

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA POR *Gluconacetobacter xylinus* EM CULTIVO AGITADO

Erika Fraga de Souza^{1,2}, Selma Costa Terzi¹, Aleksandro Santos¹, Sidney Pacheco¹, Leda Maria Fortes Gottschalk¹, Otniel Freitas Silva¹

¹ Embrapa Agroindústria de Alimentos – Rio de Janeiro

² Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – PPGAN

e-mail: leda.fortes@embrapa.br

RESUMO

A celulose bacteriana (CB) compreende celulose pura possuindo propriedades únicas como alta cristalinidade e biocompatibilidade, sendo amplamente produzida por algumas cepas do gênero *Gluconacetobacter*. Sua estrutura e propriedades únicas, fazem da CB um material de grande interesse comercial devido ao seu amplo potencial de aplicações em alimentos e biomateriais. A produção da CB pode ser realizada de duas maneiras: em cultivo estático ou agitado. O cultivo estático gera membranas planas enquanto o cultivo agitado tende a produzir celulose esférica. A celulose na forma esférica tem potencial de aplicação em diversas áreas, no entanto, os parâmetros que regem a formação de CB em cultivo agitado não estão totalmente estabelecidos. No presente trabalho, a produção agitada de CB por *Gluconacetobacter xylinus* foi avaliada com agitação orbital e em agitador magnético, usando meio padrão (glicose, extrato de levedura e peptona) sem aditivos e meio padrão com adição de etanol, carboximetilcelulose ou xilana. A maior produção de CB (3,62 g/L) foi obtida em meio padrão sem aditivos com agitação orbital, no entanto, só foi possível obter esferas de celulose homogêneas nos cultivos com etanol e carboximetilcelulose com agitação magnética.

Palavras-chave: *G. xylinus*, etanol, carboximetilcelulose, xilana, shaker, agitador magnético

1. INTRODUÇÃO

A celulose sintetizada por micro-organismos, conhecida como celulose bacteriana (CB), é um biopolímero obtido a partir da fermentação de meios de cultura ricos em sacarídeos. O fato de ser quimicamente pura a distingue favoravelmente da celulose obtida a partir da biomassa vegetal, associada geralmente à lignina e à hemicelulose (Keshk *et al.*, 2006). Devido às suas características e peculiaridades, a CB pode ser aplicada na indústria alimentícia como espessante; na medicina, como substituto temporário da pele humana e no desenvolvimento de novos materiais poliméricos (Shah *et al.*, 2013).

A seleção das condições do processo fermentativo, presença de aditivos e escolha da espécie bacteriana torna possível controlar propriedades importantes de biopolímeros, como peso molecular e estrutura, bem como a evolução da biossíntese (Klemm *et al.*, 2005). Bactérias podem sintetizar celulose extracelularmente por duas diferentes maneiras. Uma delas é o cultivo estático,

que é usado para obter filmes ou membranas de celulose na interface entre o ar e o meio líquido. O outro é o cultivo agitado, onde a celulose sintetizada é distribuída por todo o meio de cultura sob a forma de estruturas fibrosas irregulares ou esferas homogêneas (Chao *et al.*, 2000).

A produção de celulose em cultivo estático é um método barato que pode ser realizada em frascos e recipientes de diferentes formas e tamanhos. No entanto, devido a seu longo tempo de biossíntese, entre 7 a 20 dias, é inviável para a produção em escala comercial. Já a produção em cultivo agitado tem alto rendimento e grande potencial para de uso em escala comercial. Apesar de apresentarem menor cristalinidade, resistência mecânica e grau de polimerização em comparação com as membranas formadas em cultivo estático, a possibilidade de gerar celulose esférica abre uma gama de aplicações. As esferas de celulose podem ser usadas para biodisponibilidade de medicamentos, adsorção de íons metálicos e contaminantes orgânicos (Recouvreux *et al.*, 2011).

Muitos estudos relacionados à produção de celulose por cultivo agitado estão sendo realizados. No entanto, os parâmetros como o meio de cultura, velocidade de agitação, volume do frasco, volume do meio inoculado e bactéria utilizada, não foram suficientemente avaliados (Recouvreux *et al.*, 2011).

No cultivo agitado há tendência de formação de células mutantes negativas que crescem, deixam o meio turvo, mas não produzem celulose (Wang *et al.*, 2016). Estudos relatam que a produção de celulose bacteriana pode ser melhorada com a adição no meio de aditivos que inibam a ocorrência dessas mutações, por exemplo o etanol (Park *et al.*, 2003) ou que interfiram na viscosidade do meio, permitindo assim que as células fiquem mais livres: agar (Bae *et al.*, 2004), alginato de sódio (Zhou *et al.*, 2007), carboximetilcelulose (Cheng *et al.*, 2009), xilana, xiloglucana e pectina (Gu & Catchmark, 2012).

Nesse contexto, o presente trabalho estudou a influência da adição de etanol, e dos polissacarídeos hidrossolúveis carboximetilcelulose (CMC) e xilana, assim como duas diferentes formas de agitação (com agitador magnético ou com agitação orbital) na produção de celulose bacteriana.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Preparo do meio de cultura

Gluconacetobacter xylinus ATCC 53082 foi cultivada sob agitação em meio padrão da literatura, HS (20 g/L de glicose, 5 g/L peptona, 5 g/L extrato de levedura, 1,15 g/L de ácido cítrico e 2,7 g/L de fosfato de sódio) (HESTRIN; SCHRAMM, 1954) com as seguintes variações: HS sem aditivos, HS com adição de 1% de etanol (VETEC), HS com adição de 0,5% de carboximetilcelulose (SIGMA) e HS com adição de 0,5% de xilana (SIGMA).

2.2 Inoculação

Os meios preparados no item 2.1 foram inoculados com 3% da suspensão de células (com absorbância entre 0,04 a 0,06 medida em 600nm) (Espectro Micronal AJX). A fermentação ocorreu em Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio por 7 dias a 28 °C, em duplicata, com agitação orbital em *shaker* (Marca Tecnal) (150 rpm) e em duplicata com agitador magnético (Marca Ika) (100 rpm).

2.3 Purificação membranas

Ao final da fermentação, os meios foram centrifugados a 4500 rpm (Centrífuga Thermo Scientific). As membranas obtidas foram purificadas por imersão com solução aquosa de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 2% por 2 horas (em 3 lavagens) para remoção dos resíduos de célula bacteriana. Em seguida, aquecidas numa solução aquosa de NaOH 1 mol/L a 80 °C por 30 min, e então lavadas várias vezes com água deionizada. Por fim, as membranas foram submetidas a liofilização.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve produção de celulose em todos os meios avaliados nas duas condições de agitação. No entanto, a adição de 1% etanol, 0,5% CMC e 0,5% de xilana não aumentou a produção de celulose em relação ao obtido com o meio padrão sem aditivos. A produção em meio padrão HS sem aditivos foi superior ao meio com aditivos em ambas as condições de agitação, sendo a produção máxima obtida no cultivo com agitação orbital (3,62 g/L). Observou-se que a produção de celulose com agitação orbital em *shaker* (Figura 1) foi superior à produção em agitador magnético (Figura 2) para todos os meios de cultivo avaliados, sendo que para 1% etanol, 0,5% CMC e 0,5% de xilana, os valores médios foram respectivamente de 1,07 g/L, 2,67 g/L e 3,48 g/L na produção com agitação orbital em *shaker* e de 0,88 g/L, 0,68 g/L e 1,54 g/L na produção com agitador magnético. Tanto na produção com a agitação orbital quanto na produção com agitador magnético, a xilana foi o aditivo que apresentou produção mais próxima, ainda assim inferior, à obtida em meio HS sem aditivos.

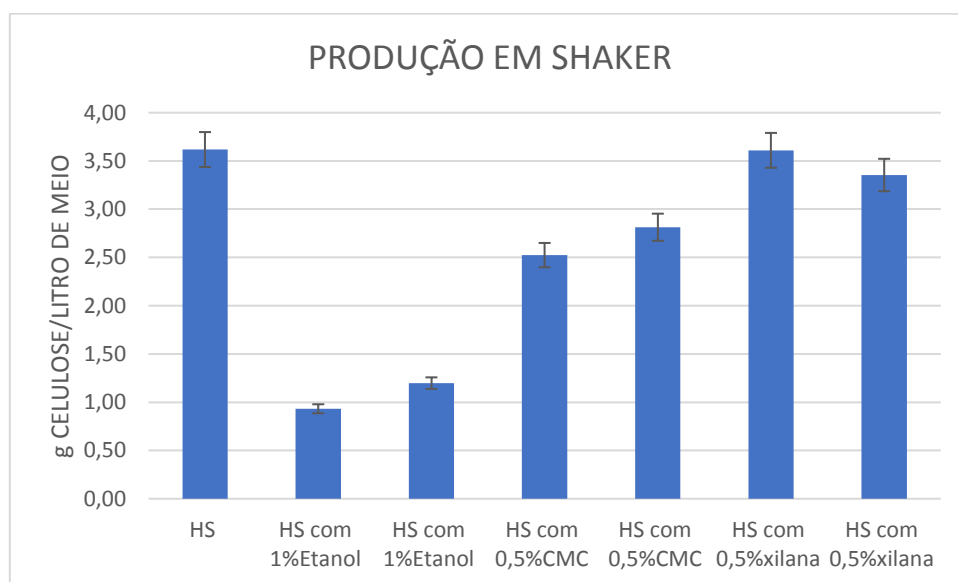


Figura 1- Produção de celulose bacteriana com e sem aditivos com agitação orbital.

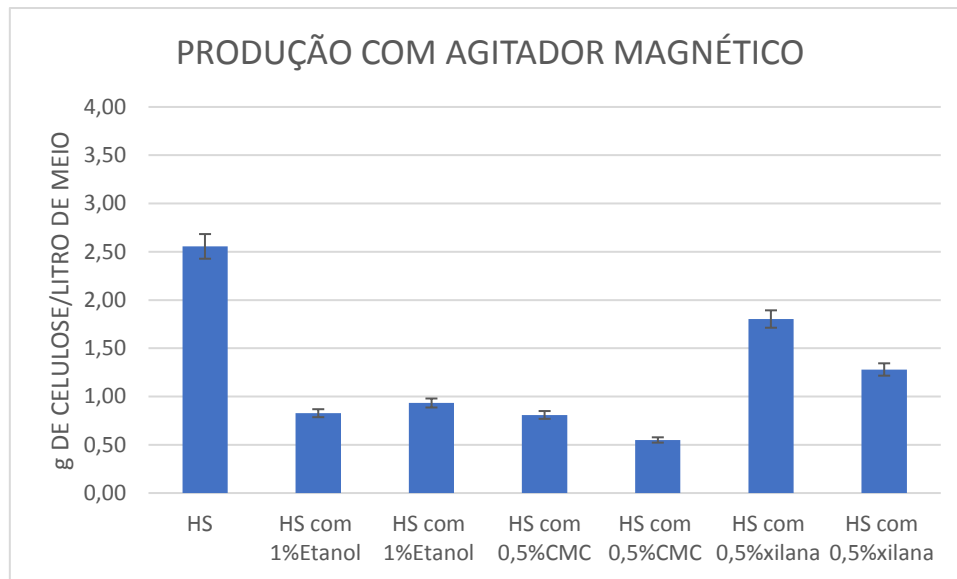


Figura 2- Produção de celulose bacteriana com e sem aditivos com agitador magnético.

Gu & Catchmark (2012) avaliaram o efeito da adição de polímeros na fermentação de *G. xylinus* JCM 9730 (ATCC 700178). Essa cepa é modelo para produção de celulose em esferas no cultivo agitado. Entre os aditivos testados, aqueles que modificaram a viscosidade do meio, favoreceram a produção de celulose, mas alguns modificaram a macroestrutura da celulose produzida, gerando assim celulose na forma de filamentos e asteriscos. Foi observado que a adição de xilana aumentou a produção de celulose em 25%, sem alterar a formação de esferas e apesar de ter reduzido a cristalinidade, não comprometeu a composição química da celulose obtida.

Cheng *et al.* (2009) também avaliaram o efeito da adição de diferentes compostos como agar, carboximetilcelulose (CMC), celulose microcristalina e alginato e sódio na produção de celulose bacteriana em cultivo agitado por *G. xylinus* JCM 9730 (ATCC 700178). Foi possível concluir que a adição de carboximetilcelulose favoreceu a produção de celulose bacteriana, sem alterar a forma de esferas, produzindo aproximadamente seis vezes mais que o controle, embora tenha alterado as propriedades físicas da celulose.

Além da viscosidade do meio, outro fator que pode afetar o rendimento na produção de CB, é a formação de células mutantes não produtoras de celulose. Park *et al.* (2003) concluíram que a adição de 1% de etanol no meio inibiu a produção de células mutantes de *Gluconacetobacter hansenii* PJK (KCTC 10505BP) e quase dobrou a produção de celulose em cultivo agitado.

Entre os aditivos testados, a CMC e o etanol, embora não tenham aumentado o rendimento de celulose, favoreceram a produção mais homogênea com formação de celulose na forma de pellets medindo de 3 a 5 mm de diâmetro (Figura 3). A formação de pellets de celulose possibilita a aplicação desses na área de biomedicina e nanotecnologia (Recouvreux *et al.*, 2011). Polissacarídeos hidrossolúveis, como xilana, CMC, ágar e alginato de sódio podem dificultar a coagulação da CB e assim aumentar o número de células livres no meio de cultivo favorecendo a formação dos pellets (Wang *et al.*, 2016).

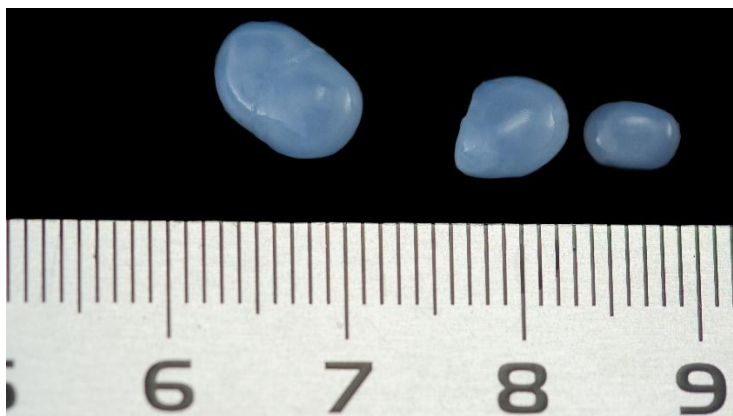


Figura 3 – Pellets de celulose bacteriana formada pela adição de CMC ao meio de cultivo.

Estudos futuros envolvendo variação na velocidade de agitação, volume de inóculo e quantidade de aditivo no meio, devem ser realizados para otimizar a obtenção de esferas de celulose em meio HS com etanol e carboximetilcelulose.

4. CONCLUSÃO

A produção de celulose bacteriana em meio padrão sem aditivos foi superior ao mesmo meio com aditivos em ambas as condições de agitação. Para todos os meios avaliados foi observada produção de celulose com agitação orbital superior a produção com agitador magnético. Foi possível obter celulose em esferas homogêneas nos meios com etanol e carboximetilcelulose com agitação magnética.

5. REFERÊNCIAS

- Bae, S., Sugano, Y., & Shoda, M. (2004). Improvement of bacterial cellulose production by addition of agar in a jar fermentor. *Journal of bioscience and bioengineering*, 97(1), 33-38.
- Chao, Y., Ishida, T., Sugano, Y. & Shoda, M. (2000) Bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* in a 50-L internal-loop airlift reactor, *Biotechnol. Bioeng.*, 68(3), 345-352.
- Cheng, K. C., Catchmark, J. M., & Demirci, A. (2009). Effect of different additives on bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* and analysis of material property. *Cellulose*, 16(6), 1033.
- Gu, J., & Catchmark, J. M. (2012). Impact of hemicelluloses and pectin on sphere-like bacterial cellulose assembly. *Carbohydrate polymers*, 88(2), 547-557.
- Hestrin, S. & Schramm, M. (1954) Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. *Biochemical Journal*, 58(2), 345-352.
- Keshk, S., Razek, T., Sameshima, K. (2006) Bacterial cellulose production from beet molasses. *African Journal of Biotechnology*, 5(17), 1519-1523.

- Klemm, D., Heublein, B., Fink, H. & Bohn, A. (2005) Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material. *Angew. Chem.*, 44, 3358-3393.
- Park, J. K., Jung, J. Y., & Park, Y. H. (2003). Cellulose production by *Gluconacetobacter hansenii* in a medium containing ethanol. *Biotechnology letters*, 25(24), 2055-2059.
- Recouvreur, D., Rambo, C., Berti, F., Carminatti, C., Antônio, R., Porto, L. (2011) Novel three-dimensional cocoon-like hydrogels for soft tissue regeneration. *Mater. Sci. Eng., C*, 31, 151-157.
- Shah, N., Ul-Islam, M., Khattak, W. A., & Park, J. K. (2013). Overview of bacterial cellulose composites: a multipurpose advanced material. *Carbohydrate Polymers*, 98(2), 1585-1598.
- Wang, Z. G., Xiang, D., Wang, X. B., & Li, C. F. (2016). Preparation of an inoculum of *Gluconacetobacter xylinus* without mutants in shaken culture. *Journal of applied microbiology*, 121(3), 713-720.
- Zhou, L. L., Sun, D. P., Hu, L. Y., Li, Y. W., & Yang, J. Z. (2007). Effect of addition of sodium alginate on bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum*. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 34(7), 483.