

# Produção e Caracterização de Acetan

**Título corrido: Produção de Acetan**

## RESUMO

*O acetan é um heteropolissacarídeo aniônico solúvel em água, sintetizado por estirpes de bactérias Gram-negativas produtoras de celulose, do gênero *Gluconacetobacter*. É oriundo de produtos secundários da síntese de celulose bacteriana a partir da glicose e é muito menos estudado que a celulose produzida pelo mesmo micro-organismo. O objetivo deste estudo foi produzir e caracterizar os exopolissacarídeos solúveis (EPS e EPS-HE) produzidos por *G. hansenii* a fim de quantificá-los e determinar a presença de acetan. O polissacarídeo foi sintetizado pela cepa *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 23769, em meio Hestrin-Schramm (HS) por cultivo estático. Em seguida foi extraído do caldo de cultura por centrifugação, precipitação com etanol e diálise. Para obtenção dos EPS-HE, as membranas de celulose foram tratadas com NaOH 4 M, seguida de filtração em membrana de diálise. Amostras hidrolisadas e não-hidrolisadas de EPS foram avaliadas quanto à composição de açúcares por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O rendimento de acetan foi de  $0,058 \pm 0,008$  g/L, de celulose bacteriana,  $0,288 \pm 0,05$  g/L e as membranas apresentaram espessura de  $0,403 \pm 0,158$  mm. Não foi obtido êxito na identificação de acetan nem de seus produtos de hidrólises pelo método testado usando CLAE.*

**Palavras-chave:** Polissacarídeos bacterianos, celulose, *Gluconacetobacter*.

## INTRODUÇÃO

Os exopolissacarídeos (EPS) microbianos têm curto período de produção e simples extração. Em comparação os de outras fontes naturais. Os bioprocessos microbianos são realizados em fermentadores, não concorrendo com linhas de produção de alimentos, e permitem utilizar resíduos como matérias-primas. Além disso, esses polissacarídeos apresentam elevada variedade de estruturas e propriedades físico-químicas, tornando-os aplicáveis em áreas que variam desde a sua utilização como biomateriais ou como modificadores reológicos de sistemas aquosos, até como agentes terapêuticos<sup>1</sup>.

As propriedades reológicas de EPS microbianos são únicas; principalmente devido à sua capacidade de formar fluidos pseudoplásticos. Xantana, levana, alginato, gelana, celulose, ácido hialurônico, succinoglicano, acetan, glucuronan e ácido colônico são alguns EPS microbianos com aplicação industrial, tais como espessantes, emulsificantes ou agentes gelificantes em baixas concentrações<sup>2,3</sup>.

*Gluconacetobacter hansenii* é uma bactéria Gram-negativa, capaz de sintetizar grandes quantidades de exopolissacarídeos solúveis e celulose bacteriana<sup>4</sup>. Bactérias do gênero *Gluconacetobacter* podem utilizar diversas fontes de carbono para produzir polissacarídeos. A biossíntese destes produtos por bactérias é geralmente realizada utilizando glicose como fonte de carbono, mas, outras fontes também estão sendo empregadas, como a galactose, cuja estrutura é muito semelhante à da glicose diferindo apenas pela configuração do grupo hidroxila na posição C4<sup>5</sup>.

Acetan é um exopolissacarídeo hidrossolúvel produzido por bactérias do gênero *Gluconacetobacter*, possui estrutura similar à da goma xantana e propriedades espessantes e gelificantes. É composto de D-glicose, D-manose, r-rhamnose e ácido D-glucurônico, nas proporções relativas 3-4: 1: 1: 1, e sua forma estrutural é formada por uma espinha dorsal de celulose, no qual um resíduo de tetra- ou penta-sacarídeo está ligado à posição 3 de cada resíduo de beta-D-glucopyranosyl<sup>6,7,8</sup>. Sua síntese por *Gluconacetobacter* ocorre simultaneamente à da celulose bacteriana e, na maioria dos trabalhos é estudado em função deste último polissacarídeo. A elucidação de sua biossíntese, dos fatores que influenciam sua produção e o conhecimento de suas aplicações ainda carecem de muita pesquisa. Dentro dessas áreas de pesquisa, uma enorme diversidade de polissacarídeos microbianos foram identificados, entretanto, o potencial para o desenvolvimento industrial foi explorado apenas para alguns, dentre os quais o acetan é o menos explorado<sup>1</sup>. A produção de filmes é uma das muitas aplicações de polímeros e os exopolissacarídeos microbianos são vantajosos por serem biodegradáveis, por sua produção não estar sujeita a variações sazonais e não requererem o rompimento celular para sua extração. Porém, nem todos são bons formadores de filmes e tal

propriedade amplia as suas opções de aplicação. Nesse contexto, o presente estudo visa produzir acetan, como forma de contribuir para aumentar a quantidade de informações disponíveis sobre este exopolissacarídeos e, conseqüentemente, torná-lo alvo de pesquisas relacionadas a aplicações industriais.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Tratou-se de um trabalho laboratorial, realizado de outubro de 2017 a setembro de 2018, nos laboratórios de tecnologia de alimentos e de medicamentos, e de microbiologia do Centro Universitário Tabosa de Almeida (ASCES-UNITA).

### Preparo do inóculo e fermentação

As cepas de *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 23769 foram adquiridas na Fundação André Tosello - Coleção de Culturas Tropical (CCT). As células foram cultivadas no meio Hestrin-Schramm (HS), contendo glicose a 2% (p/v), peptona a 0,5% (p/v), extrato de levedura a 0,5% (p/v), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> a 0,27% (m/v) e ácido cítrico a 0,12% (p/v), com o pH final ajustado para 5,0<sup>5</sup>. Os inóculos foram preparados por transferência de 5 colônias crescidas durante 24 h em ágar HS, para tubos contendo 5 mL, que foram incubados durante 48 h. Em seguida, procedeu-se ao aumento de escala, transferindo-se o volume para frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 45 mL do meio de cultura por 3 dias, em cultivo estático a 30 °C. As culturas resultantes (50 mL), foram transferidas para frascos Erlenmeyer de 1000 mL, contendo 450 mL do mesmo meio de cultivo durante 7 dias, nas mesmas condições da etapa anterior. Toda a produção e todas as determinações analíticas foram realizadas em triplicata ou em quintuplicata.

### Exopolissacarídeos livres (EPS livres) e Difíceis de extrair (EPS-HE)

No final da fermentação, as películas foram recolhidas e submersas em solução de NaOH a 0,1 M, seguida de enxágue até se obter um pH 7,0. Para colher EPS livres, o caldo foi centrifugado (Centrífuga Excelsa® II Mod 206 BL) para remoção das células e, ao caldo sem células, adicionou-se KCl a até 1% (p/v) para solubilização das proteínas. Adicionaram-se quatro volumes de etanol e centrifugou-se a 3500 rpm por 20 minutos. O sedimento de EPS foi dissolvido no menor volume possível de água destilada e tal solução foi dialisada em membrana com poros de 12.000 Da (“cut-off”), submersas em água destilada à temperatura de 30 °C, durante 24 horas. Os EPS-HE foram extraídos dos filmes de celulose bacteriana por submersão das membranas em solução aquosa de NaOH a 4 M durante a noite, à temperatura ambiente. Em seguida, foram neutralizadas até atingir pH 7 e os sais removidos por diálise em água deionizada por 24 horas<sup>5</sup>. A solução de dentro do saco de diálise foi transferida quantitativamente para um béquer e a este adicionado KCl a 1% (p/v) e os EPS-HE foram insolubilizados pela adição de 2 volumes de etanol, centrifugados a 3500 rpm por 20 min e o sedimento dissolvido no mínimo volume de água destilada.

### Rendimento de acetan/EPS livres e celulose bacteriana (CB)

Após a extração, as soluções de EPS foram depositadas em cadinhos previamente pesados, então, estes foram submetidos à secagem em estufa (Nevoni® 1.1) à temperatura de 50 °C, para evaporação da água e resquícios de solventes. As membranas de celulose foram depositadas em placas de Petri também previamente pesadas e acondicionadas em dessecador. Os cadinhos e as placas foram pesados em balança analítica a cada hora até a obtenção de valores constantes pelo menos 3 vezes consecutivas. Os cálculos de rendimento dos EPS livres foram realizados através da seguinte fórmula:

$$\text{Rendimento do EPS (g/L)} = \frac{\text{Peso dos EPS secos}}{\text{Volume do meio fermentativo}}$$

Onde, os rendimentos foram determinados por uma relação entre o volume do meio fermentativo utilizado e o peso dos EPS. Este peso foi calculado através da subtração do peso do cadinho em gramas contendo os EPS, pelo cadinho vazio, de acordo com a expressão:

$$\text{Peso do EPS (g)} = (\text{recipiente} + \text{EPS secos}) - \text{recipiente vazio}$$

## Hidrólise

Preparou-se uma solução de acetan na concentração de 15,5 mg/mL, que foi hidrolisada com HCl a 0,1 M e aquecida em banho-maria à temperatura de 100°C durante 1 hora<sup>9</sup>. Em seguida, retirou-se uma alíquota de 400 µL desta solução e diluída em água na concentração de 30 mg/L. Posteriormente, a solução de acetan diluído foi neutralizada com NaOH. Uma solução de acetan não-hidrolisado foi preparada diluindo a solução concentrada em água destilada, na concentração de 30 mg/L, equivalente à concentração média de carboidratos usada na construção da curva de calibração construída por Li et al (2016).

## Determinação de monossacarídeos por CLAE

Os açúcares foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE (Shimadzu Prominence®) acoplado com 2 bombas LC- 20AD, detector SPD-10A, controlador CBM 20A e injetor manual em coluna de fase reversa C18 4,6 mm × 150 mm 5 µm (Gemini OOF-4435-EO). Para a fase móvel preparou-se uma solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 0,5 mmol/L diluída em água destilada, com a coluna mantida à temperatura de 30 °C, vazão de 1 mL/min e o volume de injeção foi de 20 µL<sup>9,10</sup>. Preparou-se concentrações do padrão de glicose de 80, 72, 60, 48, 40, 30, 20 e 10 mg/L em água destilada para a construção da curva de calibração.

## Análise de dados

As informações obtidas foram calculadas por técnicas estatísticas descritivas através de distribuições absolutas, percentuais de medidas e técnicas de estatísticas inferenciais. O software utilizado foi o Microsoft® Office Excel 2013.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Produção de acetan (EPS solúveis)

Após a adição do etanol, o acetan precipitou no fundo dos béqueres e tinha uma coloração amarelo-clara (Figura 1). Posteriormente à centrifugação, os EPS mudaram a coloração para marrom ao entrarem em contato com um bastão de vidro (Figura 1).

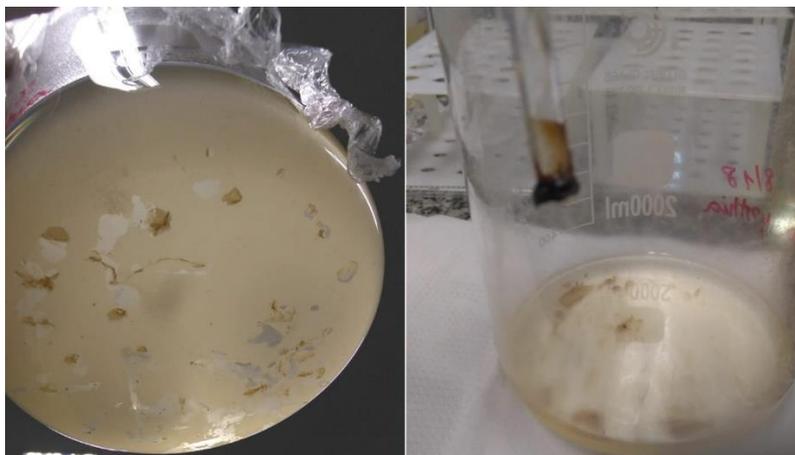


FIGURA 1- Acetan precipitado antes da centrifugação (esquerda) e após a centrifugação, aderidos ao bastão (direita).

O rendimento da fermentação para a produção dos polissacarídeos solúveis, em triplicata, no meio fermentativo Hestrin-Schramm, obtiveram um valor de  $0,058 \pm 0,008$  g/L, diferente do observado com a mesma cepa nos experimentos realizados por Fang e Catchmark (2015) utilizando o mesmo meio, em que relataram que a estirpe não produziu uma quantidade significativa de EPS solúvel em água (0,00 g/L) em comparação a outras cepas de *Gluconacetobacter* empregadas no estudo (*G. xylinus* 53524, *G. hansenii* 53582 e *G. xylinus* 700178), que produziram 0,54; 1,05 e 1,46 g/L de EPS, respectivamente, em meios com

glicose ou com galactose como fontes de carbono. Neste mesmo estudo, ao substituir a glicose por galactose na composição do meio, o rendimento dos EPS da ATCC 23769 produziu 0,06 g/L de EPS. Os autores afirmam que estes resultados podem ter ocorrido devido a algum déficit de genes, proteínas ou enzimas associadas à síntese de EPS na cepa ATCC 23769 a partir de glicose. Os autores afirmaram que a via sintética de EPS da cepa possibilita a produção a partir de a glicose, mas que outros fatores podem estar relacionados à produção de EPS, como velocidade de agitação do meio, fornecimento de oxigênio, pH, temperatura, entre outros.

Ishida et al (2003) descreveram a produção de acetan, empregando a cepa *Gluconacetobacter xylinum* BPR2001 em meio CSL-Frutose e obtiveram um rendimento de 1,5 g/L. Este meio possui uma alta complexidade na sua formulação pela abrangência de componentes, mesmo em pequenas concentrações, que contribuem para uma maior produção de acetan comparado a outros estudos, além da diferente cepa utilizada, comparando-se ao presente estudo.

A suplementação do meio com fontes nitrogenadas e de carbono fornecido como nutrientes às bactérias influenciam nos rendimentos de EPS, dependendo de sua composição e quantidades relativas. Desta forma, constituem um dos principais fatores relacionados à produção eficiente de EPS<sup>12,13,14</sup>. Valepyn et al (2012) analisaram a influência de substratos de carbono e nitrogênio na produção de polissacarídeos, onde a maior produtividade de EPS foi obtida com alditóis e o glicerol (0,3 g/L), enquanto a glicose foi a fonte de carbono mais eficiente para o crescimento bacteriano. O nitrogênio fornecido na forma de íon amônio foi a melhor fonte para a síntese de polímeros (1,22 g/L) enquanto a cisteína com CaCO<sub>3</sub> foi a mais eficiente para o crescimento bacteriano (0,77 g/L). Desta forma, estes estudos corroboram com o presente estudo, pois confirmam a interferência dos nutrientes, que estão diretamente relacionados à via de síntese dos EPS aplicada pelos micro-organismos.

Neste estudo, foi utilizada a glicose como fonte de carbono. De acordo com a literatura, a produção de EPS e CB são inversamente relacionadas sob diferentes fontes de carbono, considerando que as vias sintéticas de ambos iniciam com UDP-glicose e portanto, pode ocorrer uma competição por este substrato, então um aumento na produção de EPS livre pode reduzir a produção de celulose e vice-versa<sup>5</sup>.

### **Produção de celulose bacteriana (CB)**

Ao término da fermentação, as películas de celulose bacteriana possuíam uma coloração esbranquiçada e flexibilidade, como já descrito na literatura (Figura 2). Após o tratamento com NaOH 4 M, as películas encolheram significativamente com relação ao tamanho inicial e posteriormente à secagem, as membranas se tornaram amareladas, rígidas e também ocorreu uma diminuição na espessura (Figura 2).



FIGURA 2 – Membrana de celulose após a fermentação (esquerda) e após secagem (direita).

Esta mudança ocorreu devido à remoção de impurezas do meio de fermentação e pela extração dos polissacarídeos aderidos à membrana, pois ainda podem continuar retidos sem este tratamento em solução alcalina concentrada. O rendimento celulose bacteriana obtido no processo fermentativo foi de  $0,288 \pm 0,05$

g/L após a extração de EPS-HE, e as espessuras das membranas de celulose obtiveram valores de 0,403 mm  $\pm$  0,15 mm.

Lima e colaboradores (2017) obtiveram um rendimento de celulose de cerca de 0.90  $\pm$  0.13 g.L<sup>-1</sup> de celulose com a cepa ATCC 23769 em meio HS glicose, incubados a 30 °C por cultivo estático, quase o triplo em comparação ao presente estudo. Tais resultados podem ser explicados pela extração dos EPS-HE das membranas, que resultaram na diminuição do rendimento em celulose bacteriana. Estudos de Toyosaki et al (1995) obtiveram a maior produção de celulose (2,4 g/L) obtido de *G. xylinus* ATCC 23769, cultivada em meio CSL-Frutose. De acordo com a literatura, a glicose é o açúcar mais utilizado para a biossíntese de CB, porém esse substrato gera vários subprodutos, como ácido glucônico, o que acarreta baixos rendimentos<sup>17</sup>.

Estudos recentes de Zywicka et al (2018) mostraram um aumento significativo da produção de CB por *Komagataeibacter xylinus* DSM 46602 com uma simples técnica de suplementação de meio de cultura HS com 1% de óleo vegetal, que aumentou a produção em mais de 500% comparado ao meio padrão HS. Este aumento significativo da produção está relacionado a processos físico-químicos microscópicos e macroscópicos, que refletem uma interação complexa entre a biofisiologia de *K. xylinus*, como processos químicos de síntese de CB e forças físico-químicas entre as membranas, o óleo e interação com as paredes dos frascos Erlenmeyer utilizados na fermentação.

### **Composição monossacarídica**

As amostras de acetan / EPS solúveis hidrolisadas e não-hidrolisadas foram injetadas nas condições descritas anteriormente, entretanto, diferentemente do verificado por Li et al (2016) que obtiveram o acompanhamento das concentrações de monômeros como ácido glicurônico, não foram identificados picos do polissacarídeo ou de seus monômeros. A diferença entre os métodos foi a temperatura do forno, que na presente estudo foi realizada a 20°C e os autores efetuaram a análise a 30°C e comprimento da coluna (150 mm e 250 mm, respectivamente. Li et al (2012) utilizaram o método semelhante para detecção de metabólitos extracelulares no meio fermentativo, com a mudança da temperatura do forno para 65°C. A temperatura influencia na separação dos componentes de uma amostra e segundo Borges et al (2010), no fator de retenção de um soluto, que é determinado pela razão das quantidades das moléculas retidas na fase estacionária ou percorrendo a coluna na fase móvel e também é relacionado à razão dos tempos que as moléculas ficam retidas na fase estacionária e na fase móvel. Portanto, podemos afirmar que os EPS interagem com a coluna cromatográfica apenas em condições mais elevadas de temperatura do que nas condições testadas.

## **CONCLUSÃO**

As fontes de nutrientes adicionadas ao meio fermentativo influenciam diretamente na síntese de acetan e outros EPS, como também na produção de celulose bacteriana. A cepa *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 23769 obteve, nas condições testadas, um maior rendimento em celulose, de 0,288  $\pm$  0,05 g/L em comparação a produção de acetan (0,058  $\pm$  0,008 g/L). Os resultados foram semelhantes a outros estudos nas mesmas condições com o meio HS, porém, o presente estudo mostrou melhores resultados em cultivo estático em comparação a agitação. Além disso, as fontes de carbono e nitrogênio acarretam alterações no rendimento de EPS. Quanto a determinação da composição de monômeros do acetan, é necessário testar o mesmo método de análise por cromatografia líquida ou outros métodos em diferentes condições de temperatura.

## **REFERÊNCIAS**

- 1- Freitas F, Torres CAV, Reis, MAM. Engineering aspects of microbial exopolysaccharide production. *Bioresource Technol.* 2017; 245: 1674-1683.
- 2- Khan T, Khan H, Park JK. Physical properties of a single sugar  $\alpha$ -linked glucuronic acid-based oligosaccharide produced by a *Gluconacetobacter hansenii* strain. *Process Biochem.* 2007; 42 (2): 252-257.

- 3- Nampoothiri KM, Beenaa DJ, Vasanthakumaria DS, Ismail B. Health Benefits of Exopolysaccharides in Fermented Foods. In: Frías J, Martínez-Villaluenga C, Peñas E, editors. *Fermented Foods in Health and Disease Prevention*. United Kingdom: *Academic Press*; 2016. p. 49-62.
- 4- Deng Y, Nagachar N, Fang L, Luan X, Catchmark JM, Tien M et al. Isolation and characterization of two cellulose morphology mutants of *Gluconacetobacter hansenii* ATCC23769 producing cellulose with lower crystallinity. *PLoS one*. 2015; 10 (3): e0119504.
- 5- Fang L, Catchmark JM. Characterization of cellulose and other exopolysaccharides produced from *Gluconacetobacter* strains. *Carbohydr polym*. 2015; 115: 663-669.
- 6- Van Kranenburg R, Boels IC, Kleerebezem M, de Vos WM. Genetics and engineering of microbial exopolysaccharides for food: approaches for the production of existing and novel polysaccharides. *Curr Opin Biotech*. 1999; 10 (5): 498-504.
- 7- Ishida T, Sugano Y, Nakai T, Shoda M. Effects of acetan on production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum*. *Biosci biotech bioch*. 2002; 66(8): 1677-1681.
- 8- Serrato RV, Meneses CH, Vidal MS, Santana-Filho AP, Iacomini M, Sasaki GL et al. Structural studies of an exopolysaccharide produced by *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pa5. *Carbohydr polym*. 2013; 98 (1): 1153-1159.
- 9- Kennedy JF, Stevenson DL, White CA, Viikari L. The chromatographic behaviour of a series of fructo-oligosaccharides derived from levan produced by the fermentation of sucrose by *Zymomonas mobilis*. *Carbohydr polym*. 1989; 10(2): 103-113.
- 10- Li Y, Tian J, Tian H, Chen X, Ping W, Tian C et al. Mutation-based selection and analysis of *Komagataeibacter hansenii* HDM 1-3 for improvement in bacterial cellulose production. *J appl microbiol*. 2016; 121(5), 1323-1334.
- 11- Ishida T, Mitarai M, Sugano Y, Shoda, M. Role of water-soluble polysaccharides in bacterial cellulose production. *Biotechnol bioeng*. 2013; 83(4), 474-478.
- 12- Valepyn E, Berezina N, Paquot M. Optimization of production and preliminary characterization of new exopolysaccharides from *Gluconacetobacter hansenii* LMG1524. *Adv Microb*. 2012; 2(04): 488.
- 13- Fonseca MDS. [Characterization of a new exopolysaccharide produced by filamentous fungus of palm bark (Bachelor's thesis)]. *Federal Technological University of Paraná*; 2017.
- 14- Cunha MAA, Turmina JA, Ivanov RC, Barroso RR, Marques PT, Fonseca EA et al. (2012). Lasiodiplodan, an exocellular (1→6)-β-d-glucan from *Lasiodiplodia theobromae* MMPI: production on glucose, fermentation kinetics, rheology and anti-proliferative activity. *J ind microbiol biot*. 2012; 39 (8): 1179-1188.
- 15- Lima HLS, Nascimento ES, Andrade FK, Brígida AIS, Borges MDF, Cassales AR et al. Bacterial Cellulose Production by *Komagataeibacter hansenii* ATCC 23769 Using Sisal Juice-An Agroindustry Waste. *Braz J Chem Eng*. 2017; 34(3): 671-680.
- 16- Toyosaki H, Naritomi T, Seto A, Matsuoka M, Tsuchida T, Yoshinaga F. Screening of bacterial cellulose-producing *Acetobacter* strains suitable for agitated culture. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 1995; 59(8): 1498-1502.
- 17- Żywicka A, Junka AF, Szymczyk P, Chodaczek G, Grzesiak J, Sedghizadeh PP et al. Bacterial cellulose yield increased over 500% by supplementation of medium with vegetable oil. *Carbohydr polym*. 2018; 199: 294-303.
- 18- Jozala AF, Pértile RAN, Santos CA, Carvalho Santos-Ebinuma V, Seckler MM, Gama FM et al. Bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* by employing alternative culture media. *Appl microbiol biot*. 2015; 99(3): 1181-1190.
- 19- Li Y, Tian C, Tian H, Zhang J, He X, Ping W et al. Improvement of bacterial cellulose production by manipulating the metabolic pathways in which ethanol and sodium citrate involved. *Appl microbiol biotechnol*. 2012; 96(6): 1479-1487.
- 20- Borges EM, Bottoli CB, Collins C. [Possibilities and limitations in use of temperature in reverse phase high performance liquid chromatography]. *Quím Nova*. 2010; 33(4): 945-953.