutrient source. Bioresource technology, 95 2014. 151: p. 113-119.

Mota, I., et al., Extraction of Polyphenolic Compounds from Eucalyptus globulus Bark: Process Optimization and Screening for Biological Activity. Industrial & Engineering Chemistry Research, 51(20) 2012: p. 6991-7000.

Rodrigues, A.C., et al, Response surface statistical optimization of bacterial nanocellulose fermentation in static culture using a low-cost medium. New biotechnology, 49, 2019: p. 19-27.

Ruka, D.R., G.P. Simon, and K.M. Dean, Altering the growth conditions of 125 Gluconacetobacter xylinus to maximize the yield of bacterial cellulose. Carbohydrate polymers, 2012. 89(2): p. 613-622.

Scott G.M., et al., Sludge characteristics and disposal alternatives for the pulp and paper industry. Tappi Intern. Environ. Conf., Tappi Press, 1995, pp 269-279.

Tsouko E., et al., Bacterial cellulose production from industrial waste and by-product streams. International Journal of Molecular Sciences, 2015. 16(7): p. 14832-14849.

Vazquez, A., et al., Bacterial cellulose from simple and low cost production media by Gluconacetobacter xylinus. Journal of Polymers and the Environment, 2013. 21(2): p. 545-554.

Yamanaka, S., et al., The structure and mechanical properties of sheets prepared from 80 bacterial cellulose. *Journal of Materials Science*, 1989. 24(9): p. 3141-3145.

Xiang, G., et al., Comparison of methods for detoxification of spruce hydrolysate for bacterial cellulose production. *Microbial Cell Factories*, 2013. 12(93).

Zhao, H., et al., Production of bacterial cellulose using polysaccharide fermentation 112 wastewater as inexpensive nutrient sources. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2018. 32(2): p. 350-356.

Aveiro, 5 de Abril de 2021

Reivindicações

1. Processo para produção de nanocelulose bacteriana, caracterizado pelo uso de xaropes de açúcar de biomassa lenhocelulósica de *Eucalyptus globulus* e que compreende os seguintes passos:
 - cozimento de biomassa lenhocelulósica de *Eucalyptus globulus*;
 - hidrólise da pasta resultante;
 - constituição de meios de cultura que incluem os xaropes de açúcar resultantes;
 - inoculação dos meios de cultura;
 - fermentação dos meios de cultura;
 - lavagem da nanocelulose bacteriana obtida.
2. Processo, de acordo com a reivindicação anterior, caracterizado por a biomassa lenhocelulósica ser casca de *Eucalyptus globulus*.
3. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado por o cozimento da biomassa lenhocelulósica de *Eucalyptus globulus* ser um cozimento ao sulfato.
4. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado por a hidrólise ser enzimática.
5. Meio de cultura caracterizado por compreender xaropes de açúcar de biomassa lenhocelulósica de *Eucalyptus*

globulus obtido pelo processo descrito nas reivindicações de n.º 1 a 4.

6. Nanocelulose caracterizada por ser obtida pelo processo de produção descrito nas reivindicações n.º 1 a 4.

Aveiro, 5 de Abril de 2021

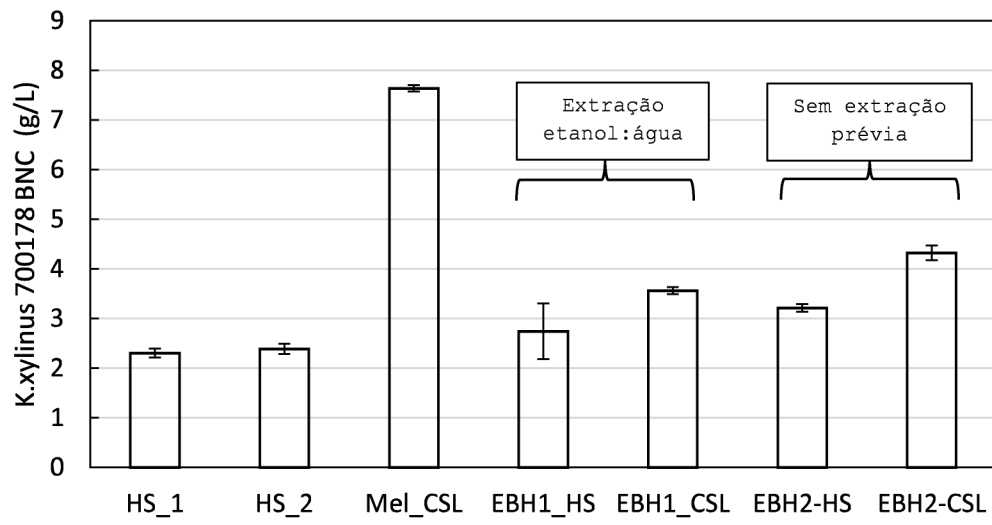


Figura 1

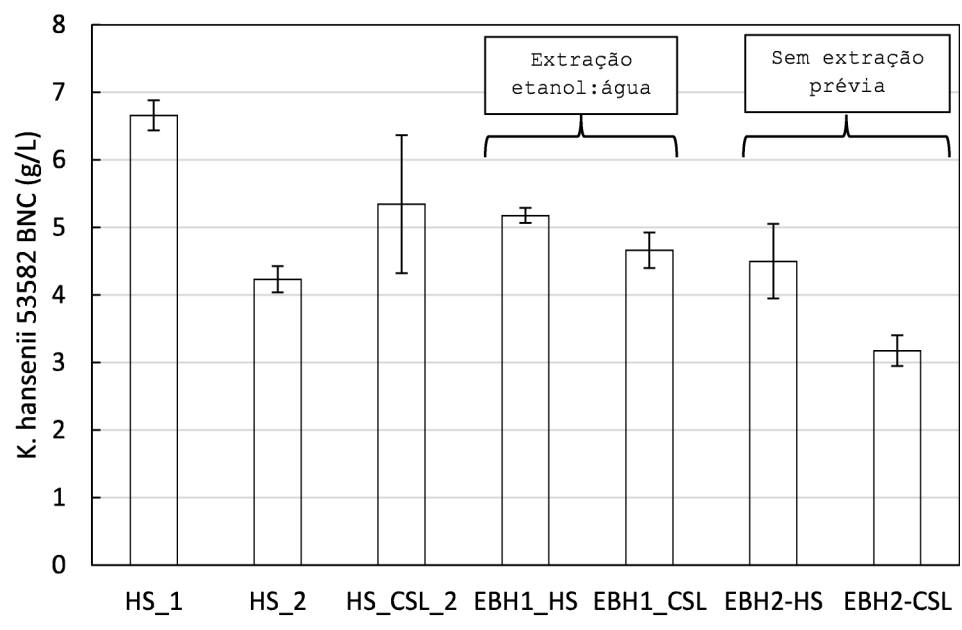


Figura 2