

ANGELITA MARA DE SOUZA

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE  
EXOPOLISSACARÍDEOS NOS GÊNEROS  
**ENTEROBACTER, ALCALIGENES E ACETOBACTER**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (Bioquímica).

CURITIBA  
1994

**ANGELITA MARA DE SOUZA**

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS NOS GÊNEROS  
*ENTEROBACTER, ALCALIGENES E ACETOBACTER***

**Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor no Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da UFPr pela comissão formada pelos professores:**

**Orientador: José Domingos Fontana**

**Universidade Federal do Paraná - Departamento de Bioquímica**

**Carlos Kemmelmeier**

**Universidade Estadual de Maringá -Pr**

**Manoel Francisco Guimarães**

**Universidade Federal do Paraná - Departamento de Bioquímica**

**Miriam Blumel Chocai**

**Universidade Federal do Paraná - Departamento de Farmácia**

**Kazuko Ishida do Nascimento**

**Pontifícia Universidade Católica - Pr**

**Curitiba, 23 de setembro de 1994**

**Tese orientada pelos Professores Dr. José Domingos Fontana (orientador) e Dr. Ian W. Sutherland (co-orientador).**

**Aos meus pais, Aurea e João, e ao meu filho Rafael com amor e gratidão.**

## AGRADECIMENTOS

Aos professores Dr. JOSÉ DOMINGOS FONTANA e DR. IAN W. SUTHERLAND, pela orientação desta tese, pela compreensão e amizade.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da UFPr, em especial a R. HOFFMEISTER, pelas microscopias eletrônicas constadas nesta tese.

Ao Instituto de Física da UNICAMP-SP, em especial à Dra. FRIS L. TORRIANI, pelos diagramas de difração de raio-X constados nesta tese.

Ao professor Dr. R. BERG (Departamento de Química da UFPr) pela obtenção dos espectros de GLC-MS das xantinas.

Às bibliotecárias do Setor de Ciências Biológicas da UFPr pelos auxílios prestados.

Aos professores Dr. MANOEL GUIMARÃES e Dra. KAZUKO HISHIDA DO NASCIMENTO pelas correções desta tese.

À professora YOSHIKO YASSUMOTO (Departamento de Farmácia da UFPr) pelo fornecimento das sementes de *Kola nitida*

À engenheira civil HELENICE SANT'ANA pelos desenhos e diagramas constados nesta tese.

Ao professor Dr. CID AIMBIRÉ SANTOS (Departamento de Farmácia da UFPr) pelos programas de computador empregados na composição desta tese, bem como pelo auxílio na formatação das referências bibliográficas.

Aos amigos SILVIO JOSÉ DE SOUZA e MONICA M. FARELL VARGAS pela colaboração em parte do trabalho experimental desta tese.

Às Mestres em Bioquímica IVONE NUNES LYRA e VALÉRIA DA COSTA FRANCO pela colaboração experimental para o segundo "paper" em *Acetobacter*.

À Universidade de Edinburgh pela aceitação junto ao "Institute of Cell and Molecular Biology" para realização de parte desta tese.

À empresa curitibana, Bio Fill Produtos Biotecnológicos S/A, pelo fornecimento de sua cepa de *Acetobacter*, bem como pela alocação da bolsa de Doutorado (RHAE/CNPq) utilizada no trabalho desenvolvido junto à Universidade de Edinburgh.

Aos meus familiares pela colaboração, estímulo e compreensão, em especial no período de redação desta tese.

Aos amigos ZAF ZAMAN, ILANA KADMON, SUSIE JACKSON, MARLETH SILVA, MARCIA BRAGA, HELENICE E ELIANE SANT'ANA, pelo estímulo, amizade e compreensão.

Aos colegas do Laboratório de Quimiobiotecnologia de Biomassa, em especial ao Mestre em Bioquímica JORGE CHOCIAI, à Doutora em Bioquímica MARIA CÉLIA O. HAULY, à Mestre em Bioquímica IVONE NUNES LYRA, pelas sugestões, incentivo e amizade.

Aos colegas constituintes do grupo de pesquisa do Professor Dr. IAN W. SUTHERLAND: LYNN, CAROLINE, JOANNE, ROBERT, LIGIA e SUSANE, pelas sugestões, compreensão e amizade no período de bolsa "sandwich" na Universidade de Edinburgh (Escócia).

À coordenação do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e a todos os professores, colegas e funcionários do Departamento de Bioquímica da UFPr, que direta ou indiretamente contribuiram para a realização deste trabalho.

Ao CNPq, PADCT/FINEP pelo auxílio financeiro fornecido durante o desenvolvimento desta tese.

## SUMÁRIO

<b>SUMÁRIO</b> .....	vi
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	xiii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xvii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xix
<b>ABSTRACT</b> .....	xxvi
<b>RESUMO</b> .....	xxviii
<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	1
<b>1.1 EXOPOLISSACARÍDEOS</b> .....	3
<b>1.2 CELULOSE BACTERIANA</b> .....	22
<b>1.3 ALGUNS NOVOS POLISSACARÍDEOS MICROBIANOS E SUAS PROPOSTAS DE APLICAÇÕES COMERCIAIS</b> .....	41
<b>1.4 POLÍMEROS DE RESERVA</b> .....	55
<b>1.4.2 Polissacarídeos semelhantes ao glicogênio</b> .....	58
<b>1.4.3 Póli-Hidróxialcanoatos</b> .....	67
<b>OBJETIVOS</b> .....	87
<b>2 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	89
<b>2.1 MATERIAIS</b> .....	89
<b>2.2 MÉTODOS ANALÍTICOS</b> .....	90
<b>2.2.1 Determinação de carboidratos</b> .....	90
<b>2.2.1.1 Determinação da glucose residual</b> .....	90
<b>2.2.1.2 Determinação de glicogênio pelo método da antrona</b> .....	91
<b>2.2.1.3 Determinação de açúcar total e redutor</b> .....	92
<b>2.2.2 Extração e determinação de poli-β-hidróxibutirato (PHB)</b> .....	92

<b>2.2.3</b>	<b>Avaliação do crescimento celular.....</b>	<b>93</b>
<b>2.2.4</b>	<b>Determinação do pH.....</b>	<b>94</b>
<b>2.2.5</b>	<b>Determinação do peso seco de exopolissacarídeo, células e biofilmes celulósicos.....</b>	<b>94</b>
<b>2.2.6</b>	<b>Obtenção das infusões vegetais.....</b>	<b>95</b>
<b>2.2.7</b>	<b>Determinação da matéria seca de infusão.....</b>	<b>95</b>
<b>2.2.8</b>	<b>Obtenção de extratos clorofórmicos e metanólicos a partir das infusões vegetais.....</b>	<b>95</b>
<b>2.2.9</b>	<b>Teste em placa de toque para detecção de xantinas.....</b>	<b>96</b>
<b>2.2.10</b>	<b>Espectrometria de massa para as xantinas.....</b>	<b>96</b>
<b>2.2.11</b>	<b>Extração alcalina do biofiolme de <i>Acetobacter</i>.....</b>	<b>97</b>
<b>2.2.12</b>	<b>Tratamento dos biofilmes celulósicos para as hidrolises e difração de raio-X.....</b>	<b>97</b>
<b>2.2.13</b>	<b>Hidrolise dos biofilmes celulósicos.....</b>	<b>98</b>
<b>2.2.13.1</b>	<b>Hidrolise enzimática com Celluclast® ou suco gástrico de caramujo.....</b>	<b>98</b>
<b>2.2.13.2</b>	<b>Hidrolise ácida com ácido trifluoracético (TFA).....</b>	<b>98</b>
<b>2.2.13.3</b>	<b>Hidrolise ácida do material obtido por extração alcalina do biofiolme de <i>Acetobacter</i>.....</b>	<b>99</b>
<b>2.2.14</b>	<b>Análises Cromatográficas.....</b>	<b>99</b>
<b>2.2.14.1</b>	<b>Cromatografia em camada delgada dos hidrolizados de biofilmes celulósico tratados.....</b>	<b>99</b>
<b>2.2.14.2</b>	<b>Cromatografia líquido-gás de componentes obtidos por extração alcalina do biofiolme de <i>Acetobacter</i>.....</b>	<b>100</b>
<b>2.2.14.3</b>	<b>Cromatografia líquido-gás das xantinas.....</b>	<b>100</b>
<b>2.2.15</b>	<b>Microscopia ótica dos biofilmes celulósicos.....</b>	<b>100</b>
<b>2.2.16</b>	<b>Teste cromogênico em placa de Petri para a natureza celulósica do biofilme de <i>Acetobacter</i>.....</b>	<b>101</b>
<b>2.2.17</b>	<b>Diagrama de raio-X do biofilme de <i>Acetobacter</i> sob diferentes tratamentos.....</b>	<b>102</b>
<b>2.3</b>	<b>PROCESSO FERMENTATIVO.....</b>	<b>102</b>
<b>2.3.1</b>	<b>Meios de cultura.....</b>	<b>102</b>

<b>2.3.1.1</b>	Meios de manutenção.....	102
<b>2.3.1.1.1</b>	Meio sólido para manutenção de <i>Alcaligenes</i> e <i>Enterobacter</i> .....	102
<b>2.3.1.1.2</b>	Meio sólido/líquido para manutenção de <i>Acetobacter</i> .....	103
<b>2.3.1.2</b>	Meios de cultivos dos microrganismos.....	104
<b>2.3.1.2.1</b>	Meio basal modificado de Davis & Mingoli (D&M).....	104
<b>2.3.1.2.2</b>	Meio de cultivo de <i>Acetobacter</i> .....	105
<b>2.3.2</b>	Preparo do inóculo.....	106
<b>2.3.2.1</b>	Inóculo de <i>Alcaligenes</i> e <i>Enterobacter</i> .....	106
<b>2.3.2.2</b>	Inóculo de <i>Acetobacter</i> .....	106
<b>2.3.3</b>	Condições de Cultivo.....	107
<b>2.3.3.1</b>	Condições de cultivo de <i>Enterobacter</i> e <i>Alcaligenes</i> sp.....	107
<b>2.3.3.2</b>	Condições de cultivo de <i>Acetobacter</i> sp.....	107
<b>2.3.3.2.1</b>	Cultivo de <i>Acetobacter</i> sp na presença de infusões vegetais.....	107
<b>2.3.3.2.2</b>	Cultivo de <i>Acetobacter</i> sp em cultivos normais.....	108
<b>2.3.4</b>	Coleta e conservação das amostras.....	108
<b>2.3.5</b>	Processamento da amostras.....	109
<b>2.3.5.1</b>	Obtenção dos exopolissacarídeos.....	109
<b>2.3.5.2</b>	Obtenção das Células.....	110
<b>2.3.5.3</b>	Obtenção dos biofilmes celulósicos.....	110
<b>2.4</b>	<b>PROCESSO FERMENTATIVO DAS CEPAS DE <i>ENTEROBACTER</i> E <i>ALCALIGENES</i></b> .....	111
<b>2.4.1</b>	Aspectos gerais de cultivo em meio sólido e líquido.....	111
<b>2.4.2</b>	Determinação das concentrações ideais das fontes de carbono, nitrogênio e magnésio para o crescimento de <i>Enterobacter</i> e <i>Alcaligenes</i> .....	111
<b>2.4.2.1</b>	Determinação do efeito da concentração da fonte de carbono no crescimento de <i>Enterobacter</i> e <i>Alcaligenes</i> .....	112

<b>2.4.2.2 Determinação do efeito da concentração da fonte de nitrogênio no crescimento de <i>Enterobacter</i> e <i>Alcaligenes</i>.....</b>	112
<b>2.4.2.3 Determinação do efeito da concentração da fonte de magnésio no crescimento de <i>Enterobacter</i> e <i>Alcaligenes</i>.....</b>	113
<b>2.4.3 Verificação do restabelecimento do crescimento após readição da fonte de magnésio em <i>Alcaligenes</i>.....</b>	114
<b>2.4.4 Efeito da relação de C:N no crescimento e produção de EPS e polímero de reserva em <i>Enterobacter</i> e <i>Alcaligenes</i>.....</b>	114
<b>2.4.5 Determinação do efeito da concentração do tampão fosfato sobre o crescimento da cepa <i>Enterobacter aerogenes</i> (EPS<sup>+</sup>).....</b>	116
<b>2.4.6 Cultivo comparativo das cepas de <i>Enterobacter aerogenes</i> em duas forças iônicas diferentes do tampão fosfato.....</b>	117
<b>2.4.7 Determinação da viscosidade dos meios de cultura durante a produção de EPS em <i>Enterobacter</i> e <i>Alcaligenes</i>.....</b>	117
<b>2.4.8 Determinação das viscosidades das soluções preparadas a partir dos exopolissacarídeos isolados.....</b>	118
<b>2.5 PROCESSO FERMENTATIVO DAS CEPAS DE <i>ACETOBACTER</i>.....</b>	119
<b>2.5.1 Aspectos gerais e de cultivo dos microrganismos.....</b>	119
<b>2.5.2 Aumento da produção do biofilme de <i>Acetobacter</i> por infusões vegetais.....</b>	119
<b>2.5.2.1 Produção do biofilme de <i>Acetobacter</i> na presença de infusões vegetais, em temperatura ambiente.....</b>	119
<b>2.5.2.2 Produção do biofilme de <i>Acetobacter</i> na presença de infusões de chá tratadas, em condições controladas.....</b>	120
<b>2.5.2.3 Determinação da natureza do(s) estimulador(es) no extrato clorofórmico.....</b>	120
<b>2.5.3.4 Confirmação do efeito estimulador das metil-xantinas na produção de celulose com as drogas puras.....</b>	121
<b>2.5.3 Determinação da natureza do biofilme de <i>Acetobacter</i>.....</b>	121

<b>2.5.4</b>	<b>Características da celulose de <i>Acetobacter</i>.....</b>	<b>121</b>
<b>2.5.5</b>	<b>Aplicação médica do biofilme celulósico de <i>Acetobacter</i> (BioFill®).....</b>	<b>122</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>123</b>
<b>3.1</b>	<b>PROCESSO FERMENTATIVO DAS CEPAS DE <i>ENTEROBACTER</i> E <i>ALCALIGENES</i>.....</b>	<b>123</b>
<b>3.1.1</b>	<b>Aspectos gerais e de cultivo dos microrganismos.....</b>	<b>123</b>
<b>3.1.1.1</b>	<b><i>Enterobacter</i> sp.....</b>	<b>123</b>
<b>3.1.1.2</b>	<b><i>Alcaligenes</i> sp.....</b>	<b>124</b>
<b>3.1.2</b>	<b>Efeito das concentrações de carbono, nitrogênio e magnésio sobre o crescimento de <i>Enterobacter</i> e <i>Alcaligenes</i>.....</b>	<b>127</b>
<b>3.1.2.1</b>	<b>Efeito da concentração da fonte de carbono no crescimento de <i>Enterobacter</i> e <i>Alcaligenes</i>.....</b>	<b>127</b>
<b>3.1.2.2</b>	<b>Efeito da concentração da fonte de nitrogênio no crescimento de <i>Enterobacter</i> e <i>Alcaligenes</i>.....</b>	<b>129</b>
<b>3.1.2.3</b>	<b>Efeito da concentração da fonte de magnésio no crescimento de <i>Enterobacter</i> e <i>Alcaligenes</i>.....</b>	<b>132</b>
<b>3.1.3</b>	<b>Verificação do restabelecimento do crescimento após readição da fonte de magnésio em <i>Alcaligenes</i>.....</b>	<b>135</b>
<b>3.1.4</b>	<b>Meio de cultivo otimizado para o crescimento de <i>Enterobacter</i> e <i>Alcaligenes</i>.....</b>	<b>136</b>
<b>3.1.5</b>	<b>Efeito da relação de C:N na produção de massa celular, polímeros de reserva e EPS em <i>Enterobacter</i> e <i>Alcaligenes</i>.....</b>	<b>137</b>
<b>3.1.5.1</b>	<b>Efeito da relação de C:N na produção de massa celular, polímero de reserva e EPS em <i>Enterobacter</i> EPS<sup>-</sup> e EPS<sup>+</sup>, crescidos em sulfato de amônio como fonte de nitrogênio.....</b>	<b>138</b>
<b>3.1.5.2</b>	<b>Efeito da relação de C:N na produção de massa celular, polímeros de reserva e EPS em <i>Enterobacter</i> EPS<sup>-</sup> e EPS<sup>+</sup>, crescidos em caseína hidrolizada como fonte de nitrogênio.....</b>	<b>145</b>
<b>3.1.5.3</b>	<b>Efeito comparativo entre as duas fontes de nitrogênio na produção de massa celular, polímeros de reserva e EPS em <i>Enterobacter</i> EPS<sup>+</sup>.....</b>	<b>152</b>

<b>3.1.5.4 Efeito da relação de C:N na produção de massa celular, polímeros de reserva e EPS em <i>Alcaligenes</i> EPS<sup>+</sup> em sulfato de amônio como fonte de nitrogênio.....</b>	<b>161</b>
<b>3.1.5.5 Efeito da relação de C:N na produção de massa celular, polímero de reserva e EPS em <i>Alcaligenes</i> EPS<sup>+</sup> e EPS<sup>-</sup> em caseína hidrolizada como fonte de nitrogênio.....</b>	<b>164</b>
<b>3.1.5.6 Efeito comparativo entre as duas fontes de nitrogênio na produção de massa celular, polímero de reserva e EPS em <i>Alcaligenes</i> EPS<sup>+</sup>.....</b>	<b>167</b>
<b>3.1.6 Verificação do efeito da concentração do tampão fosfato sobre o crescimento da cepa <i>Enterobacter</i> EPS<sup>+</sup>.....</b>	<b>176</b>
<b>3.1.7 Cultivo comparativo das cepas de <i>Enterobacter aerogenes</i> em duas forças iônicas diferentes do tampão fosfato.....</b>	<b>179</b>
<b>3.1.8 Determinação da viscosidade dos meios de cultura durante a produção dos EPS em <i>Enterobacter</i> e <i>Alcaligenes</i>.....</b>	<b>183</b>
<b>3.1.9 Determinação da viscosidade das soluções preparadas a partir dos exopolissacarídeos isolados.....</b>	<b>185</b>
<b>3.2 PROCESSO FERMENTATIVO DAS CEPAS DE <i>ACETOBACTER</i>.....</b>	<b>187</b>
<b>3.2.1 Aspectos gerais e de cultivo dos microrganismos.....</b>	<b>187</b>
<b>3.2.2 Aumento da produção do biofilme de <i>Acetobacter</i> por infusões vegetais.....</b>	<b>189</b>
<b>3.2.2.1 Produção do biofilme de <i>Acetobacter</i> na presença de infusões vegetais, em temperatura ambiente.....</b>	<b>189</b>
<b>3.2.2.2 Produção do biofilme de <i>Acetobacter</i> na presença de infusões de chá tratadas, em condições controladas.....</b>	<b>191</b>
<b>3.2.2.3 Determinação da natureza do(s) estimulador(es) no extrato clorofórmico.....</b>	<b>193</b>
<b>3.2.2.4 Confirmação do efeito estimulador das metil-xantinas na produção de celulose com as drogas puras.....</b>	<b>194</b>
<b>3.2.3 Determinação da natureza do biofilme de <i>Acetobacter</i>.....</b>	<b>195</b>
<b>3.2.4 Características da celulose de <i>Acetobacter</i>.....</b>	<b>199</b>
<b>3.2.5 Aplicação médica do biofilme celulósico de <i>Acetobacter</i> (BioFill®).....</b>	<b>201</b>

CONCLUSÕES.....	205
<b>4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>208</b>
ANEXO (Publicações).....	236
<i>Acetobacter</i> cellulose pellicle as a temporary skin substitute.....	
Nature of plant stimulators in the production of <i>Acetobacter xylinum</i> (tea fungus") biofilm used in skin therapy.....	
Exopolysaccharide and storage polymer production in <i>Enterobacter aerogenes</i> type 8 strains	

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ADP</b>	- Adenosina difosfato
<b>ADTS</b>	- 2,2'-di-azino-3-etil benziltiazolina
<b>ATCC</b>	- American Type Culture Collection
<b>atm</b>	- Atmosfera
<b>ATP</b>	- Adenosina trifosfato
<b>BF</b>	- Cepa BioFill®
<b>CAC</b>	- Cooperativa Agrícola de Cotia
<b>cel</b>	- Mutante celulose negativo
<b>cel<sup>+</sup></b>	- Organismos celulose positivo
<b>CDP</b>	- Citidina difosfato
<b>CH</b>	- Caseína hidrolizada
<b>CMP</b>	- Citidina monofosfato
<b>CoA</b>	- Coenzima A
<b>cP</b>	- Centi Poise
<b>di-GMPc</b>	- Ácido diguanílico bis-(3'-5')-cíclico
<b>D&amp;M</b>	- Meio de Davis & Mingoli
<b>DNA</b>	- Ácido desoxiribonucleico
<b>DO</b>	- Densidade ótica
<b>EC 03</b>	- Experimento com 3 g/l de glucose como fonte de carbono
<b>EC 05</b>	- Experimento com 5 g/l de glucose como fonte de carbono
<b>EC 10</b>	- Experimento com 10 g/l de glucose como fonte de carbono
<b>EC 20</b>	- Experimento com 20 g/l de glucose como fonte de carbono
<b>EN/2</b>	- Experimento com metade da concentração referencial da fonte de nitrogênio

<b>EMg/16</b>	- Experimento com 1/16 da concentração referencial da fonte de magnésio
<b>EPS</b>	- Exopolissacarídeo (Polissacarídeo extracelular)
<b>EPS<sup>+</sup></b>	- Produtor de exopolissacarídeo
<b>EPS<sup>-</sup></b>	- Não produtor de exopolissacarídeo (mutante)
<b>FDA</b>	- "Food and Drug Administration"
<b>FID</b>	- Detector de ionização de chama
<b>x g</b>	- Aceleração da gravidade
<b>g</b>	- Grama
<b>Gal</b>	- Galactose
<b>G1P</b>	- Glucose 1-fosfato
<b>GDP</b>	- Guanosina difosfato
<b>GlcA</b>	- Ácido glucurônico
<b>GLC</b>	- Cromatografia líquido-gás
<b>Glc</b>	- Glucose
<b>GTP</b>	- Guanosina trifosfato
<b>3HB</b>	- 3-Hidróxibutirato
<b>3HD</b>	- 3-Hidróxidecanato
<b>3HV</b>	- 3-Hidróxivalerato
<b>JF</b>	- Cepa José Fontana
<b>kD</b>	- Quilo Dalton
<b>KDO</b>	- Ácido 3-ceto-desóxi-D- <i>mannooctulosônico</i> ("3-keto-deoxy-D- <i>mannooctulosonic acid</i> ")
<b>kJ</b>	- Quilo Joule
<b>l</b>	- Litro
<b>LPS</b>	- Lipopolissacarídeo
<b>LQBB</b>	- Laboratório de Químico/Biotecnologia de Biomassa
<b>M</b>	- Molar

<b>Man</b>	- Manose
<b>MDO</b>	- Oligossacarídeos derivados da membrana ("Membrane-derived oligosaccharides")
<b><math>\mu\text{l}</math></b>	- Microlitro
<b>ml</b>	- Mililitro
<b> mM</b>	- Milimolar
<b><math>\mu\text{g}</math></b>	- Micrograma
<b>mg</b>	- Miligrama
<b><math>\mu\text{m}</math></b>	- Micrômetro
<b>mm</b>	- Milímetro
<b>MS</b>	- Espectrometria de massa
<b>mut.</b>	- Mutante
<b>nm</b>	- Nanômetro
<b>P</b>	- Fosfato
<b><math>\pi_{EPS}</math></b>	- Produção relativa do exopolissacarídeo
<b>PDE</b>	- Fosfodiesterase
<b>%PSC</b>	- Percentagem do peso seco de células
<b>PHA</b>	- Polihidróxialcanoatos
<b>PHB</b>	- Póli- $\beta$ -hidróxibutirato
<b>p/p</b>	- Peso/peso
<b>PR<sub>máx</sub></b>	- Polímero de reserva máximo
<b>PS</b>	- Polissacarídeo
<b>PSC</b>	- Peso seco de células
<b>PSC<sub>fe</sub></b>	- Peso seco de células na fase estacionária
<b>psi</b>	- Pressão por polegada quadrada
<b>p/v</b>	- Peso/volume
<b>Rha</b>	- Ramnose

<b>RNA</b>	- Ácido ribonucleico
<b>rpm</b>	- Rotações por minuto
<b>S-(60,130 e 194)</b>	- Polissacarídeo-60, 130 e 194
<b>s<sup>-1</sup></b>	- Recíproco do segundo
<b>SA</b>	- Sulfato de amônio
<b>SEM</b>	- Microscopia Eletrônica de Varredura
<b>SI</b>	- "Slime"
<b>SMg</b>	- Sulfato de magnésio
<b>TCA</b>	- Ciclo do ácido tricarboxílico
<b>TDP</b>	- Timidina difosfato
<b>TEM</b>	- Microscopia Eletrônica de Transmissão
<b>TF</b>	- Tampão fosfato
<b>TLC</b>	- Cromatografia em camada delgada
<b>UV</b>	- Ultra violeta
<b>UDP</b>	- Uridina difosfato
<b>v/v</b>	- Volume/volume
<b>Y<sub>EPS</sub></b>	- Rendimento do exopolissacarídeo

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Substituintes não carboidratos em exopolissacarídeos.....	11
<b>Tabela 2</b> - Propriedades úteis de polissacarídeos.....	42
<b>Tabela 3</b> - Polissacarídeos microbianos de interesse comercial.....	42
<b>Tabela 4</b> - Propriedades da goma gelano: comparação com caragenano e ágar.....	48
<b>Tabela 5</b> - Composição dos meios empregados para determinação do efeito da concentração da fonte de carbono no crescimento de <i>Enterobacter</i> e <i>Alcaligenes</i> .....	112
<b>Tabela 6</b> - Composição dos meios empregados para determinação do efeito da concentração da fonte de nitrogênio no crescimento de <i>Enterobacter</i> e <i>Alcaligenes</i> .....	113
<b>Tabela 7</b> - Composição dos meios empregados para determinação do efeito da concentração da fonte de magnésio no crescimento de <i>Enterobacter</i> e <i>Alcaligenes</i> .....	113
<b>Tabela 8</b> - Composição dos meios de cultura utilizados por <i>Enterobacter</i> e <i>Alcaligenes</i> empregando sulfato de amônio como fonte de nitrogênio.....	115
<b>Tabela 9</b> - Composição dos meios de cultura utilizados por <i>Enterobacter</i> e <i>Alcaligenes</i> empregando caseína hidrolizada como fonte de nitrogênio.....	115
<b>Tabela 10</b> - Composição dos meios empregados na determinação do efeito da concentração do tampão fosfato no crescimento da cepa <i>Enterobacter</i> (EPS <sup>+</sup> ).....	116
<b>Tabela 11</b> - Crescimento máximo (DO <sub>600nm</sub> ) alcançado pelas cepas de <i>Enterobacter</i> e <i>Alcaligenes</i> em diferentes concentrações de glucose e 1,0 g/l de sulfato de amônio.....	127
<b>Tabela 12</b> - Crescimento máximo (DO <sub>600nm</sub> ) alcançado pelas cepas de <i>Enterobacter</i> e <i>Alcaligenes</i> em diferentes concentrações de sulfato de amônio e 10,0 g/l de glucose.....	130
<b>Tabela 13</b> - Crescimento máximo (DO <sub>600nm</sub> ) alcançado pelas cepas de <i>Enterobacter</i> e <i>Alcaligenes</i> em diferentes concentrações de sulfato de magnésio e 10 g/l de glucose.....	133

<b>Tabela 14 - Crescimento de</b> <i>Enterobacter aerogenes</i> <b>em sulfato de amônio como fonte de nitrogênio.....</b>	138
<b>Tabela 15 - Crescimento de</b> <i>Enterobacter aerogenes</i> <b>em caseína hidrolizada como fonte de nitrogênio.....</b>	145
<b>Tabela 16 - Crescimento de</b> <i>Enterobacter</i> <b>EPS<sup>+</sup> em cultivos comparativos variando-se a fonte de nitrogênio.....</b>	152
<b>Tabela 17 - Crescimento de</b> <i>Alcaligenes</i> <b>sp em sulfato de amônio como fonte de nitrogênio.....</b>	161
<b>Tabela 18 - Crescimento de</b> <i>Alcaligenes</i> <b>sp em caseína hidrolizada como fonte de nitrogênio.....</b>	164
<b>Tabela 19- Crescimento de</b> <i>Alcaligenes</i> <b>EPS<sup>+</sup> em cultivos comparativos variando-se a fonte de nitrogênio.....</b>	167
<b>Tabela 20 - Efeito de infusões vegetais nativas na produção de membranas celulósicas por</b> <i>Acetobacter xylinum</i> , <b>em temperatura ambiente.....</b>	190
<b>Tabela 21 - Efeito de infusões vegetais nativas e parcialmente descafeinadas na produção de membranas celulósicas por</b> <i>Acetobacter xylinum</i> , <b>tendo sacarose como fonte de carbono.....</b>	192
<b>Tabela 22 - Efeito de infusões vegetais nativas e parcialmente descafeinadas na produção de membranas celulósicas por</b> <i>Acetobacter xylinum</i> , <b>tendo glucose como fonte de carbono.....</b>	193
<b>Tabela 23 - Efeito das drogas xantínicas puras na produção de membranas celulósicas por</b> <i>Acetobacter xylinum</i> .....	195

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Diagrama mostrando a arquitetura da superfície celular de bactérias Gram-negativas.....	3
<b>Figura 2</b> - Rotas do anabolismo da glucose em bactérias Gram-negativas.....	13
<b>Figura 3</b> - Sistemas catabólicos conduzindo à síntese de nucleotídeo açúcar e interconversões.....	14
<b>Figura 4</b> - Esquema para a biossíntese da xantana.....	17
<b>Figura 5</b> - Postulado dos estágios finais da síntese de exopolissacarídeo e excreção.....	18
<b>Figura 6</b> - Formação da fita de celulose.....	27
<b>Figura 7</b> - Modelo generalizado da reunião da fita de celulose em <i>Acetobacter xylinum</i> .....	28
<b>Figura 8</b> - Estrutura do di-GMPc.....	32
<b>Figura 9</b> - Modelo proposto para a regulação da síntese de celulose pelo ativador da síntese de celulose, o ácido diguanílico cíclico.....	32
<b>Figura 10</b> - Família de estruturas químicas baseadas na estrutura da goma gelano.....	43
<b>Figura 11</b> - Biossíntese e degradação de glicogênio em procariotos e sua regulação.....	61
<b>Figura 12</b> - Interrelação do ciclo do ácido tricarboxílico e ciclo metabólico do PHB, e seu controle, em <i>A. beijerinckii</i> e <i>A. eutrophus</i> .....	72
<b>Figura 13</b> - Propostas das vias de biossíntese de PHA e PHB a partir de alcano, ác. alcanoicos e alcanois.....	74
<b>Figura 14</b> - Estrutura da unidade repetitiva do EPS produzido por <i>Enterobacter aerogenes</i> A4.87(SI).....	123
<b>Figura 15</b> - Estrutura da unidade repetitiva do EPS produzido por <i>Alcaligenes</i> sp ATCC 31961.....	125

<b>Figura 16a - Aparência de uma cepa mucóide de <i>E. aerogenes</i> tipo 8 cultivada em meio sólido.....</b>	126
<b>Figura 16b - Aparência de uma cepa não mucóide de <i>E. aerogenes</i> tipo 8 cultivada em meio sólido.....</b>	126
<b>Figura 17a - Perfil de crescimento (DO<sub>600nm</sub>) da cepa <i>Enterobacter</i> EPS<sup>-</sup> em diferentes concentrações de glucose.....</b>	128
<b>Figura 17b - Perfil de crescimento (DO<sub>600nm</sub>) da cepa <i>Alcaligenes</i> EPS<sup>+</sup> em diferentes concentrações de glucose.....</b>	129
<b>Figura 18a - Perfil de crescimento (DO<sub>600nm</sub>) da cepa <i>Enterobacter</i> EPS<sup>-</sup> em diferentes concentrações de sulfato de amônio.....</b>	131
<b>Figura 18b - Perfil de crescimento (DO<sub>600nm</sub>) da cepa <i>Alcaligenes</i> EPS<sup>+</sup> em diferentes concentrações de sulfato de amônio.....</b>	132
<b>Figura 19a - Perfil de crescimento (DO<sub>600nm</sub>) da cepa <i>Enterobacter</i> EPS<sup>-</sup> em diferentes concentrações de Sulfato de Magnésio (SMg).....</b>	134
<b>Figura 19b - Perfil de crescimento (DO<sub>600nm</sub>) da cepa <i>Alcaligenes</i> EPS<sup>+</sup> em diferentes concentrações de Sulfato de Magnésio (SMg).....</b>	134
<b>Figura 20 - Perfil de crescimento (DO<sub>600nm</sub>) da cepa <i>Alcaligenes</i> EPS<sup>+</sup> mediante readição de Sulfato de Magnésio (SMg).....</b>	135
<b>Figura 21 - Curvas comparativas de produção/degradação do polímero de reserva em <i>Enterobacter</i> EPS<sup>-</sup> e EPS<sup>+</sup>, crescidos na presença de sulfato de amônio, na condição EC 03.....</b>	139
<b>Figura 22 - Curvas comparativas de produção/degradação do polímero de reserva em <i>Enterobacter</i> EPS<sup>-</sup> e EPS<sup>+</sup>, crescidos na presença de sulfato de amônio, na condição EC 10.....</b>	140
<b>Figura 23 - Curvas comparativas de produção/degradação do polímero de reserva em <i>Enterobacter</i> EPS<sup>-</sup> e EPS<sup>+</sup>, crescidos na presença de sulfato de amônio, na condição EN/2.....</b>	140

<b>Figura 24 - Curvas comparativas de produção/degradação do polímero de reserva em <i>Enterobacter</i> EPS<sup>-</sup> e EPS<sup>+</sup>, crescidos na presença de sulfato de amônio, na condição EC 20.....</b>	141
<b>Figura 25 - Curvas comparativas de produção/degradação do polímero de reserva em <i>Enterobacter</i> EPS<sup>-</sup> e EPS<sup>+</sup>, crescidos na presença de sulfato de amônio, na condição Mg/16.....</b>	143
<b>Figura 26a - Perfil de produção de massa celular, EPS, polímero de reserva e consumo de glucose durante o cultivo de <i>Enterobacter</i> EPS<sup>+</sup> na condição EC 05 (SA).....</b>	143
<b>Figura 26b- Perfil de produção de massa celular, polímero de reserva e consumo de glucose durante o cultivo de <i>Enterobacter</i> EPS<sup>-</sup> na condição EC 05 (SA).....</b>	144
<b>Figura 27a - Curvas comparativas de produção/degradação do polímero de reserva em <i>Enterobacter</i> EPS<sup>-</sup> e EPS<sup>+</sup>, crescidos na presença de caseína hidrolizada, na condição EC 20.....</b>	146
<b>Figura 27b - Curvas comparativas do consumo da glucose e pH em <i>Enterobacter</i> EPS<sup>-</sup> e EPS<sup>+</sup>, crescidos na presença de caseína hidrolizada, na condição EC 20.....</b>	147
<b>Figura 28a - Curvas comparativas de produção/degradação do polímero de reserva em <i>Enterobacter</i> EPS<sup>-</sup> e EPS<sup>+</sup>, crescidos na presença de caseína hidrolizada, na condição EN/2.....</b>	147
<b>Figura 28b - Curvas comparativas de consumo de glucose e efeito de pH em <i>Enterobacter</i> EPS<sup>-</sup> e EPS<sup>+</sup>, crescidos na presença de caseína hidrolizada, na condição EN/2 .....</b>	148
<b>Figura 29 - Perfil de produção de massa celular, polímero de reserva e consumo de glucose durante o cultivo de <i>Enterobacter</i> EPS<sup>-</sup> na condição EC 10 (CH).....</b>	149
<b>Figura 30 - Perfil de produção de massa celular, EPS, polímero de reserva e consumo de glucose durante o cultivo de <i>Enterobacter</i> EPS<sup>+</sup> na condição EC 10 (CH).....</b>	149
<b>Figura 31 - Perfil de produção de massa celular, polímero de reserva e consumo de glucose durante o cultivo de <i>Enterobacter</i> EPS<sup>-</sup> na condição EC 03 (CH).....</b>	151

<b>Figura 32 - Perfil de produção de massa celular, EPS, polímero de reserva e consumo de glucose durante o cultivo de <i>Enterobacter</i> EPS<sup>+</sup> na condição EC 03 (CH).....</b>	151
<b>Figura 33 - Perfil de consumo da glucose (g/l) pela cepa <i>Enterobacter</i> EPS<sup>+</sup> crescido em presença das duas fontes de nitrogênio (SA ou CH).....</b>	153
<b>Figura 34 - Perfil de produção da massa celular (g/l) pela cepa <i>Enterobacter</i> EPS<sup>+</sup>, crescida no meio de D&amp;M referencial, na presença das duas fontes de nitrogênio (SA ou CH).....</b>	154
<b>Figura 35 - Média da produção de massa celular, na fase estacionária, pela cepa <i>Enterobacter</i> EPS<sup>+</sup>, crescida na presença das duas fontes de nitrogênio (SA ou CH).....</b>	155
<b>Figura 36a - Perfil da produção absoluta do exopolissacarídeo (g/l) pela cepa <i>Enterobacter</i> EPS<sup>+</sup> nas duas fontes de nitrogênio (SA ou CH).....</b>	156
<b>Figura 36b - Perfil de produção de massa celular, EPS, polímero de reserva e consumo de glucose durante o cultivo de <i>Enterobacter</i> EPS<sup>+</sup> na condição EC 20 (CH).....</b>	157
<b>Figura 37 - Produção relativa do exopolissacarídeo (PEPS) pela cepa <i>Enterobacter</i> EPS<sup>+</sup>, crescida na presença das duas fontes de nitrogênio (SA ou CH).....</b>	158
<b>Figura 38 - Rendimento de exopolissacarídeo (Y<sub>EPS</sub>) pela cepa <i>Enterobacter</i> EPS<sup>+</sup>, crescida na presença das duas fontes de nitrogênio (SA ou CH).....</b>	159
<b>Figura 39a - Máximo acúmulo do polímero de reserva (PR<sub>máx</sub>) relativo à massa celular (%PSC), pela cepa <i>Enterobacter</i> EPS<sup>+</sup>, crescida na presença das duas fontes de nitrogênio (SA ou CH).....</b>	160
<b>Figura 39b - Curvas comparativas de produção/degradação do polímero de reserva pela cepa <i>Enterobacter</i> EPS<sup>+</sup> nas duas fontes de nitrogênio (SA ou CH).....</b>	160
<b>Figura 40a - Perfil de produção de massa celular, EPS, polímero de reserva e consumo de glucose durante o cultivo de <i>Alcaligenes</i> EPS<sup>+</sup> na condição EC 10 (SA).....</b>	162
<b>Figura 40b - Perfil de produção de massa celular, EPS, polímero de reserva e consumo de glucose durante o cultivo de <i>Alcaligenes</i> EPS<sup>+</sup> na condição EN/2 (SA).....</b>	163
<b>Figura 40c - Perfil de produção de massa celular, EPS, polímero de reserva e consumo de glucose durante o cultivo de <i>Alcaligenes</i> EPS<sup>+</sup> na condição Mg/16 (SA).....</b>	163

<b>Figura 41 - Produção relativa do exopolissacarídeo (<math>\pi_{EPS}</math>) pela cepa <i>Alcaligenes</i> EPS<sup>+</sup>, crescida na presença de caseína hidrolizada (CH) como fonte de nitrogênio.....</b>	165
<b>Figura 42a - Curvas de crescimento (anômalo) das cepas de <i>Alcaligenes</i>, crescidas na condição EMg/16 (CH).....</b>	166
<b>Figura 42b - Curvas de crescimento (normal) das cepas de <i>Alcaligenes</i>, crescidas na condição EC 10 (CH).....</b>	166
<b>Figura 43 - Perfil de consumo da glucose (g/l) pela cepa <i>Alcaligenes</i> EPS<sup>+</sup> crescida na presença das duas fontes de nitrogênio (SA ou CH).....</b>	168
<b>Figura 44a - Perfil de crescimento (DO<sub>600nm</sub>) da cepa <i>Alcaligenes</i> EPS<sup>+</sup>, crescida na presença das duas fontes de nitrogênio (SA ou CH).....</b>	169
<b>Figura 44b - Perfil de crescimento (DO<sub>600nm</sub>) da cepa <i>Alcaligenes</i> EPS<sup>+</sup>, crescida na presença das duas fontes de nitrogênio (SA ou CH).....</b>	169
<b>Figura 45 - Média da produção de massa celular, na fase estacionária, pela cepa <i>Alcaligenes</i> EPS<sup>+</sup>, crescida na presença das duas fontes de nitrogênio (SA ou CH).....</b>	170
<b>Figura 46a - Perfil da produção absoluta do exopolissacarídeo (g/l) pela cepa <i>Alcaligenes</i> EPS<sup>+</sup>, crescida na presença das duas fontes de nitrogênio (SA ou CH).....</b>	171
<b>Figura 46b - Perfil de produção de massa celular, EPS, polímero de reserva e consumo de glucose durante o cultivo de <i>Alcaligenes</i> EPS<sup>+</sup> na condição EC 03 (CH).....</b>	172
<b>Figura 47 - Produção relativa do exopolissacarídeo (<math>\pi_{EPS}</math>) pela cepa <i>Alcaligenes</i> EPS<sup>+</sup>, crescida na presença das duas fontes de nitrogênio (SA ou CH).....</b>	173
<b>Figura 48 - Rendimento de exopolissacarídeo (<math>Y_{EPS}</math>) pela cepa <i>Alcaligenes</i> EPS<sup>+</sup>, crescida na presença das duas fontes de nitrogênio (SA ou CH).....</b>	174
<b>Figura 49 - Perfil de pH da cepa <i>Enterobacter</i> EPS<sup>+</sup>, crescida na presença de diferentes concentrações do Tampão Fosfato (TF).....</b>	177
<b>Figura 50 - Perfil de crescimento (DO<sub>600nm</sub>) da cepa <i>Enterobacter</i> EPS<sup>+</sup>, crescida na presença de diferentes concentrações do Tampão Fosfato (TF).....</b>	178

<b>Figura 51</b> - Curvas de consumo de glucose e pH, empregando-se a cepa <i>Enterobacter</i> EPS <sup>-</sup> , com 20,0 g/l de glucose e concentração do tampão referencial.....	180
<b>Figura 52</b> - Curvas de consumo de glucose e efeito de pH, empregando-se a cepa <i>Enterobacter</i> EPS <sup>+</sup> , com 20,0 g/l de glucose e concentração do tampão referencial.....	180
<b>Figura 53</b> - Curvas de produção/degradação do polímero intracelular e pH, empregando-se a cepa <i>Enterobacter</i> EPS <sup>-</sup> , com 20,0 g/l de glucose e concentração do tampão referencial.....	181
<b>Figura 54</b> - Curvas de consumo de glucose e pH, empregando-se a cepa <i>Enterobacter</i> EPS <sup>-</sup> , com 20,0 g/l de glucose e concentração do tampão duplicada.....	182
<b>Figura 55</b> - Curvas comparativas de produção/degradação do polímero intracelular, empregando-se a cepa <i>Enterobacter</i> EPS <sup>-</sup> , nas duas concentração do tampão fosfato.....	182
<b>Figura 56</b> - Curvas comparativas de produção/degradação do polímero intracelular, empregando-se a cepa <i>Enterobacter</i> EPS <sup>+</sup> , nas duas concentrações do tampão fosfato.....	183
<b>Figura 57</b> - Perfil de aumento da viscosidade dos meios de culturas de <i>Alcaligenes</i> EPS <sup>+</sup> , crescido na presença de diferentes concentrações de glucose; ("shear rate" = 10 s <sup>-1</sup> ).....	184
<b>Figura 58</b> - Perfil do aumento comparativo entre as viscosidades dos meios de culturas de <i>Enterobacter</i> EPS <sup>+</sup> e <i>Alcaligenes</i> EPS <sup>+</sup> , crescidos na presença de 10,0 g/l de glucose; ("shear rate" = 10 s <sup>-1</sup> ).....	185
<b>Figura 59</b> - Viscosidade das soluções do exopolissacarídeo isolado, produzido em diferentes tempos de cultivo por <i>Alcaligenes</i> EPS <sup>+</sup> ; ("shear rate" = 10 s <sup>-1</sup> ).....	186
<b>Figura 60</b> - Microscopia ótica do biofilme fresco de <i>Acetobacter xylinum</i> corado com Coomassie R.....	188
<b>Figura 61</b> - Micrografia eletrônica de varredura (SEM) de uma célula de <i>Acetobacter xylinum</i> (cepa "JF") aprisionada no biofilme.....	188
<b>Figura 62</b> - Aspecto comparativo das membranas processadas de <i>Acetobacter xylinum</i> .....	191
<b>Figura 63</b> - Teste cromogênico em placa para a natureza celulósica do biofilme de <i>Acetobacter</i> .....	196
<b>Figura 64</b> - Cromatografia em camada delgada dos açúcares liberados do biofilme de	

<i>Acetobacter</i> , após a ação de enzimas celulolíticas (Celluclast®).....	197
<b>Figura 65</b> - Diagrama de raio-X do biofilme de <i>Acetobacter</i> sob diferentes tratamentos....	200
<b>Figura 66a</b> - Micrografia eletrônica de varredura do BioFill® novo, impregnado com tetraóxido de ósmio.....	202
<b>Figura 66b</b> - Micrografia eletrônica de varredura do BioFill® usado + fragmentos de crosta epidermal, impregnado com tetraóxido de ósmio.....	202
<b>Figura 67</b> - Aplicação do BioFill® à pele humana queimada.....	203
<b>Figura 68</b> - Aderência do BioFill® e propriedades de filtração.....	204

## ABSTRACT

Many exopolysaccharides (EPS)-producing bacterial strains also synthesize storage polymers. The production of slime EPS and of the storage polymers glycogen and polyhydroxybutyrate (PHB) were compared in batch cultures of EPS<sup>+</sup> and EPS<sup>-</sup> isogenic strains of *Enterobacter aerogenes* type 8 and *Alcaligenes* sp (ATCC 31961). Conditions of nutrient imbalance with high C:N ratios favoured both EPS and storage polymer synthesis and resulted in little subsequent degradation of glycogen (in *Enterobacter*) and PHB (in *Alcaligenes*). Glycogen synthesis was consistently lower in the EPS<sup>+</sup> than in EPS<sup>-</sup> *Enterobacter* strain, indicating that substrate was preferentially used for EPS production. Reduced levels of carbon substrate, in the growth medium, resulted in lower storage polymers synthesis and degradation of them in EPS-producing bacteria. Considerable differences in the synthesis and breakdown of intracellular carbohydrate were observed comparing bacteria grown in synthetic media with ammonium sulfate and the same bacteria grown in medium with casein hydrolysate, as nitrogen source. Growth in media depleted in magnesium was slower than in complete media, in both genera, but high yields of glycogen were obtained either with the EPS<sup>+</sup> or EPS<sup>-</sup> *Enterobacter* strains. *Alcaligenes* EPS<sup>+</sup> strain did not have increase in PHB accumulation, with magnesium depletion, but reached its better yield in EPS production.

A bacterial strain with morphological and biochemical properties close to *Acetobacter xylinum* has been cultured in nonagitated, inverted sucrose- and yeast water-based medium for the production of thick, smooth, and floating cellulosic pellicles. The cellulose content (> 90% dry weight, depending on the efficiency of water washing) and the  $\beta$ -D-homopolyglucan nature of these pellicles were assessed by physical, chemical, and enzymatic methods.

Caffeine and related xanthines were identified as potent stimulators for bacterial cellulose production in *Acetobacter xylinum*. These compounds are present in several plants

whose infusions are useful as culture-medium supplements for this acetobacterium. The proposed target for these native purine-like inhibitory substances is the novel diguanyl nucleotide phosphodiesterase(s) that participate(s) in the bacterial cellulogenic complex. A better understanding of this feature of *A. xylinum* physiology may facilitate the preparation of bacterial cellulose pellicles, which are being applied as a biotechnological tool in the treatment of skin burns and other dermal injuries.

## RESUMO

Muitas cepas bacterianas produtoras de exopolissacarídeos (EPS) também sintetizam polímeros de reserva. A produção de EPS "slime" e dos polímeros de reserva glicogênio e polihidróxibutirato (PHB) das cepas isogênicas (EPS<sup>+</sup> e EPS<sup>-</sup>) de *Enterobacter aerogenes* tipo 8 e *Alcaligenes* ATCC 31961 foram comparadas em cultivo em batelada ("batch culture"). Condições de desequilíbrio nutricional com altas relações C:N favoreceram a síntese tanto de EPS como de polímero de reserva, e resultaram em pequena degradação posterior de glicogênio (em *Enterobacter*) e PHB (em *Alcaligenes*). Na cepa EPS<sup>+</sup> de *Enterobacter*, a síntese de glicogênio foi compativelmente mais baixa do que na cepa EPS<sup>-</sup>, indicando que o substrato foi preferencialmente usado para a produção de EPS. Níveis reduzidos do substrato de carbono, no meio de cultura, resultaram em menor síntese dos polímeros de reserva e degradação deles nas bactérias produtoras de EPS. Considerável diferenças na síntese e quebra do carboidrato intracelular foram observadas entre as bactérias crescidas em meio sintético com sulfato de amônio e as mesmas bactérias crescidas em meio com caseína hidrolizada, como fonte de nitrogênio. O crescimento em meio com magnésio reduzido foi menor que no meio completo, em ambos os gêneros, todavia foram obtidos altos rendimentos de glicogênio tanto na cepa *Enterobacter* EPS<sup>+</sup> como na EPS<sup>-</sup>. A cepa de *Alcaligenes* EPS<sup>+</sup> não teve aumento no acúmulo de PHB, com redução do magnésio, mas alcançou seu melhor rendimento na produção de EPS.

Uma cepa bacteriana com propriedades morfológicas e bioquímicas aproximadas ao *Acetobacter xylinum* foi cultivada em meio não agitado, baseado em sacarose invertida e água de levedura para a produção de películas celulósicas flutuantes, lisas e espessas. O conteúdo de celulose (> 90% do peso seco, dependendo da eficiência na lavagem com água) e a natureza  $\beta$ -D-homopoliglucana das películas foram estimadas por métodos físicos, químicos e enzimáticos.

Cafeína e xantinas relacionadas foram identificadas como potentes estimuladores para a produção de celulose em *Acetobacter xylinum*. Estes compostos estão presentes em várias plantas cujas infusões vegetais são úteis como suplementos para os meios de cultura para esta acetobactéria. O alvo proposto para estas substâncias nativas inibitórias semelhantes à purina é a fosfodiesterase diguanil nucleotídeo, que participa no complexo celulogênico bacteriano. Um melhor entendimento desta característica da fisiologia de *Acetobacter xylinum* pode facilitar a preparação de películas celulósicas bacterianas, que estão sendo aplicadas como uma ferramenta biotecnológica no tratamento de queimaduras da pele e outras injúrias dérmicas.

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Durante as seis primeiras décadas do século XX, a ciência dos polímeros tendeu no sentido de substituir os materiais naturais, tais como fibras de plantas e proteínas animais, por plásticos sintéticos, produtos de uma indústria química então florescente (DAWES, 1990). Materiais como lã, algodão, seda e madeira foram os alvos deste desenvolvimento, uma vez percebido que as flutuações na qualidade e disponibilidade destes produtos naturais seriam então eliminadas. Em países desenvolvidos, já enfrentando a escassez de suas reservas naturais, o sucesso da indústria petroquímica assegurou que plásticos derivados de petróleo fossem mais baratos que seus similares naturais. Embora no Terceiro Mundo este não tenha sido inicialmente o caso, por muito tempo os polímeros naturais continuaram sendo preferidos aos caros plásticos importados.

Existe uma vantagem muito grande e óbvia que os polímeros naturais têm sobre os produtos da indústria petroquímica - eles são fontes biodegradáveis e renováveis.

Plásticos petroquímicos descartados contribuem para a poluição do meio ambiente; e enquanto são feitas algumas tentativas limitadas em reciclagem, o material acaba sobre as praias, nos oceanos ou obstruindo aterros sanitários (BRANDAL, GROSS et al., 1990). Consequentemente, durante as duas últimas décadas, houve um crescimento na consciência e aumento do senso de responsabilidade pela poluição, despertada principalmente por grupos de pressão e defesa ambiental. Isto tem conduzido à pesquisa dirigida na busca de alternativas biodegradáveis para os derivados petroquímicos. A procura destes novos polímeros naturais, que devem possuir as desejadas características dos produtos sintéticos, tem impulsionado a pesquisa, ajudando a abrir caminho para o mercado de um grupo de produtos naturais - os polímeros microbianos.

Estes polímeros ocorrem como inclusões intracelulares que são normalmente referidas como materiais de reserva, *e.g.* polissacarídeos semelhantes ao glicogênio, polihidroxibutirato (PHB) e materiais relacionados (polihidroxialcanatos), polifosfatos e cianoficina, ou como polissacarídeos extracelulares (EPS), na forma de cápsula ou limo ("slime") (DAWES, 1990). A formação desta diversidade de compostos pelos microrganismos é de formidável interesse intrínseco, pois reflete respostas a seus ambientes contíguos. Nos microrganismos falta o elegante mecanismo homeostático que existe nos organismos superiores e para responder às mudanças ambientais, estão envolvidos processos regulatórios mais grosseiros. Por estarem em contato direto com o meio que os cercam, são grandemente influenciados por e dependentes de sua composição. Ocorrendo uma limitação nutricional ou variação nas condições ambientais na presença de excesso de carbono, fósforo, nitrogênio ou enxofre, pode ocorrer deposição de um ou mais destes materiais, sem qualquer efeito significativo na pressão osmótica intracelular. A presença de tais materiais permite a sobrevivência sob condições adversas e capacita o microrganismo a responder rapidamente, quando condições favoráveis são restauradas (DAWES, 1989). Alguns organismos são capazes de produzir mais de um tipo de material, e o entendimento dos mecanismos de controle envolvidos tornam-se essenciais do ponto de vista industrial para evitar o desvio de substrato em produto indesejado.

## 1.1 EXOPOLISSACARÍDEOS

### 1.1.1 INTRODUÇÃO E DEFINIÇÃO

A superfície celular microbiana é fonte riquíssima de moléculas contendo carboidratos. Alguns deles são tipos raros, restritos a uma faixa limitada de microrganismos. Estes são os componentes da parede celular microbiana, tais como mananos nas leveduras, ácidos teicóico e teicurônico, lipopolissacarídeos e peptidoglicanas em bactérias. A arquitetura da superfície celular das bactérias Gram-negativas está representada na figura 1.

Figura 1 - Diagrama mostrando a arquitetura da superfície celular de bactérias Gram-negativas

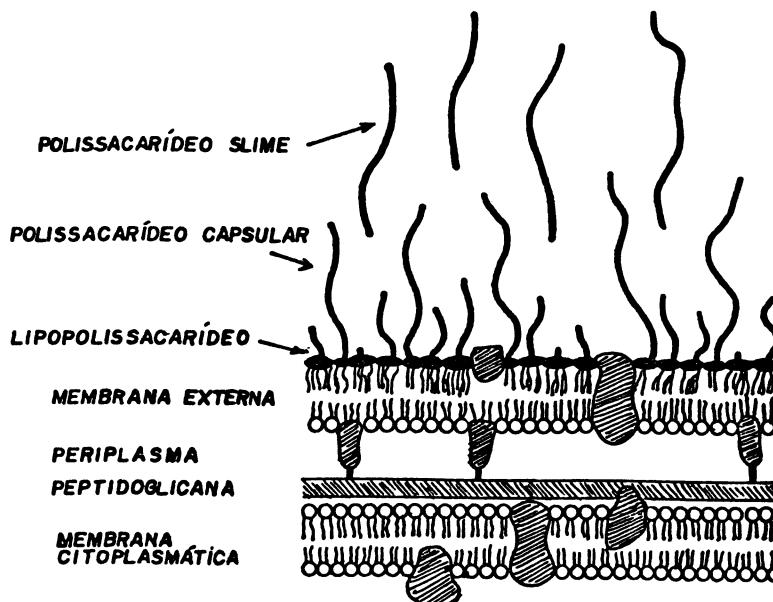


Figura retirada da referência WHITFIELD & VALVANO, 1993

O citoplasma da célula bacteriana é cercado pela membrana citoplasmática. Esta bicamada lipídica é permeável a água e alguns compostos hidrofóbicos pequenos, e contém a maquinaria para o transporte de elétrons, fosforilação oxidativa e transporte de solutos. A

biossíntese de muitos componentes da superfície celular, incluindo polissacarídeos, envolve enzimas e complexos enzimáticos encontrados na membrana citoplasmática. A camada de peptidoglicana, que se localiza imediatamente após o lado externo da membrana citoplasmática, é necessária para a manutenção da forma e rigidez celular. As bactérias Gram-negativas possuem um periplasma que contém uma variedade de proteínas e enzimas, incluindo algumas envolvidas na importação e exportação de macromoléculas. Embora seja frequentemente chamado como espaço periplásmtico, o periplasma é preenchido por um gel periplásmtico eletrondenso (HOBOT, CARLEMALM et al., 1984). O periplasma é contido pela membrana externa, que é composta de proteínas, fosfolipídeos e uma molécula distinta, chamada lipopolissacarídeo (LPS) (LUGTENBERG & ALPHEN, 1983); (NIKAIDO & VAARA, 1985). A presença de LPS no folheto externo da membrana externa resulta numa camada lipídica atípica e pode fornecer uma fronteira hidrofílica na superfície celular. Em muitas bactérias de diversos nichos ecológicos, a hidrofilicidade da superfície é aumentada por uma camada de polissacarídeo extracelular (EPS). O EPS pode tomar a forma de uma camada coesiva aderente (frequentemente ligada covalentemente), formando a entidade morfológica chamada cápsula (polissacarídeo capsular, CPS). Alternativamente, o EPS pode consistir de um polissacarídeo solto ("slime"), com pouca ou nenhuma associação celular. O termo "polissacarídeo extracelular ou exopolissacarídeo" pode ser usado tanto para descrever o polissacarídeo "slime" quanto o capsular (SUTHERLAND, 1988b). Existem várias formas nas quais os polissacarídeos podem estar organizados na superfície celular. Ao nível mais simples, alguns EPS podem ser libertados diretamente da célula sem qualquer molécula terminal que serviria como uma âncora à superfície celular. Estes polímeros frequentemente formam EPS "slime" com mínima associação celular. Porém, na maioria dos exemplos, a definição de "slime" é operacional; sendo normalmente baseada na retenção do EPS sobre a superfície celular durante a centrifugação. É inevitável que componentes da superfície celular sejam removidos durante o crescimento, ou pela exposição à forças de cizalhamento durante a centrifugação (WHITFIELD & VALVANO, 1993).

A definição de EPS é mais difícil do que a definição dos polímeros contendo carboidratos, encontrados nas paredes microbianas. O termo EPS tem sido largamente empregado para descrever polissacarídeos encontrados do lado de fora da superfície externa da membrana celular microbiana.

O termo "glicocálix", introduzido por Costerton e colaboradores (COSTERTON, IRVIN et al., 1981), falha em diferenciar as distintas entidades químicas encontradas na superfície microbiana. Ele tem sido usado para várias espécies macromoleculares, incluindo componentes verdadeiramente extracelulares, com PS de parede e muitos outros compostos não contendo carboidratos. Embora o termo possa descrever estruturas vistas sob o microscópio ótico ou eletrônico, é inadequado em termos químicos.

Os EPS diferem das várias inclusões poliméricas intracelulares por não servirem normalmente como materiais de reserva, nem como produtos do superfluxo metabólico. Alguns destes polímeros podem apresentar forte similaridade química com componentes da parede celular, mas a maioria são estruturas químicas distintas, não relacionadas aos constituintes celulares. A celulose de *Acetobacter xylinum* é um exemplo típico. Os EPS ocorrem extensivamente, especialmente entre espécies procarióticas, tanto entre aqueles saprófitas quanto entre os que são patogênicos a humanos, animais e plantas (SUTHERLAND, 1990). Suas precisas funções são incertas, mas têm sido formuladas várias propostas, e.g. aderência às superfícies, papel protetor contra fagocitose e ataques de alguns fagos e condições ambientais adversas, barreira para difusão, envolvimento na ligação ou destoxificação de fons metálicos. Sobretudo, parece provável que eles proporcionem uma barreira protetora geral (SUTHERLAND, 1988a).

Há mais de uma década, a produção de EPS foi identificada como sendo uma área promissora para a indústria de fermentação (SUTHERLAND & ELWOOD, 1979). Estes compostos modificam as propriedades reológicas das soluções aquosas por geleificação ou por alterações de fluxo, propriedades que estão em grande demanda na indústria de alimentos, tintas, farmacêutica e indústrias têxteis. Porém, o maior mercado para EPS é considerado o

emprego da goma xantana como agente controlador da mobilidade no processo de aumento da recuperação do petróleo, permitindo a recuperação de algo estimado em torno de 66% do que permanece (SANDFORD, 1979; GABRIEL, 1979). A goma xantana, produzida principalmente por *Xanthomonas campestris*, tem sido usada especialmente para este propósito, uma vez que é capaz de suportar temperaturas acima de 80°C por períodos de 3 a 4 anos.

Até relativamente pouco tempo, o uso industrial de polissacarídeos era restrito a materiais originados de plantas e algas marinhas. Estes produtos tradicionais incluem amido, alginato, agar, carragenana, goma de alfarroba e outros galactomananos de plantas. Tais polímeros são amplamente empregados na indústria farmacêutica e alimentícia, mas têm muitas outras aplicações industriais. Estes polissacarídeos nem sempre podem estar prontamente disponíveis na qualidade exigida devido às variações ambientais incontroláveis, ou suas propriedades reológicas podem não combinar com aquelas requisitadas. Portanto, EPS microbianos podem preencher uma falha na disponibilidade destes polímeros ou ainda substituir um produto tradicional em termos das características reológicas e estabilidade melhoradas, uma vez que eles podem ser produzidos em condições pré-estabelecidas, totalmente controladas.

A hidrossolubilidade não é contudo uma condição *sine qua non* para o aproveitamento. Um exemplo desta assertiva é o uso biotecnológico da celulose microfibrilar excretada por *Acetobacter xylinum* (FONTANA & ABILHOA, 1989)

Existem dois grupos de EPS, homopolissacarídeos e heteropolissacarídeos definidos por sua composição monomérica. Homopolissacarídeos podem ser distinguidos por seus locais de síntese e substrato (SUTHERLAND, 1982). Deste modo, dextranos e levanos são sintetizados a partir de um substrato específico, sacarose, por processo essencialmente extracelular. O outro grupo de homopolissacarídeos são sintetizados intracelularmente a partir de várias fontes de carbono e então excretados, *e.g.* celulose, pululano e ácido polissialíco.

Os heteropolissacarídeos têm sido divididos em três grupos, isto é, aqueles formados a partir de uma fonte de carbono específica, aqueles compostos de estruturas de unidades repetitivas (dissacarídeos a octassacarídeos) que incluem xantana e "curdlan", e

alginato composto de dois monômeros em *Azotobacter vinelandii* (ácido *D*-manurônico e *L*-gulurônico), sem unidade repetitiva (SUTHERLAND, 1982).

A presença de EPS associado com células microbianas crescidas em superfície sólida é freqüentemente reconhecível pela morfologia mucóide da colônia. Em meio líquido, culturas produtoras de EPS podem tornar-se muito viscosas ou, excepcionalmente, podem solidificar como um gel. (SUTHERLAND, 1988b)

Infelizmente, muitos dos relatos descritos de PS extracelulares produzidos em laboratório e nos ambientes naturais não têm conseguido reconhecer a relação existente entre as formas físicas destas macromoléculas e as presentes condições fisiológicas. Mudanças nas condições de cultivo podem alterar drasticamente a composição, propriedades físicas e organização do PS na superfície bacteriana. (SUTHERLAND, 1988b)

A visualização de EPS sob microscopia ótica é possível através de coloração negativa ou através do uso de corantes especializados, os quais freqüentemente utilizam a função polianiônica de muitos destes polímeros. A coloração negativa apresenta a vantagem de distinção entre polissacarídeo capsular e "slime". (SUTHERLAND, 1988b)

Técnicas, tais como Microscopia de Varredura (SEM), freqüentemente dão forte evidência da presença de EPS, mas não são capazes de proverem evidências químicas confirmatórias. Do mesmo modo, as modernas técnicas de Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) podem revelar considerável informação sobre estruturas de superfície, inclusive os polissacarídeos envolvidos, mas não são capazes de distinguir entre diferentes tipos químicos, nem tem suficiente resolução para dar muita informação sobre microestrutura da cápsula bacteriana. Infelizmente, o altíssimo conteúdo de água dos EPS (em excesso de 99%), dificulta a preparação e resolução. (SUTHERLAND, 1988b; BAYER, CARLEMALM et al., 1985; BAYER & THUROW, 1977). Métodos de microscopia melhorados também podem ser usados para estudar a estrutura de polissacarídeos puros, quando preparados em solução aquosa. Isto pode proporcionar evidências para suas conformações em solução e para

interações intramoleculares (STOKKE, ELGSAETER et al., 1987; KOREEDA, HARADA et al., 1974).

No caso da secreção dos filamentos de celulose bacteriana, a documentação microscópica é uma tarefa extremamente fácil (ZAAR, 1979).

### 1.1.2 COMPOSIÇÃO

Os EPS são compostos primariamente de carboidratos, mas além de vários açúcares eles também podem ser orgânica e inorganicamente substituídos.

Os carboidratos encontrados em EPS microbianos são extremamente diversos. A maioria dos açúcares são aqueles comumente encontrados nos PS de animais e plantas. *D*-glucose, *D*-galactose e *D*-manose estão presentes em muitos EPS na forma piranosídica. As 6-deoxi-hexoses, *L*-fucose e *L*-ramnose, também estão presentes com freqüência. A distinção entre eucariotos e procariotos pode ser observada pelas pentoses. Polissacarídeos eucarióticos podem conter pentoses tais como *D*-ribose e *D*-xilose, mas a ocorrência delas é menos comum em polímeros extracelulares derivados de procariotos (SUTHERLAND, 1990).

Além dos monossacarídeos mais comuns, alguns PS podem conter um ou mais açúcares raros. Estes podem incluir *L*-hexoses ou formas furanosídicas das hexoses glucose e galactose. Também existem vários açúcares *N*-acetilaminados, embora por enquanto estes ainda não tenham sido encontrados em nenhum dos PS microbianos de importância industrial (JANSSON, LINBERG et al., 1981). Os açúcares aminados mais comuns são *N*-acetil-*D*-glucosamina e *N*-acetil-*D*-galactosamina. (SUTHERLAND, 1990).

Muitos, ou até mesmo a maioria dos EPS microbianos são de natureza polianiónica. Isto resulta da presença de ácidos urônicos em muitos deles, sendo que o ácido *D*-glucurônico é o mais encontrado. O ácido *D*-galacturônico é menos freqüente, e apenas um número pequeno de PS contém o ácido *D*-manurônico (SUTHERLAND, 1990). Embora a maioria dos PS

contém apenas um tipo de ácido urônico, o ácido *D*-manurônico normalmente está presente nos alginatos bacterianos junto com o ácido *L*-gulurônico (SUTHERLAND, 1991).

Além de carboidratos, os EPS microbianos contêm vários substituintes ligados na forma de éster e cetal (piruvato). O acetato, como substituinte esterificado, não contribui para a carga geral na molécula polissacarídica; enquanto que, cetais com piruvato adicionam natureza aniónica aos polímeros (IELP, COUSO et al., 1981b; IELP, COUSO et al., 1983). O piruvato está normalmente presente em razões estequiométricas com os componentes açúcares do EPS e normalmente ligado a uma hexose neutra. Porém, ocasionalmente pode estar ligado a ácido urônico. (BEBAUT, DUTTON et al., 1978; DUTTON & SAVAGE, 1980a; ERBING, KENNE et al., 1976). O piruvato está comumente acompanhado de resíduos de ácido urônico, ambos contribuindo para a carga total aniónica. Em alguns EPS, o piruvato sozinho é responsável pela natureza aniónica do polímero. Isto está de acordo com um PS de *E. coli* e do material de *Zooglea ramigera*. Ambos os polímeros contêm *D*-glucose e *D*-galactose como únicos monossacarídeos, sendo o piruvato ligado à galactose (ANDERSON, PAROLIS et al., 1987; FRANZEN & NORBERG, 1984);

O componente esterificado mais comum é o acetato, mas grupos propionil também foram encontrados no EPS de *E. coli* K 14 e K52 (JANN, HOFFMANN et al., 1983); e resíduos de glicerol esterificado formam parte da estrutura do polímero de *Pseudomonas elodea*, antes de ser convertido à forma desacetilada, que é vendido como "gellan gum" ou Gelrite® (JANSSON, LINDBERG et al., 1983; KUO, MORT et al., 1986). Em cada caso, estes ésteres raros estão presentes bem como acetato e contribuirão para a natureza lipofílica de parte da molécula polissacarídica. Grupos succinilas, quando meio ester, também são encontrados acompanhados de grupos acetil e piruvato, e podem representar até 7% do peso do EPS de certas espécies de *Rhizobium* e de *Agrobacterium* (HISAMATSU, SANO et al., 1978; AMEMURA & HARADA, 1983). O 3-hidróxibutanoato também está presente em alguns PS bacterianos, esterificados à *D*-galactose. Este substituinte é encontrado em materiais de *R. trifolii* e *R. leguminosarum*. (HOLLINGSWORTH, ABE et al., 1984; HOLLINGSWORTH,

DAZZO et al., 1987; KUO & MORT, 1986). Grupos lactil são encontrados em alguns EPS de *Klebsiella aerogenes*. (LINDBERG, LINDQUIST et al., 1977). Embora tenha se pensado que formiato estivesse presente em alguns PS de *K. aerogenes*, sua presença neste grupo de EPS foi deixado de lado como indigno de confiança, depois de reexaminação com espectroscopia de FAB ("fast atom bombardment") (DELL, DUTTON et al., 1983).

O conteúdo de grupos acilas de alguns PS pode ser relativamente alto e, determinando o aumento da lipofilicidade da molécula, que pode afetar a capacidade de interagir com outros PS e com os cátions.

Em muitos EPS os grupos acilas são encontrados em razões estequiométricas relativos aos monossacarídeos presentes, mas isto não é sempre o caso. Vários polímeros contêm substituintes acilas em unidades repetitivas alternadas. Outros polímeros podem ser mais randômicos na sua acilação e deve-se ter em mente que a maioria das preparações comerciais de goma xantana apenas contêm piruvato sobre aproximadamente 30% dos resíduos manosilas das cadeias terminais (SUTHERLAND & ELWOOD, 1979). Em alginatos bacterianos, nos quais falta qualquer estrutura repetitiva, o conteúdo de grupos acetil pode ser de 15-20%, sendo acetilados apenas os resíduos *D*-manurônicos (DAVIDSON, SUTHERLAND et al., 1977; SKAJÅK-BRÆK, GRASDALEN et al., 1986). Alginatos bacterianos também pertencem ao pequeno grupo de polímeros nos quais foi detectado múltiplas acetilações de um mesmo resíduo de açúcar (SHERBROCK-COX, RUSSEL et al., 1984; SKAJÅK-BRÆK, GRASDALEN et al., 1986).

A presença de amino-ácidos em EPS bacterianos tem sido relatado. A serina foi encontrada no EPS de *E. coli* K40 (DENGLER, JANN et al., 1986), e o ácido *L*-glutâmico foi detectado durante a reexaminação do PS de *K. aerogenes* tipo K82 (JANSSON, LINBERG et al., 1988).

Pensou-se por muito tempo que sulfato era restrito a PS eucarióticos e proteoglicanas, mas agora há também indícios de que sulfato também esteja presente em alguns polímeros procarióticos. Por enquanto, estes são exclusivos às espécies das cianobactérias. A

bainha extracelular ou floculante produzida pelas espécies cianobacterianas do gênero *Phormidium* é um dos tais heteropolissacarídeos sulfatados (BAR-OR & SHILO, 1987).

Fosfato tem ocorrência muito mais difundida em PS bacterianos de significância imunológica. Muitos dos EPS fosforilados lembram os ácidos teicóicos presentes nas paredes de bactérias Gram-positivas; de fato, muitas cepas produzem polímeros de parede contendo fosfato e PS extracelulares (KENNE, LINBERG et al., 1977).

Assim como os componentes inorgânicos, que formam parte da estrutura dos EPS, deve ser lembrado que todos os polímeros polianiónicos serão normalmente obtidos na forma de sal. Os fons associam com o polímero durante sua produção, mas podem ser deslocados por procedimentos apropriados (troca iônica, eletrodiálise etc) para permitir a conversão no ácido livre ou na forma de sal uniforme (SUTHERLAND, 1990). Isto é importante na determinação de propriedades físicas de alguns EPS, mas não é normalmente necessário para produtos comerciais. Uma série de substituintes não carboidratos encontrados em EPS microbianos estão indicados na tabela 1.

Tabela 1 - Substituintes não carboidratos em exopolissacarídeos

Substituinte	Ligaçao	Bactéria produtora do EPS
<b>Ác. orgânicos</b>		
Acetato	éster	várias
Glicerato	éster	<i>Pseudomonas elodea</i>
Hidróxibutanato	éster	<i>Rhizobium Trifolii, R. leguminosarum</i>
Propionato	éster	<i>Escherichia coli</i>
Piruvato	cetal	várias
Succinato	éster	<i>Rhizobium</i> spp, <i>Agrobacterium</i> spp
<b>Aminoácidos</b>		
L-glutamato		<i>Klebsiella aerogenes</i> K82
Serina		<i>E. coli</i> K40

Tabela 1 - continuação

Substituinte	Ligaçāo	Bactéria produtora do EPS
<b>Ác. inorgânicos</b>		
Fosfato	várias	
Sulfato	cianobactéria	

Tabela retirada da referência Sutherland, 1990.

### 1.1.3 BIOSSÍNTSE

A biossíntese da maioria dos exopolissacarídeos (EPS) se parece muito ao processo pelo qual os polímeros da parede bacteriana peptidoglicana e lipopolissacarídeos (LPS) são formados. De fato, os três tipos de macromoléculas compartilham a característica de serem formados de associações dos monômeros, sendo sintetizados na membrana celular e exportados ao destino final, externo à membrana citoplasmática. As únicas exceções ocorrem com os EPS levano e dextrano, os quais são sintetizados por um processo totalmente extracelular (SUTHERLAND, 1990)

A formação dos precursores (açúcares nucleotídeos doadores ou "building blocks") para a síntese de polissacarídeos (PS) ocorre dentro do citoplasma (TONN & GANDER, 1979). Esta é provavelmente uma necessidade para assegurar que eles estejam sempre disponíveis, uma vez que eles são utilizados para vários sistemas que sintetizam polímeros diferentes. Como são livremente solúveis no citoplasma, eles podem ser prontamente canalizados ao processo biossintético apropriado, ocorrendo **na** ou **dentro** da membrana citoplasmática.

Para aqueles EPS que são sintetizados na membrana celular, existe um requerimento por precursores ativados: formas do monossacarídeo ricas em energia. Estes são principalmente açúcares nucleosídeo difosfato, mas um pequeno número de açúcares nucleosídeo monofosfato também atuam neste papel. Estes açúcares nucleotídeos operam potencialmente na síntese de

todos os polímeros contendo carboidratos encontrados fora da membrana microbiana. Todavia, nas bactérias, eles também são necessários para a síntese de polímeros de parede e, em muitas espécies, para a produção de oligossacarídeos derivados da membrana (MDO) encontrados principalmente no periplasma de bactérias Gram-negativas. Os açúcares nucleotídeos também são requeridos para a síntese de produtos de armazenamento intracelular como glicogênio e, principalmente em eucariotos, do dissacarídeo trealose. O provável destino do substrato (carboidrato) em termos de catabolismo e anabolismo é mostrado na figura 2.

Figura 2 - Rotas do anabolismo da glucose em bactérias Gram-negativas

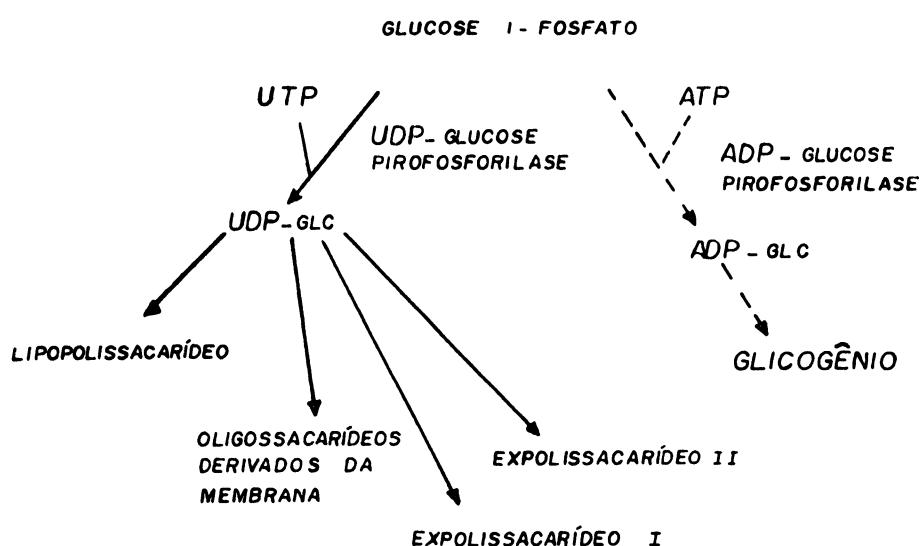


Figura retirada da referência Sutherland, 1990.

A maneira na qual o substrato (carboidrato) e o nucleotídeo açúcar são canalizados na produção destas diferentes moléculas não está bem clara, parece que é criticamente dependente das condições fisiológicas empregadas para o crescimento microbiano. Até agora, apenas um exemplo é conhecido, onde um determinado nucleotídeo açúcar é usado para a formação de uma glicana específica. Desta maneira, nos procariotos, ADP-D-glucose é empregado na síntese de glicogênio, enquanto que todos os outros polímeros contendo glucose parecem ser formados de UDP-D-glucose. Desta forma, a síntese do polímero de reserva glicogênio pode ser regulada de

uma maneira distinta da formação de glicanas. Ainda que os reguladores alostéricos para a atividade da ADP-*D*-glucose-pirofosforilase diferem em várias espécies bacterianas, são todos produtos primários do catabolismo de carboidratos ou da gluconeogenesis (PREISS & ROMEO, 1989).

Os açúcares nucleotídeos exercem várias funções: eles são intermediários monossacarídicos ativados (capaz de libertar 31,8 kJ mol<sup>-1</sup> na hidrólise, comparado com os 20 kJ mol<sup>-1</sup> de um açúcar fosfato) fornecendo a energia necessária para a montagem de seqüências oligossacarídicas sobre as moléculas carreadores apropriadas (SUTHERLAND, 1990). Eles também proporcionam um meio de interconversão de diferentes monossacarídicos. Isto pode ser realizado através de vários mecanismos: epimerização, oxidação, descarboxilação, redução e rearranjo. A interconversão de alguns dos açúcares nucleotídeos utilizados mais comumente está indicada na figura 3.

Figura 3 - Sistemas catabólicos conduzindo à síntese de nucleotídeo açúcar e interconversões

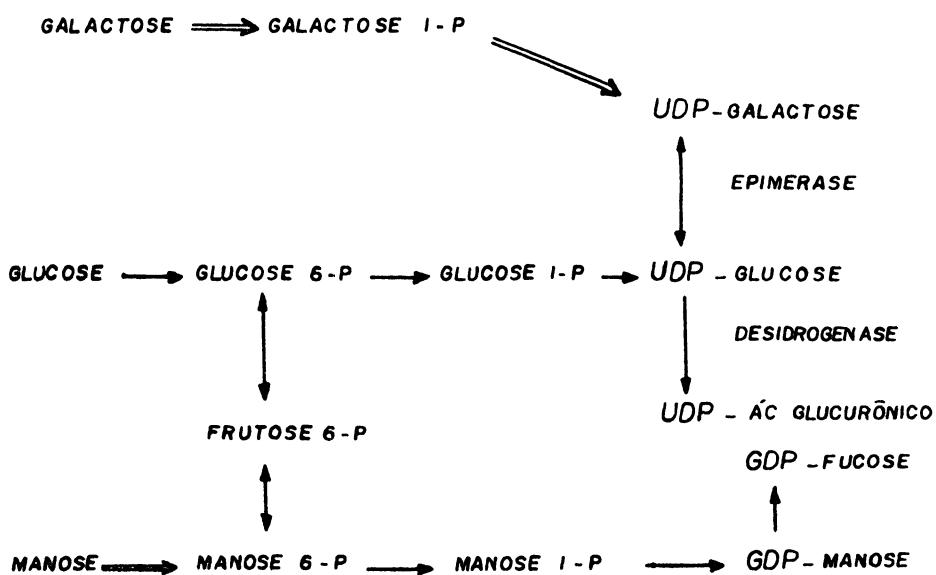


Figura retirada da referência Sutherland 1990.  
As setas abertas indicam sistemas catabólicos usados em substratos específicos

Com a descoberta de que a *D*-galactofuranose é um componente de alguns EPS, torna-se claro que um outro papel dos açúcares nucleotídeos era aquela de prover um mecanismo de interconversão da forma piranose para a furanose, e de produzir a forma ativa dos últimos (DUTTON & SAVAGE, 1980b). Isto é conseguido através do intermediário contendo galactose normal.

A perda da capacidade para a síntese de nucleotídeo açúcar normalmente leva à perda da produção de PS. Como pode ser visto da figura 3, se certos mutantes forem supridos com o monossacarídeo apropriado, pode ser possível que através de fosforilação do açúcar e subsequente envolvimento de uma *nucleotídeo açúcar pirofosforilase*, desviando a parte da via biossintética perdida por mutação. Deste modo, o crescimento de mutantes sem UDP-galactose-4-epimerase em galactose pode superar a perda de atividade enzimática através da fosforilação da galactose pela *hexoquinase* ou *galactoquinase* e sua ativação como UDP-galactose (SUTHERLAND, 1990).

Tal como a necessidade por formas ativadas dos componentes monossacarídicos, a síntese de EPS requer precursores de quaisquer outros grupos presentes no biopolímero. Deste modo, o mecanismo biossintético precisa ter disponível formas ativadas de acetato, piruvato, succinato, 3-hidróxibutanato, fosfato, e (em sistemas cianobacterianos) sulfato. Estudos, em outros sistemas de polímeros, claramente indicam que grupos acetil provém de acetil-CoA, e isto foi confirmado para a síntese dos grupos acetil nos resíduos *D*-manosil internos da goma xantana de *Xanthomonas campestris*, bem como para outros EPS bacterianos (IELP, COUSO et al., 1983).

Ainda que nenhum estudo em sistemas livres de células, de bactérias produtoras de EPS, tenha relatado PS com grupos acilas mais exóticos, parece provável que eles também sejam originados dos correspondentes derivativos acil-CoA. Tais componentes acilas são necessários para muitos outros processos dentro da célula microbiana e provavelmente estão sempre presentes. Seus usos para a "decoração" dos EPS podem ser estritamente regulados e dependentes da concentração intracelular. Se as quantidades do derivado acil estiverem baixa, a

prioridade para o PS pode também ser reduzida, reproduzindo ou um polímero não acilado ou um material com o conteúdo acila grandemente diminuído. Isto deveria ser considerado para os resultados obtidos para xantana e outros PS produzidos em certos estágios do ciclo de crescimento bacteriano, ou sob certas condições fisiológicas de limitação nutricional (TAIT, SUTHERLAND et al., 1986; SHU & YANG, 1990).

A exigência de um acceptor lipídico, no qual se juntam as unidades repetitivas dos PS, é comum a tais polímeros encontrados externamente à membrana celular microbiana. A descoberta do envolvimento de lipídeos isoprenóides (bactoprenol) na formação de lipopolissacarídeos e de peptidoglicana, indicou que eles poderiam ter um papel na síntese de EPS. Estudos com uma série de mutantes de *Klebsiella aerogenes* mostrou a adição seqüencial de *D*-glucose-1-fosfato e dois moles de *D*-galactose a partir de UDP-*D*-glucose e UDP-*D*-galactose, respectivamente, para formar oligossacarídeos lipossolúveis (SUTHERLAND & NORVAL, 1969).

O lipídeo funcional na síntese de PS procarióticos é um C<sub>55</sub> isoprenil fosfato (Sin. bactoprenil fosfato, undecaprenil fosfato)

A fosforilação e desfosforilação dos derivados bactoprenil podem proporcionar um meio de controlar sua disponibilidade, mas não está claro se as enzimas necessárias estão presentes em todas as células procarióticas (SUTHERLAND, 1990)

Uma série de estudos em *Xanthomonas campestris* confirmou que a xantana seguia o mesmo modelo como foi encontrado em *Klebsiella* e outras espécies bacterianas. Contudo, o estudo foi extendido para incluir grupos acilas. Através do uso de açúcares isotopicamente marcados, foi confirmado que acetato e piruvato, como os monossacarídeos, são adicionados seqüencialmente ao lipídeo carreador. Assim, *D*-glucose-1-fosfato é adicionado inicialmente de UDP-*D*-glucose. Depois disso, *D*-glucose, *D*-manose e acetato são transferidos. Finalmente, o ácido *D*-glucurônico, *D*-manose e piruvato (como um cetal) são adicionados de UDP-ác-*D*-glucurônico, GDP-*D*-manose e fosfoenolpiruvato respectivamente, formando desta maneira a

unidade repetitiva pentassacarídica acilada (figura 4) (IELP, COUSO et al., 1981a; IELP, COUSO et al., 1981b; IELP, COUSO et al., 1983)

Figura 4 - Esquema para a biossíntese da xantana (segundo IELPI, COUSO *et al.*, 1981a,b, 1983)

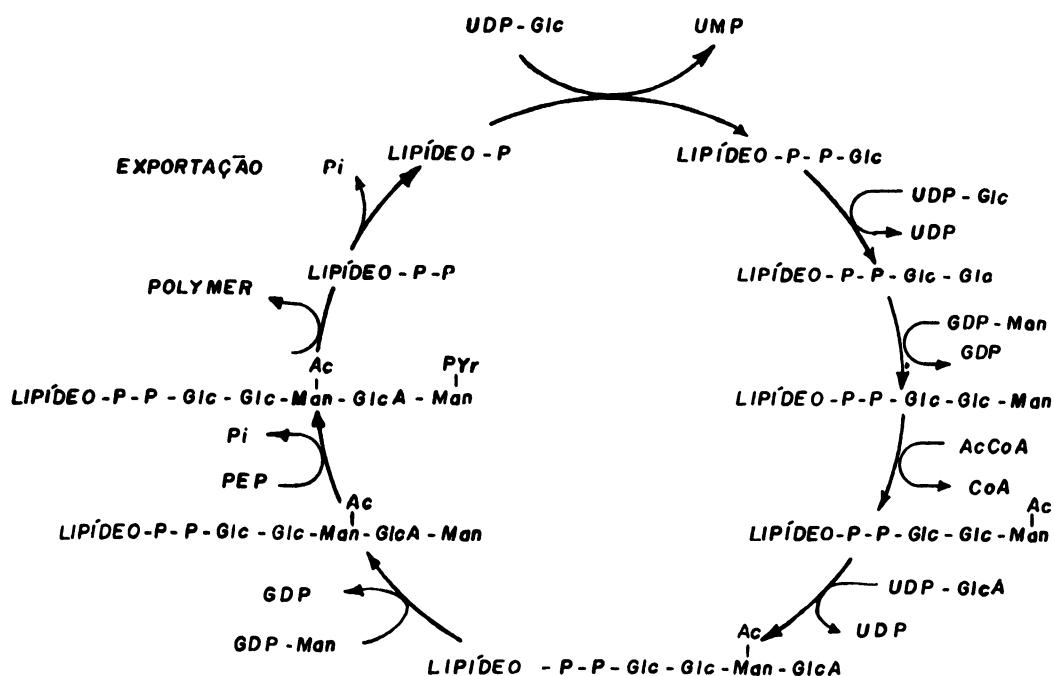


Figura retirada da referência Sutherland, 1990.

Seguindo a montagem da unidade repetitiva sobre o lipídeo isoprenóide, a polimerização ocorre produzindo a xantana acetilada e piruvatada. O pentassacarídeo inicial é essencialmente linear; a ramificação apenas acontece quando as unidades oligossacarídicas repetidas são polimerizadas.

Conclui-se de estudos em outros sistemas sintetizadores de PS que a polimerização ocorre por adição ao final não redutor, enquanto ligado ao lipídeo isoprenóide pirofosfato. O maior fragmento é transferido para o lipídeo carregando uma única unidade repetitiva. Este processo continua até que a macromolécula seja formada.

A polimerase parece ter relativamente baixa especificidade no caso de *X. campestris*. Vários estudos tem sugerido que as moléculas polissacáridicas são imperfeitas: faltando cadeias laterais, ou carregando cadeias laterais incompletas (SUTHERLAND, 1984).

Relativamente pouco se sabe sobre os estágios finais da síntese polissacáridica (vide figura 5).

Figura 5 - Postulado dos estágios finais da síntese de exopolissacárido e excreção.

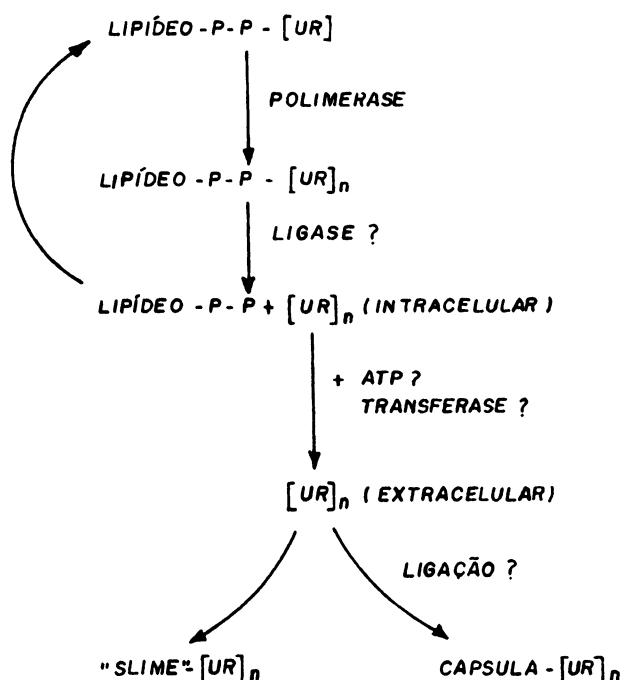


Figura retirada da referência Sutherland 1990.  
RU indica a unidade repetitiva, tal como o pentassacárido no caso da xantana

O local de montagem e polimerização das unidades repetitivas é quase certamente a membrana citoplasmática. Enquanto a cadeia é alongada, o intermediário torna-se aumentadamente hidrofílico, contudo as reações ocorrem numa membrana em bicamada lipoproteica. O EPS deve ser liberado do lipídeo pirofosfato, passado e extrusado através da membrana externa (em bactérias Gram-negativas) e liberado no ambiente extracelular. Alternativamente, o material capsular deve ficar atado a um componente específico na superfície

celular. Provavelmente, energia na forma de força próton motriz e/ou ligações ricas em energia é necessária para permitir a extrusão e a liberação do polímero; todavia, o mecanismo ainda não foi elucidado. Comparando-se a síntese de EPS com a de LPS, leva a indicação de que existe um mecanismo para fornecer energia necessária para translocar o LPS do seu local de síntese, na membrana citoplasmática, para a face externa da membrana externa. Alguns mutantes, defeituosos no transporte, podem acumular EPS no periplasma, e em outros casos (letal) ele encontra-se no citoplasma. É possível que a transferência do EPS do local de síntese, na face citoplasmática, seja acompanhada pela terminalização da cadeia na face periplasmática, e a transferência para a membrana externa deva envolver as zonas de fusão demonstradas por Bayer (BAYER, 1968). Estas pontes transitórias, entre membrana externa e interna, parecem operar na exportação dos polissacarídeos peptidoglicana e LPS de seus locais de síntese, também na membrana citoplasmática, para seus destinos finais na região periplasmática e membrana externa respectivamente (SUTHERLAND, 1990).

Num sistema bacteriano, a habilidade de produzir EPS está aparentemente associada à presença de uma proteína específica na membrana externa. Pensa-se que esta proteína forneça um poro (porin), canal cheio de água, através do qual o PS poderia ser exportado.

No caso de *Acetobacter xylinum*, a microscopia eletrônica revela dezenas de poros pelos quais ocorre a extrusão das microfibrilas nascentes de celulose (ZAAR, 1979).

Poucos estudos detalhados têm procurado quantificar a energia necessária para biossíntese e secreção dos EPS. Em altas taxas específicas de síntese, encontradas quando bactérias crescem em cultivo contínuo, a demanda por energia (na forma de ATP) representa uma significante proporção daquela da célula. Sob tais condições, a síntese dos EPS representa uma grande porção da atividade biossintética da célula microbiana.

Examinando o esquema proposto para a biossíntese da goma xantana (figura 4) pode ser observado um requerimento de 1 mol de ATP para cada hexose (molécula substrato) convertida a hexose fosfato. Uma ligação adicional de alta energia é necessária para a síntese de cada nucleotídeo açúcar, e mais adiante é requerida energia para a fosforilação dos

intermediários isoprenóides lipídicos e para os possíveis substituintes acilas. Supostamente, a polimerização e extrusão do PS também necessita energia. Estimam-se que onze ATPs são necessários para a produção de cada unidade repetitiva (pentassacarídeo) da goma xantana, enquanto que no PS alginato calcula-se três moles de ATP para cada resíduo de ácido manurônico ou ácido gulurônico (SUTHERLAND, 1990).

Enquanto uma série de EPS pode ser degradado após a liberação pela célula microbiana, por enzimas presentes no ambiente extracelular, um grupo de polímeros sofre modificações sem redução na massa molecular. Este tipo de epimerização pós-polimerização é uma característica de vários PS de estrutura irregular, encontrados como sendo componentes celulares em eucariotos. Assim, na biossíntese da heparina, a inversão do C<sub>5</sub> dos resíduos *D*-glucuronosil para resíduos *L*-iduronosil é catalisado por uma uronil-epimerase (PRIKAR, CAMPBELL et al., 1980). Todavia, nos procariotos a epimerização pós-polimerização é restrita a um grupo de PS: os alginatos bacterianos. Nestes, falta uma unidade repetitiva e são polímeros altamente carregados. A proporção carga:massa é maior do que em qualquer outro PS microbiano, uma vez que eles são compostos apenas de ácidos *D*-manurônico e *L*-gulurônico. Os alginatos variam amplamente na proporção de ácido *D*-manurônico para ácido *L*-gulurônico e no seu conteúdo de acetilação. Na falta de evidência ao contrário, parece que os alginatos são sintetizados como homopolímeros, por mecanismos análogos a aqueles encontrados para PS tal como a xantana, *i.e.* pensa-se que os resíduos de ácido *D*-manurônico são juntados e acetilados no lipídeo isoprenóide e finalmente polimerizados e excretados da célula bacteriana como ácido poli-*D*-manurônico. Subsequentemente, eles são epimerizados por uma epimerase extra-celular, que requer íons cálcio para sua atividade, sem a necessidade de cofatores solúveis. A inversão do C<sub>5</sub> do resíduo de ácido *D*-manurônico para ácido *L*-gulurônico em alginatos, e de ácido *D*-glucurônico para ácido *L*-idurônico em PS eucarióticos, ocorre ao nível do polímero. A ação da epimerase é grandemente afetada pela presença de grupos *O*-acetil no ácido poli-*D*-manurônico. Estes grupos exercem um efeito "protetor" nos resíduos monossacarídicos, os quais inibem suas epimerizações. O grau de epimerização de

alginatos bacterianos é portanto dependente de vários fatores diferentes, incluindo o grau de acetilação, concentração de íons  $\text{Ca}^{+2}$ , e a espécie bacteriana envolvida (SUTHERLAND, 1991).

O dextrano é o principal polímero de importância industrial que é sintetizado extracelularmente, produzido comercialmente empregando-se cepas de *Leuconostoc mesenteroides*. Diferente dos EPS, que são formados a partir de precursores intracelulares e que são sintetizados a partir de uma ampla variedade de substratos de crescimento, a síntese do dextrano ocorre apenas quando as bactérias crescem em sacarose como fonte de carbono. A síntese da glucana requer a clivagem da molécula do substrato para liberar frutose, enquanto que o resíduo glucosil é transferido para um acceptor apropriado

A energia necessária para a síntese vem nesta reação, não de um nucleotídeo açúcar como foi observado para outros PS, mas da hidrólise do substrato sacarose. A energia livre obtida da hidrólise de uma molécula de sacarose é de 23  $\text{kJ mol}^{-1}$ , permitindo a reação enzimática ocorrer da esquerda para a direita, visto que a ligação glucosídica no dextrano tem nível de energia livre mais baixo (12-17  $\text{kJ mol}^{-1}$ ). O dextrano produzido tem uma alta massa molecular, e nenhuma evidência foi encontrada para qualquer intermediário de massa molecular baixa. O produto polissacarídico pode ser composto de até 95% de resíduos  $\alpha$ -1,6 ligados, mas ligações  $\alpha$ -1,2-,  $\alpha$ -1,3- e  $\alpha$ -1,4 também podem estar presentes. (SUTHERLAND, 1990).

A síntese da maioria dos EPS microbianos apresenta muitas similaridades com a produção de outros PS bacterianos formados de estruturas com unidades repetitivas, *i.e.* LPS e peptidoglicana. Muitos dos precursores são açúcares nucleotídeos comuns a estes outros polímeros, e os mesmos lipídeos isoprenóides carreadores são usados para a montagem das unidades repetitivas de cada tipo de polímero. A exportação é provavelmente um processo que requer energia mas, por enquanto, é a parte menos entendida da biossíntese polissacarídica (WHITFIELD & VALVANO, 1993; SUTHERLAND, 1990).

## 1.2 CELULOSE BACTERIANA

### 1.2.1 INTRODUÇÃO E DEFINIÇÃO

O polímero natural celulose está intimamente ligado à história do homem. Têxteis de algodão e linho têm sido encontrados nas tumbas dos faraós. Barcos de madeira, velas de algodão para navegação, cordas e papiros foram instrumentos de exploração, batalhas marítimas, trocas e comunicação. O grau de desenvolvimento de civilizações e culturas pode ser medido em termos da capacidade do homem para produzir substratos celulósicos, a fim de escrever e pintar. Na sociedade moderna, a celulose continua cumprindo finalidades as mais diversas.

A celulose forma a parede celular de plantas e algas, e constitui o principal elemento da parede celular de alguns fungos. Também é sintetizada pela bactéria Gram-negativa *Acetobacter xylinum*, sendo este o organismo mais amplamente estudado dentre as poucas bactérias que produzem o polímero.

Celulose, é um polímero de *D*-glucose. As moléculas de glucose são unidas como uma cadeia  $\beta$ -1,4. Quando sintetizada por *A. xylinum* é polimerizada em longas microfibrilas fora da parede celular as quais apresentam a mesma constituição química da celulose produzida por plantas superiores. Esta similaridade tem feito de *A. xylinum* um sistema-modelo ideal para estudar o processo de biogênese do polímero. A via biossintética para produção de celulose bacteriana ainda não está completamente entendida, proporcionando deste modo um campo fértil para a pesquisa. O processo biossintético é de múltiplos passos, envolvendo a produção de celulose e sua cristalização em fibrilas extracelulares.

Uma vez que celulose bacteriana é quimicamente idêntica àquela das plantas superiores e de outros organismos, isto sugere uma provável origem evolucionária entre os produtores de celulose (DELMER, 1983; DELMER, 1987). Através do estudo do processo sintético, empregando-se micróbios que são facilmente mantidos e manipulados em laboratório, torna-se mais fácil descobrir os detalhes genéticos e a bioquímica da biossíntese.

A celulose bacteriana tem algumas vantagens sobre aquela produzida por outros organismos; uma das vantagens da celulose de *Acetobacter* é que ela não precisa ser deslignificada antes do processamento, como é o caso da celulose de madeira processada em papel. *A. xylinum* provavelmente possui o maior potencial para a comercialização, já que outros micróbios produtores do polímero não produzem quantidades suficientes para fins comerciais.

A celulose de *Acetobacter* retém bem água quando úmida e tem forte resistência ao rasgo. Ela pode assumir ou ser produzida sob várias formas retendo-na muito bem. Um exemplo contemporâneo de uma aplicação para celulose bacteriana vem da SONY Corporation, que emprega celulose produzida por *A. xylinum* para fazer delicados diafragmas para fones de ouvido (BYRON, 1990; CANNON & ANDERSON, 1991). Celulose microbiana também está à disposição como um produto alimentício conhecido por "Nata de Cocoa" nas Filipinas (WHITE & BROWN JR, 1989). Weyerhauser and Cetus Corporation desenvolveram recentemente uma cepa de *Acetobacter* que é capaz de produzir celulose em larga escala sob condições fermentativas de agitação (CANNON & ANDERSON, 1991). As fibras produzidas, denominadas de "Cellulon", têm inúmeras aplicações comerciais, tais como agregante para pós de cerâmica e minerais, espessantes para tintas, adesivos, e até mesmo para alimentos. Um outro possível uso para Cellulon é como cobertura para papéis por causa de sua alta pureza. Recentemente, foi relatado o uso de celulose de *Acetobacter* como um substituto temporário da pele, para proteger especialmente tecidos queimados enquanto a pele normal regenera (FONTANA, SOUZA et al., 1990; CANNON & ANDERSON, 1991). Este é o primeiro exemplo de aplicação médica específica da celulose produzida por bactéria. O material

celulósico, identificado pela marca registrada de "BioFill", tem sido empregado com sucesso para o tratamento de queimaduras graves, enxerto de pele, úlceras de pele crônica. Vantagens deste tratamento foram alívio da dor, boa adesão, uma barreira eficaz à infecção, rápida cicatrização, boa retenção de fluidos (água e eletrólitos), baixo custo e tempo de tratamento mais reduzido do que os tratamentos tradicionais; a pele sadia cresce deslocando o substituto celulósico da pele. O produto biotecnológico, designado "BioFill" e "Bioprocess" detêm patente em duas dezenas de países e é propriedade intelectual da empresa Biofill Produtos Biotecnológicos S.A. (Curitiba-Paraná, Brasil)

Uma das dificuldades para o uso humano de celulose bacteriana tem sido a necessidade de remover componentes endotóxicos que podem contaminar o produto; uma tecnologia que foi desenvolvida e aperfeiçoada no LQBB - Laboratório de Químico/Biotecnologia de Biomassa da UFPr, de responsabilidade do Professor José Domingos Fontana.

O conhecimento do processo da síntese celulósica em *A. xylinum* cresceu grandemente na última década. Esta pesquisa básica está formando o alicerce para futuras tentativas na comercialização potencial de celulose bacteriana, tentativas que estão em seus estágios formadores.

### 1.2.2 BACTÉRIAS PRODUTORAS DE CELULOSE

Muitas bactérias Gram-negativas secretam material extracelular polissacarídico, mas apenas umas poucas têm sido apresentadas como produtoras de celulose. *A. xylinum*, o mais estudado dos produtores de celulose bacteriana, é classificado no "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" como um membro da família Acetobacteriaceae, Gram-negativo, aeróbico, com forma de bastonete, comumente produzindo colônias pálidas em meio sólido (LEY, SWINGS et al., 1984). Espécies dentro do gênero *Acetobacter* incluem *A. aceti*, *A.*

*liquifaciens*, *A. pasteurianus*, e *A. hansenii*.. Há autores porém, que consideram que o real produtor de celulose seja *A. hansenii*. (LEY, SWINGS et al., 1984). A produção de celulose por este gênero foi observada em 1886 por Brown, no estudo de um "fermento" de ácido acético (BROWN, 1886). *A. xylinum* é tratado na literatura científica como uma espécie, mas para fins de classificação exata, ele tem sido considerado uma sub-espécie de *A. aceti*.

Uma característica notável de cepas de *Acetobacter* produtores de celulose é a formação de uma película celulósica flutuante, quando o organismo é cultivado estaticamente em meio líquido. Esta película é formada a partir da organização de fibrilas celulósicas sintetizadas e secretadas pelas bactérias. Elas são comumente encontrados sobre frutas e vegetais em decomposição, vinagre, bebidas fermentadas, caldo de cana, sólos de jardins etc.

Outras bactérias que produzem celulose em menor quantidade que *A. xylinum* incluem *Sarcina ventriculi*, que é a única produtora de celulose Gram-positiva (CANNALE-PAROLA & WOLFE, 1964).

Quando se isolavam cepas a partir de lôdo de esgoto ativado, foi descoberta uma série de espécies bacterianas como sendo produtoras de fibrilas celulósicas (DEINEMA & ZEVENHUIZEN, 1971). Acredita-se que as fibrilas celulósicas explicam a formação de flocos nestes ambientes. Os gêneros específicos isolados incluiam *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Aerobacter*, *Rhizobium*, *Agrobacterium* e *Azotobacter*. A formação de fibrilas celulósicas aparentemente desempenha uma parte importante na infecção de plantas por *Agrobacterium tumefaciens* ajudando na ligação das bactérias ao tecido da planta, conduzindo eventualmente à formação de "gall" (MATTHYSSE, 1983).

### 1.2.3 SÍNTSE E CARACTERÍSTICAS DA CELULOSE BACTERIANA

Em suspensões de células em repouso, aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  resíduos de glucose podem ser polimerizados. O grau de polimerização médio (DPw) tem sido medido

empregando viscosimetria e varia de 2190 a 3470. Diferente das plantas, onde o DPw da celulose de parede celular é constante durante sua síntese, o DPw da celulose de *Acetobacter* aumenta linearmente e é dependente do tempo de geração do organismo (BYRON, 1991).

Como mencionado, em culturas estáticas *Acetobacter* produz uma película de celulose na interface líquido-ar. Acredita-se que isto sirva para trazer as células ao ambiente que tem tensão de oxigênio mais alta. Estimações de ATP mostraram que as células viáveis estão localizadas na superfície película-ar. Alternativamente, foi sugerido que a celulose protege da luz ultravioleta, aumentando a capacidade do organismo para competir na colonização de um substrato natural, e conserva a água no ou em associação com o substrato (WILLIAMS & CANNON, 1989).

Repetidas subculturas em condições agitadas rapidamente resultam no isolamento de mutantes espontâneos celulose-negativa ( $cel^-$ ) (SCHRAMM & HESTRIN, 1954). Tem sido sugerido que a síntese de celulose é sensível à forças de cisalhamento e que isto, junto com a alta taxa de mutação espontânea para  $cel^-$ , seja responsável pelo fenômeno; talvez a combinação dos dois fatores. Quaisquer células da população que sejam espontaneamente  $cel^-$  devem ter uma vantagem de crescimento sobre os organismos celulose positiva ( $cel^+$ ) em culturas agitadas, desde que os primeiros não necessitam desviar grandes quantidades de carbono e energia para a síntese de celulose. Em subculturas, muitas células  $cel^-$ , mas apenas poucas  $cel^+$ , serão transferidas, porque as últimas estarão agregadas em flocos de fibras celulósicas. A diferença na cinética das duas cepas assegurará que a tendência, no sentido do fenótipo  $cel^-$ , aumente a cada subcultura (BYRON, 1991). Em experimentos controlados, onde os efeitos de agregação das células  $cel^+$  foram eliminados, obteve-se prova de que a taxa de mutação espontânea de *A. xylinum* não foi excessivamente alta (menos que  $10^{-5}$  mutações por célula por geração) sugerindo que altas taxas previamente relatadas podem ter sido devido a efeitos similares àqueles descritos anteriormente (VALLA & KJOSBAKKEN, 1982). A instabilidade da produção de celulose em condições agitadas foi e é um dos principais problemas a ser resolvido na produção de celulose para comercialização.

A celulose bacteriana é produzida tanto em superfície como em cultura agitada como uma fita de celulose I altamente cristalina. A largura da fita é da ordem de ordem de 40 a 100 nm e de comprimento indeterminado. É muito difícil medir ou estimar o comprimento de fitas individuais porque elas são produzidas como uma massa de fibras emaranhadas na cultura. As fitas são individualmente compostas de feixes de microfibrilas que se associam por pontes de hidrogênio (GARDNER & BLACKWELL, 1974). Cada microfibrila tem um diâmetro de 3 a 4 nm que é por sua vez composta de três fibrilas subelementares, cada uma com aproximadamente 1,78 nm, torcida numa hélice da esquerda para a direita (vide figura 6).

Figura 6 - Formação da fita de celulose

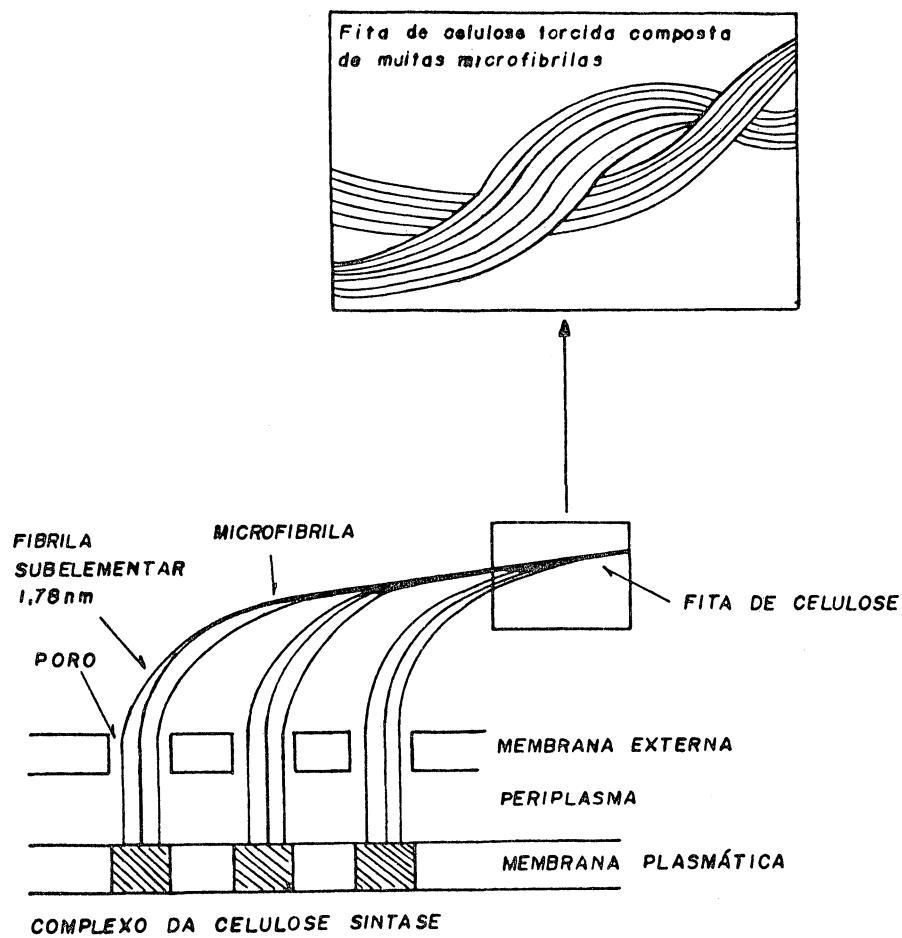


Figura retirada da referência Byron, 1991.

As fibrilas subelementares são extrudadas de uma fileira de poros na parede celular bacteriana, paralelo ao eixo longitudinal da célula (BROWN JR, WILLISON et al., 1976; ZAAR, 1979). Os poros ocupam apenas aproximadamente 0,5% da membrana externa (vide figura 7).

Figura 7 - Modelo generalizado da reunião da fita de celulose em *Acetobacter xylinum*

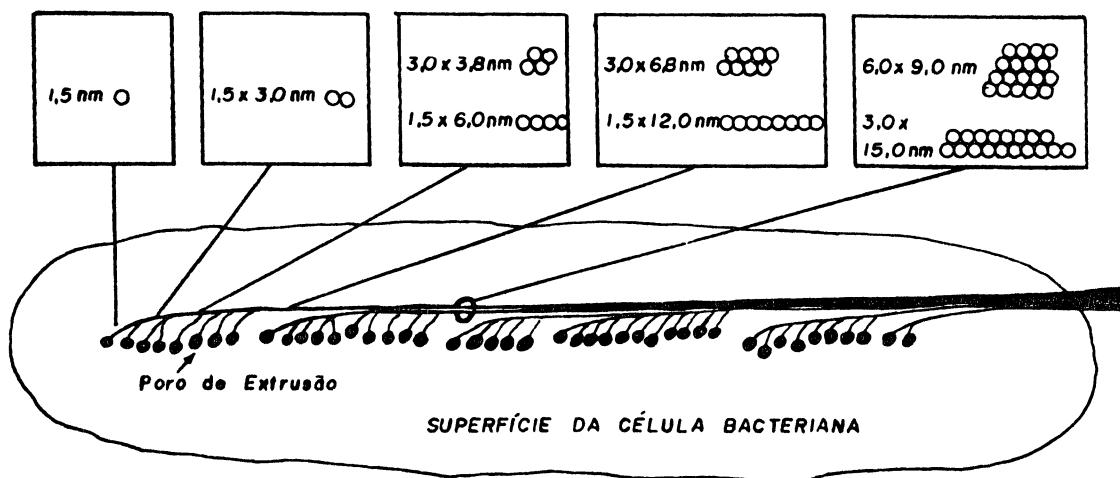


Figura retirada da referência Ross, Mayer et al. 1991.

A formação de celulose está associada com fileiras de partículas (assume-se que sejam complexos multienzimáticos) abaixo dos póros. É desconhecido o mecanismo pelo qual as cadeias de glucanas da microfibrila são unidas em fita, mas o processo de polimerização e cristalização estão associados, sendo que o último limita a velocidade de polimerização (HAIGLER & BENZIMAN, 1982). É possível alterar a morfologia da fita normal em dois níveis através da inclusão de produtos químicos específicos no meio de crescimento (e.g. Calcofluor White ST, Carboximetilcelulose) (BYRON, 1991)

#### 1.2.4 BIOQUÍMICA DA SÍNTESE DE CELULOSE

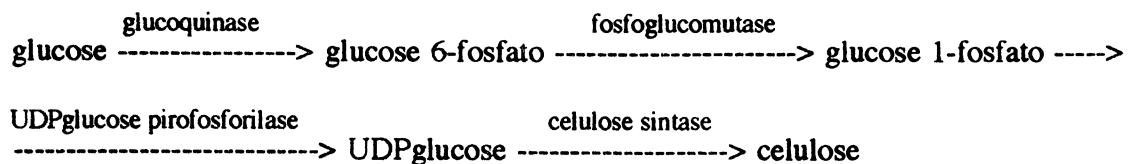
Ainda que a celulose seja um polímero relativamente simples, ainda não entendemos completamente a bioquímica de sua síntese. Dificuldades tanto no desenvolvimento de um ensaio para a síntese *in vitro* quanto a purificação das enzimas envolvidas no processo (*e.g.* celulose sintase) têm impedido certas análises bioquímicas. Estes problemas estão sendo superados através do uso combinado de técnicas genéticas e bioquímicas com o organismo *A. xylinum*, e um quadro mais claro dos passos bioquímicos da síntese de celulose está emergindo.

O *Acetobacter* pode sintetizar celulose a partir de uma variedade de fontes de carbono incluindo hexoses (glucose, frutose) e seus ácidos correspondentes, por exemplo gluconato, compostos tais como piruvato, glicerol e di-hidróxi-acetona, e intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico como succinato. Pouca celulose é sintetizada a partir de pentoses (SCHRAMM, GROMET et al., 1957; BENZIMAN & BURGER-RACHAMINOV, 1962; WEINHOUSE & BENZIMAN, 1974; ALONI & BENZIMAN, 1982)

Muitos destes substratos estão metabolicamente associados com os ciclos da pentose ou do ácido cítrico, indicando que a síntese de celulose pode estar ligada ao metabolismo oxidativo de carboidratos (HESTRIN & SCHRAMM, 1954; GROMET, SCHRAMM et al., 1957; BENZIMAN & MAZOVER, 1973; SWISSA & BENZIMAN, 1976). A produção ocorrerá na ausência de um suprimento exógeno de nitrogênio e na presença de inibidores da síntese de proteínas, indicando que a síntese proteica *de novo* não é necessária para o processo (WEBB & COLVIN, 1967).

O conhecimento referente à via bioquímica proposta que conduz à formação de celulose a partir de glucose vêm de duas fontes: (1) estudos das enzimas envolvidas no metabolismo do carboidrato glucose, e (2) estudos de marcação com glucose isotópica, empregados para delinear relações precursor-produto. Um grupo de enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos foram encontradas em extratos brutos e parcialmente purificados

de *A. xylinum* (ALONI, DELMER et al., 1982; GROMET, SCHRAMM et al., 1957; BENZIMAN & RIVETZ, 1972; SWISSA & BENZIMAN, 1976). Dentro deste grupo de enzimas, foi proposto que glucoquinase, fosfoglucomutase, e UDPglucose pirofosforilase são as mais prováveis de estarem na via que leva à síntese de celulose (*vide* esquema abaixo)



A fosforilação de hexoses fornece um intermediário comum tanto para síntese de celulose como para a oxidação via pentose e ciclo do ácido cítrico. A fosforilação de açúcar exógeno é realizada pela glucoquinase ou frutoquinase em *A. xylinum* (BENZIMAN & RIVETZ, 1972). A atividade glucoquinase está sempre presente nas células independente de qual açúcar exógeno esteja sendo fornecido, enquanto que a atividade frutoquinase, como a de outros sistemas de enzimas metabolizadoras de açúcar, parece estar sujeita à repressão por glucose. O fluxo de açúcares fosforilados através das duas vias irão com toda probabilidade determinar o nível de celulose produzida. Na via da celulose, a glucose é fosforilada na forma de glucose 6-fosfato (G6P) é enzimaticamente convertida a glucose 1-fosfato (G1P) pela fosfoglucomutase (GROMET, SCHRAMM et al., 1957). UDPglucose pirofosforilase é então responsável pela síntese de UDPglucose às custas de G1P e ATP (SWISSA, ALONI, et al. 1980). Ainda que todos os quatro açúcares nucleotídeos possam atuar como precursores para a síntese de celulose, não existe nenhuma prova para qualquer outra nucleotídeo difosfoglucose pirofosforilase em *A. xylinum* (ALONI & BENZIMAN, 1982). Esta observação está de acordo com a atuação da UDPglucose como precursor primário para a síntese de celulose. Esta via proposta foi confirmada através do emprego de estudos de marcação isotópica nos quais foi examinado o fluxo de carbono a partir de  $^{14}\text{C}$ -glucose para celulose (SWISSA, ALONI et al., 1980).

UDPGlucose é o substrato para a celulose sintase (E.C.2.4.1.12, UDPglucose: 1,4- $\beta$ -D-glucana-4- $\beta$ -glucosiltransferase); acredita-se que seja a principal enzima envolvida no(s) último(s) passo(s) da biossíntese de celulose.

HESTRIN & SCHRAMM (1954) e GLASER (1958) foram os primeiros a relatar a síntese de um polímero insolúvel em álcali a partir de UDPglucose por uma fração particulada de *A. xylinum*. Infelizmente, a taxa de síntese foi menor que 0,1% da taxa *in vivo* e por isso não forneceu um sistema adequado para estudar nem a estrutura da celulose produzida, nem o mecanismo de síntese. ALONI, DELMER et al. (1982) e ALONI, COHEN et al. (1983), após a estabilização da fração particulada/membranácea com PEG 4000 ou íons cálcio e com a ativação do sistema com GTP, conseguiram um aumento de 400 vezes na taxa de síntese *in vitro*. Também foi mostrado que, para obtenção da atividade máxima era necessário adicionar de volta uma proteína regulatória presente na fração solúvel.

Recentemente, LIN & BROWN JR (1989) conseguiram purificar parcialmente a celulose sintase (mais do que 90% de homogeneidade) a partir de membranas solubilizadas com detergente. Suas preparações continham dois polipeptídeos principais de 83 e 93kD. Foi demonstrado que o polipeptídeo de 83kD tratava-se de uma glicoproteína, e os resultados de cromatografia em coluna estavam de acordo com a celulose sintase sendo uma enzima multimérica. Mais recentemente, LIN, BROWN JR et al. (1990), demonstraram que a subunidade de 83kD é a unidade catalítica para a celulose sintase.

*In vitro* a atividade da celulose sintase é aumentada pela adição de nucleotídeo ou análogos de guanosina. O trabalho de ROSS, WEINHOUSE et al. (1987) demonstrou além disso, que o ativador específico da celulose sintase é o ácido diguanílico bis-(3'- 5')-cíclico (di-GMPc ou cGpGp) (**vide** figura 8).

Figura 8 - Estrutura do di-GMPc (segundo ROSS, WEINHOUSE et al., 1987)

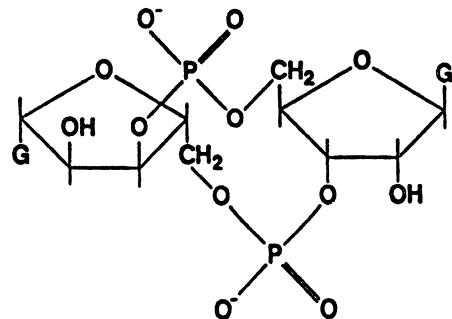


Figura retirada da referência Ross, Mayer et al., 1991.

Eles sugeriram que a atividade da celulose sintase é controlada por um sistema regulatório multicomponente (vide figura 9) que inclui (1) diguanilato ciclase, a enzima envolvida na síntese do ativador diguanílico cíclico, e (2) as atividades das enzimas fosfodiesterases, que estão envolvidas na degradação do ativador.

Figura 9 - Modelo proposto para a regulação da síntese de celulose pelo ativador da síntese de celulose, o ácido diguanílico cíclico (segundo ROSS, WEINHOUSE et al., 1987)

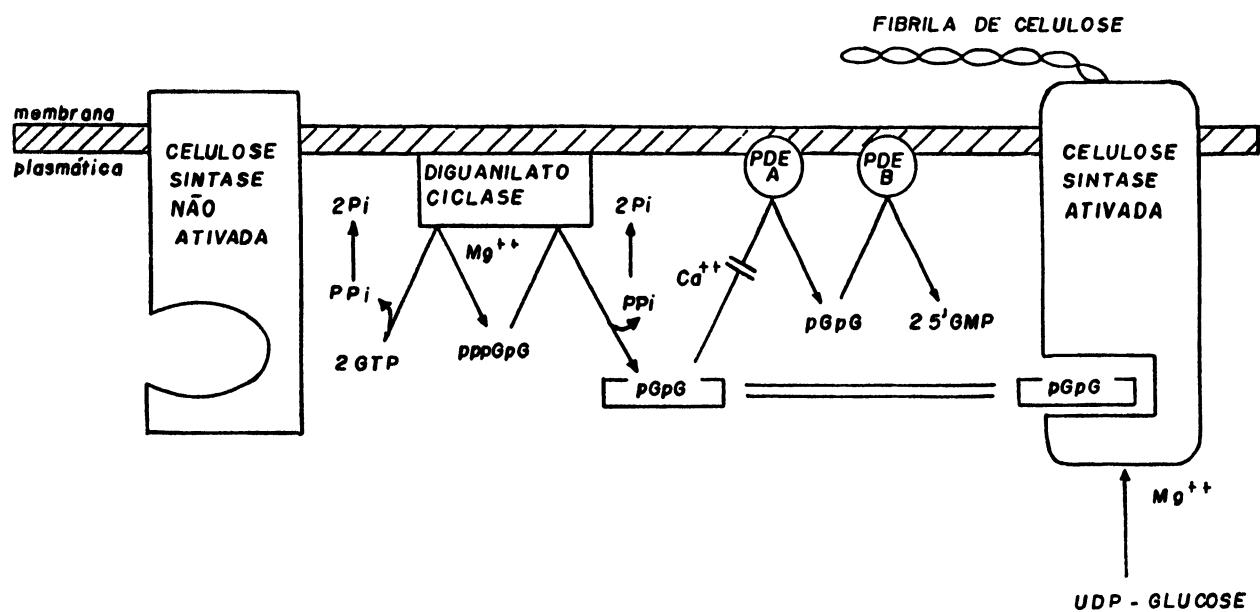


Figura retirada da referência Cannon & Anderson 1991

A primeira fosfodiesterase (PDE-A) que é inibida por  $\text{Ca}^{2+}$  e hidrolisa a abertura do nucleotídeo cíclico; a segunda (PDE-B) que não é afetada por  $\text{Ca}^{2+}$ , converte o dinucleotídeo linear em 5'GMP. De acordo com este modelo, a velocidade de polimerização de UDPglucose em celulose é dependente dos níveis intracelulares do ativador diguanílico cíclico e do nível de  $\text{Ca}^{2+}$ .

FONTANA, FRANCO et al (1991) propuseram que uma ação inibitória da cafeína sobre a(s) fosfodiesterase(s) poderia estar envolvida no aumento da produção de celulose em meios de cultura que continham a metil-xantina, já que o emprego de infusões de chá (*Camellia*; rica em cafeína e teofilina) é comum no cultivo de *Acetobacter xylinum*.

AMIKAM & BENZIMAN (1989), mostraram recentemente o possível envolvimento do mesmo ativador na modificação/regulação da síntese de celulose em *Agrobacterium tumefaciens*. Esta observação sugere que os dois organismos podem utilizar um mecanismo regulatório semelhante, ainda que o produto final e as velocidades de síntese do material celulósico sejam marcadamente diferentes (feixes ou flocos simples em *Agrobacterium* vs. complexas fitas em *Acetobacter*).

## 1.2.5 GENÉTICA DA SÍNTESE DE CELULOSE

Estudos dos genes e seus produtos envolvidos na síntese de celulose têm sido realizados tanto em *Acetobacter xylinum* como em *Agrobacterium tumefaciens*. O desenvolvimento destes sistemas modelo fornecerão não apenas um entendimento da genética da síntese de celulose em sistemas bacterianos, mas também uma revelação deste processo em plantas superiores.

A análise genética da biossíntese de celulose em *A. xylinum* inclui o isolamento de mutantes que abalam a produção de celulose, caracterização de espécies de plasmídeos selvagens, e a clonagem de gens envolvidos neste processo. Um número de pesquisadores,

iniciando com SCHRAMM & HESTRIN (1954), descreveram o isolamento de mutantes celulose negativa ( $cel^-$ ). Muitos relatos indicam que mutantes  $cel^-$ , aparentemente espontâneos, aumentam numa alta proporção quando células selvagens são cultivadas em meio líquido agitado (SCHRAMM & HESTRIN, 1954; VALLA & KJOSBAKKEN, 1982; CANNON & ANDERSON, 1991). A freqüência na qual estes mutantes ocorrem também aumenta com a idade da cultura. Os mutantes espontâneos têm uma aparência mucóide em meio sólido, como verdadeiros mutantes  $cel^-$  obtidos com mutagênicos, mas a maioria reverte novamente para o tipo selvagem quando crescidos estaticamente em cultura líquida. A explicação mais provável para tal comportamento é que estes não são mutantes genéticos verdadeiros, mas em vez disso, significam alterações de expressão fenotípica das seqüências genéticas envolvidas na síntese de celulose. Estes mutantes fenotípicos podem existir devido à mudanças na expressão gênica, *e.g.* a repressão dos gens da síntese de celulose durante o crescimento sob condições aeradas, alterações nos componentes da membrana/parede celular induzidas pelas condições de cultivo, ou outros eventos não gênicos (CANNON & ANDERSON, 1991).

Provas genéticas têm sido empregadas para confirmar a via biossintética, como postulada de dados bioquímicos. Foram feitas tentativas de isolamento de mutantes em gens estruturais para a celulose sintase a partir de *A. xylinum* ATCC 10245 (VALLA & KJOSBAKKEN, 1982), mas em vez disso obtiveram-se mutantes exercendo efeitos pleitrópicos na síntese de celulose. Num trabalho posterior, mutantes  $cel^-$  de *A. xylinum* ATCC 23768 foram complementados por um fragmento de DNA (2,8 kb) clonado a partir de um organismo selvagem. Análise bioquímica mostrou que os mutantes eram deficientes na enzima UDPglucose pirofosforilase. A confirmação da atividade codificada pelo fragmento de 2,8 kb foi obtida por complementação de um mutante de *Escherichia coli* na qual faltava a enzima. Este foi o primeiro exemplo da clonagem de um gen com uma função conhecida na síntese de celulose. O gen foi denominado *cel A* (VALLA, COUCHERON et al., 1989).

A análise genética de *Acetobacter* fornece um número de observações interessantes incluindo (1) a existência de uma complexa amostra de plasmídeos (VALLA, COUCHERON

et al., 1983; VALLA, COUCHERON et al., 1986; VALLA, COUCHERON et al., 1987; CANNON & ANDERSON, 1991); (2) a utilidade de produtos químicos e mutagênese por transposons para induzir mutantes cel<sup>-</sup> (FORNG, ANDERSON et al., 1989; VALLA & KJOSBAKKEN, 1982; WILLIAMS & CANNON, 1989); (3) aparente instabilidade genética neste organismo, e.g. a alta taxa de indução e reversão de mutantes espontâneos, rearranjos cromosomal e plasmidial (VALLA, COUCHERON et al., 1987); e (4) o uso da tecnologia de DNA recombinante para isolar gens envolvidos na síntese de celulose (WONG, FEAR et al., 1990; STANDAL, IVERSEN et al., 1994). A aptidão para clonar os gens envolvidos na biossíntese de celulose não apenas fornecerá um melhor entendimento deste processo mas também conduzirá à comercialização potencial da celulose produzida em escala industrial (CANNON & ANDERSON, 1991).

### 1.2.6 ASPECTOS ECOLÓGICOS DAS BACTÉRIAS PRODUTORAS DE CELULOSE

Por causa da observação de que *A. xylinum* era capaz de produzir uma película flutuante durante cultivo estático, os investigadores propuseram que o papel da película era manter os organismos no ambiente aeróbico, favorecendo a obtenção de oxigênio, uma vez que foi considerado um organismo aeróbico estrito (SCHRAMM & HESTRIN, 1954; COOK & COLVIN, 1980). Porém, surge a pergunta: haveria outros papéis ecológicos para a celulose secretada por *A. xylinum* e/ou outras bactérias?

Películas celulósicas úmidas retêm bem água; portanto, um papel hipotético para a celulose seria a retenção de umidade no microambiente, permitindo o crescimento bacteriano e prevenindo a dessecação.

Experimentos cultivando *A. xylinum* com 5% de dióxido de carbono, em "candle jars" e "Biobags", mostraram que o microrganismo pode crescer microaerofilicamente enquanto

continua sintetizando celulose; portanto, o argumento de que a película seja vital para o crescimento aeróbico perde em consistência. Testes laboratoriais também indicaram que as películas poderiam proteger as bactérias de efeitos mortais da luz ultra violeta ambiental (WILLIAMS & CANNON, 1989). Este efeito protetor seria considerado de grande importância ao organismo quando ele cresce sobre frutas em decomposição, no momento em que ele estaria retendo água para a degradação bioquímica de substratos para sua nutrição.

Uma vez que *A. xylinum* é encontrado primariamente sobre frutas em decomposição, seria possível que a síntese da película celulósica desempenhasse um papel no sucesso da colonização de um particular "habitat"? Para responder esta questão, foram realizados uma série de experimentos para determinar a densidade de vários organismos crescendo sobre maçãs. Pedaços de maçã foram inoculados com várias cepas de *A. xylinum* produtores e não produtores de celulose. Os não produtores de celulose e controles não inoculados tenderam a se tornar secos durante o curso do experimento. Fungos e outras bactérias tenderam a predominar nos pedaços de maçã que tinham sido inoculados com as cepas não produtoras de celulose. Quando as películas celulósicas de uma cepa selvagem e outra super produtora cobriram completamente os pedaços de maçã, *A. xylinum* predominava sobre os outros micróbios crescidos na fruta. Estes resultados indicam que a capacidade para sintetizar uma película de celulose deve permitir que *A. xylinum* colonize fontes de alimentos mais eficientemente do que cepas de *A. xylinum* que não fazem celulose. Esta aptidão de colonização pode ser importante no microambiente, quando *A. xylinum* busca nutrientes em competição com outros organismos decompositores tal como outras bactérias e fungos (WILLIAMS & CANNON, 1989).

Fibrilas celulósicas também estão envolvidas no processo de infecção de tecidos vegetais por *Agrobacterium tumefaciens*, que é um outro exemplo da necessidade de um microrganismo utilizar-se de um exopolímero para se segurar a um particular substrato (MATTHYSSE, 1983). A ausência de fibrilas celulósicas aparentemente reduz a capacidade das bactérias ancorarem na superfície da plantas e eventualmente infectarem seus tecidos.

A formação de fibrilas celulósicas pode aumentar a floculação de lôdo ativado, permitindo o crescimento agregado de uma variedade de bactérias Gram-negativas. A capacidade de formar flocos poderia aumentar o crescimento bacteriano, dando às células uma superfície sobre a qual elas poderiam agarrar-se enquanto estão participando do processo de decomposição de lôdo de esgoto (DEINEMA & ZEVENHUIZEN, 1971).

Para serem bem sucedidos no ambiente, muitos microorganismos desenvolveram mecanismos eficientes para colonizar superfícies, seja no fundo de um navio, na superfície dos dentes, ou em plantas em decomposição. O processo de colonização, tipicamente envolve a produção de EPS que ajudam na ligação, atuando na prevenção de desidratação, mudanças de pH e efeitos de moléculas tóxicas ao colonizador. Celulose é um EPS altamente organizado, que pode desempenhar um papel semelhante a exopolímeros secretados por outras bactérias.

### 1.2.7 PERSPECTIVAS BIOTECNOLÓGICAS

Celulose bacteriana interessa comercialmente por muitas das mesmas razões pelas quais os campos de algodão e florestas atraem a atenção dos industriais: a celulose é um material leve, mas extremamente resistente, que pode ser cortado e modelado na forma requisitada. Novos materiais com propriedades desejadas podem ser obtidos por tratamento químico da celulose natural. Além do papel e têxteis, muitos produtos comuns de celulose vegetal incluem aqueles baseados nas reações de derivatização (e.g. nitrocelulose, celulóide, e "rayon") (ROSS, MAYER et al., 1991).

Celulose de origem bacteriana é diferenciada por seu alto grau de cristalinidade, sua força mecânica e capacidade absorptiva, e sobretudo, por sua pureza química com respeito a açúcares contaminantes e polímeros fenólicos (FIEDLER, FUSSEL et al., 1989; HESTRIN & SCHRAMM, 1954; WHITE & BROWN JR, 1989; YAMANAKA, WATANABE et al., 1989; ROSS, MAYER et al., 1991). De um certo modo, esta pureza evita o extensivo processamento,

tal como mercerização e polpeamento, necessários na obtenção convencional de produtos de papel a partir de madeira. Na presente época, todavia, não se espera que a celulose obtida de bactéria venha substituir a celulose de plantas em aplicações tradicionais, nas quais a agricultura e silvicultura têm provado ser fontes adequadas. Contudo, o entendimento profundo da biogênese de celulose a nível molecular, combinado com o advento de novas tecnologias de fermentação, estão ampliando rapidamente as chances da entrada da celulose bacteriana no mercado.

Embora *A. xylinum* seja principalmente conhecido por sua capacidade de produzir celulose em cultura estática, tais métodos de crescimento/produção são extremamente ineficientes em termos econômicos. Idealmente, cepas industriais deveriam ser altamente eficientes na utilização de suas fontes nutricionais para crescimento, manutenção, e produção do polímero; deveriam utilizar fontes de carbono e vitaminas baratas e prontamente disponíveis; e deveriam ser geneticamente estáveis sob estresse ambiental imposto pelo crescimento em fermentador. Alguns dos maiores obstáculos encontrados na adaptação industrial de *A. xylinum* foram o acúmulo desperdiçado e nocivo de co-produtos metabólicos, e a tendência de cepas tipo selvagens em reverterem para mutantes não produtores de celulose, sob condições de enriquecimento de oxigênio dos fermentadores agitados.

O isolamento de uma cepa geneticamente estável, com uma capacidade substancialmente reduzida de formar ácido glucônico, foi conseguida por técnicas de mutagênese e seleção; esta cepa é relatada como sendo capaz de permitir uma cultura rápida e resistente em glucose, a partir da qual o principal produto é celulose fibrilar. Por exemplo, empregando-se uma das cepas de *A. xylinum* sob condições de cultivo agitado, foi alcançado uma produção de celulose reticulada, altamente cristalina numa taxa de 0,26 g/l/h, além de 70 horas. (ROSS, MAYER et al., 1991). Valores mais baixos, mas igualmente impressionantes, foram relatados por outras firmas que usam fermentadores de desenhos ligeiramente diferentes, como provavelmente, cepas também diferentes (ROSS, MAYER et al., 1991).

A escolha do desenho do fermentador é particularmente crítico, porque ele deve conciliar requerimentos opostos; por um lado agitação mecânica vigorosa da cultura de *A. xylinum* crescendo rapidamente e, por outro lado, a sensibilidade das fibrilas de celulose e matriz fibrilar ao rompimento mecânico, especialmente quando a força é imposta *in situ*, i.e., como durante o presente período de montagem da fibrila. Portanto, com culturas agitadas pode resultar uma celulose de estrutura reticulada, tridimensional, altamente ramificada, que é adequada para a produção de papel de alta qualidade; enquanto que em cultura estática, tende a ser produzida uma película celulósica normal com uma estrutura lamelar com menos ramificações, que permita a utilização como "wound dressing" (FONTANA, SOUZA et al., 1990; FONTANA, FRANCO et al., 1991; ROSS, MAYER et al., 1991). De fato, foi sugerido que o caminho para modificações desejáveis na natureza fibrilar e/ou macroscópica do produto celulósico pode ser conseguida através da variação dos desenhos dos fermentadores tal como forma dos tanques e hélices de agitação (WHITE & BROWN Jr, 1989).

Uma linha de melhoramento muito promissora, no sentido da obtenção de cepas industrialmente valiosas, é a manipulação genética direta dos gens que codificam para os catalisadores da síntese de celulose, suas enzimas regulatórias complementares, e as relevantes estruturas de membrana associadas, tal como os postulados póros de extrusão (Zaar, 1979). Oito diferentes proteínas já foram estabelecidas como sendo diretamente participantes na via biossintética e sua regulação; elas são UDPglucose pirofosforilase, a celulose sintase, diguanilato ciclase, PDE-A, PDE-B, e recentemente a descoberta dos produtos dos gens *bcsA*, *bcsC*, e *bcsD* (WONG, FEAR et al., 1990). Cada uma destas proteínas é um candidato alvo para se conseguir uma expressão aumentada ou reduzida através da engenharia genética. O controle da via catabólica (*e.g.*, inibição de fosfodiesterase(s) do (GMPc)2 é igualmente importante (FONTANA, FRANCO et al., 1991)

Com base nos níveis de atividade *in vitro*, medidos sob condições ótimas, o passo catalisado pela celulose sintase parece ser o limitante. Porém, em *A. xylinum*, os níveis de enzimas menos específicas ao processo, tal como UDPglucose pirofosforilase, também podem

ser demonstradamente limitantes em certas cepas. Evidentemente, se algum fator for limitante da velocidade também é uma função do referido grupo de condições fisiológicas; por exemplo, num meio pobre a permeabilidade da glucose pode ser o passo mais lento; enquanto que, quando glicerol é empregado como o substrato, a velocidade da gluconeogênese pode ser o ponto de estrangulamento. É provável que a capacidade máxima, de bactérias tal como *A. xylinum*, para produzir celulose não tenha alcançado expressão completa, embora relatos neste processo, bem como na produção de outros exopolissacarídeos bacterianos, indicam que o potencial das células bacterianas para produzirem tais polímeros é tanto maior e mais obtinível do que se esperava (HARDING, CLEARY et al., 1987; SANDFORD & BAIRD, 1983).

Até agora, os produtos desenvolvidos a partir de celulose bacteriana incluem "wound dressings" (FONTANA, SOUZA et al., 1990), aditivos de alta qualidade para papel (ROSS, MAYER et al., 1991), goma de mascar (ROSS, MAYER et al., 1991), estabilizantes para alimentos (ROSS, MAYER et al. 1991), e diafragmas acústicos para instrumentos de áudio (BYRON, 1990; CANNON & ANDERSON, 1991). Eventualmente, a ampla disponibilidade de celulose bacteriana levará a novas aplicações e invenções, baseado neste polímero e em outros exopolissacarídeos.

## 1.3 ALGUNS NOVOS POLISSACARÍDEOS MICROBIANOS E SUAS PROPOSTAS DE APLICAÇÕES COMERCIAIS

### 1.3.1 INTRODUÇÃO

Os polissacarídeos derivados de plantas superiores e algas, tais como amido, guar, goma arábica, goma de alfarrobo, alginato, vêm sendo usados por muitas décadas em grandes quantidades. Os esforços para desenvolver polissacarídeos de origem microbiana resultaram na descoberta do dextrano, que no início da década de 40 foi desenvolvido para uso comercial. Portanto, o dextrano foi o primeiro polissacarídeo comercializado, produzido por fermentação; a goma xantana, o segundo (KANG, VEEDER et al., 1983)

Na procura incessante por novos produtos hidrossolúveis, os laboratórios da Kelco (Divisão da Merck & Co) têm dirigido particular atenção à produção de polissacarídeos exocelulares de microrganismos, visando aplicações industriais. Apesar do intenso empenho, nas décadas de 70 e 80, na investigação de microrganismos com este potencial, apenas se conhece uma pequena fração destes que sejam produtores de exopolissacarídeos. Além disso, para aqueles polissacarídeos, mesmo depois deles se qualificarem economicamente para produção, há uma outra série de propriedades que devem ser adequadas às aplicações industriais e algumas delas estão listadas na tabela 2. Além do mais, o organismo empregado para produzir um produto deve ser avirulento e o material resultante atóxico (KANG, VEEDER et al., 1983).

Tabela 2 - Propriedades Úteis de Polissacarídeos

Viscosidade, elasticidade e plasticidade
Capacidade para suspensão
Características reológicas
Compatibilidade com sais e surfactantes
Formação de filmes
Estabilidade (térmica, ácida e alcalina)

Os polissacarídeos, em geral, são usados comercialmente para engrossar, suspender, ou estabilizar sistemas aquosos. Eles também são usados para produzirem géis e atuarem como floculantes, agregantes, formadores de filmes, lubrificantes e redutores de fricção. (SANDFORD, COTTRELL et al., 1984) lista os mercados industriais mais importantes, bem como a aplicação dos polissacarídeos no mercado alimentar. A tabela 3 cita alguns polissacarídeos microbianos de interesse comercial (SANDFORD, COTTRELL et al., 1984).

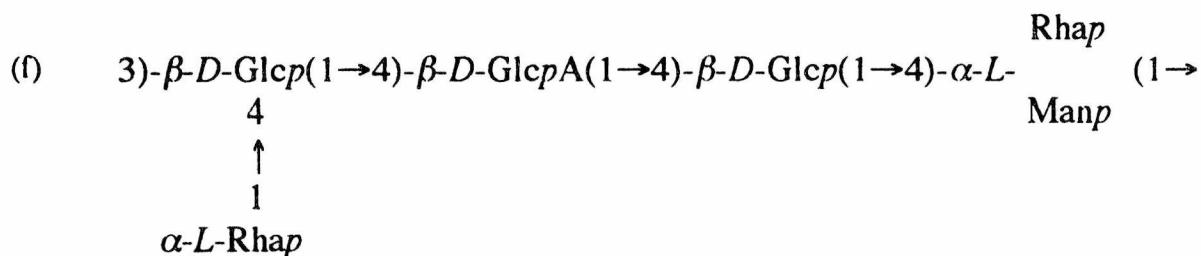
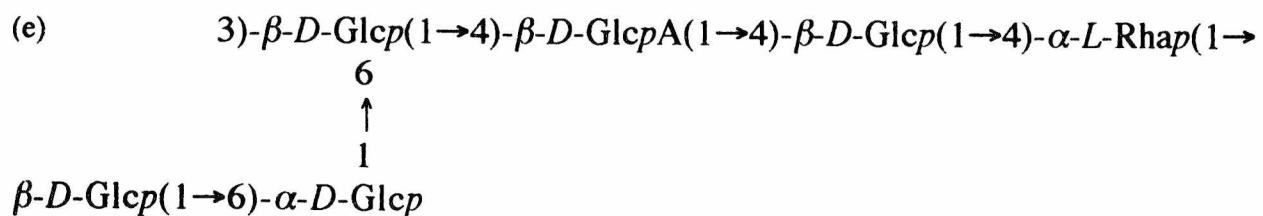
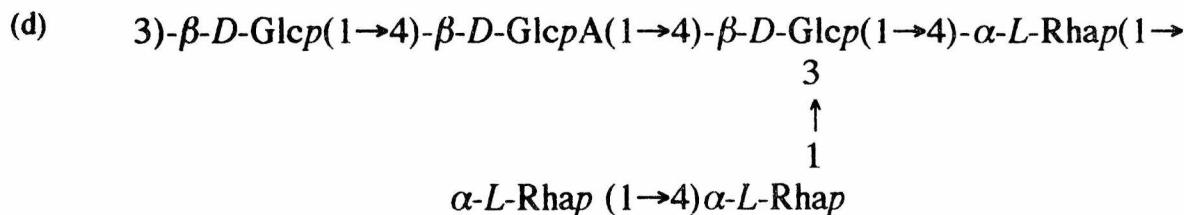
Tabela 3 - Polissacarídeos microbianos de interesse comercial

	Tipo	Fonte Microbiana
<b>a. Comercialmente disponível</b>		
Goma xantana	Aniônico	<i>Xanthomonas campestris</i>
<b>Goma gelano</b>	Aniônico	<i>Pseudomonas elodea</i>
Dextrano	Neutro	<i>Leuconostoc</i> ssp
<b>b. Sob atual desenvolvimento</b>		
<b>Polissacarídeo S-130</b>	Aniônico	<i>Alcaligenes</i> (ATCC 31555)
<b>Polissacarídeo S-194</b>	Aniônico	<i>Alcaligenes</i> (ATCC 31961)
<b>c. Desenvolvido (larga escala)</b>		
Escleroglucano	Neutro	<i>Sclerotium</i> ssp
Curdlan	Neutro	<i>Agrobacterium</i> ssp e <i>Alcaligenes faecalis</i>
Pululano	Neutro	<i>Aureobasidium pullulans</i>
Glicana de levedura (panific.)	Neutro	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Alginato bacteriano	Aniônico	<i>Azotobacter vinelandii</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Estudos estruturais revelaram uma família de polissacarídeos bacterianos exocelulares (vide figura 10.) cujas estruturas estão relacionadas à estrutura linear da goma gelano (fig. 10a) (JANSSON, LINDBERG et al., 1983; JANSSON, LINDBERG et al., 1985; JANSSON, LINBERG et al., 1986; JANSSON, SAVITRI et al., 1986; O'NEILL, SELVENDRAN et al., 1983; O'NEILL, SELVENDRAN et al., 1986; CHOWDHURY, LINDBERG et al., 1987a; CHOWDHURY, LINBERG et al. 1987b). Modificações da estrutura do gelano (figs 10b-f) incluem substituição parcial do(s) resíduo(s) 4) $\alpha$ -L-ramnopiranosílico na cadeia principal e/ou a adição de cadeias laterais contendo uma ou duas unidades sacarídicas (CAINS, MILES et al., 1991).

Figura 10 - Família de estruturas químicas baseadas na estrutura da goma gelano.

- (a)  $3\text{-}\beta\text{-}D\text{-GlcP}(1\rightarrow4)\text{-}\beta\text{-}D\text{-GlcPA}(1\rightarrow4)\text{-}\beta\text{-}D\text{-GlcP}(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-}L\text{-Rhap}(1\rightarrow$
- (b)  $3\text{-}\beta\text{-}D\text{-GlcP}(1\rightarrow4)\text{-}\beta\text{-}D\text{-GlcPA}(1\rightarrow4)\text{-}\beta\text{-}D\text{-GlcP}(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-}L\text{-Rhap}(1\rightarrow$   
 $3$   
 $\uparrow$   
 $1$   
 $\alpha\text{-}L\text{-Rhap}$  ou  $\alpha\text{-}L\text{-ManP}$
- (c)  $3\text{-}\beta\text{-}D\text{-GlcP}(1\rightarrow4)\text{-}\beta\text{-}D\text{-GlcPA}(1\rightarrow4)\text{-}\beta\text{-}D\text{-GlcP}(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-}L\text{-Rhap}(1\rightarrow$   
 $3$   
 $\uparrow$   
 $1$   
 $\alpha\text{-}L\text{-Rhap}$   $\text{ManP}$   
 $\text{Rhap}$



Polissacarídeos bacterianos relatados por: (a) goma gelano produzido por *Pseudomonas elodea*; (b) S-130 produzido por *Alcaligenes* ATCC 31555; (c) S-88 produzido por *Alcaligenes* ATCC 31554; (d) S-657 produzido por *Xanthomonas* ATCC 53159; (e) S-194 produzido por *Alcaligenes* ATCC 31961; e (f) S-198 produzido por *Alcaligenes* ATCC 31853 (Cains, Miles et al., 1991).

Apesar da similaridade nas estruturas químicas, a reologia das dispersões aquosas dos polissacarídeos acima são muito diferentes. Os polímeros ramificados exibem boa estabilidade térmica e tixotropia mas não geleificam (KANG, VEEDER et al., 1983; SANDFORD, COTTRELL et al., 1984).

CAINS, MILES et al. (1991) obtiveram padrões de fibra de raio-X para os polissacarídeos ramificados nativos S-130, S-198, S-194 e S-88. Todos produziram padrões indicando bom alinhamento molecular, mas pobre empacotamento intramolecular ou cristalização.

Do ponto de vista fermentativo, todos os exopolissacarídeos microbianos de significância industrial são produzidos em fermentação aeróbica submersa. Este fato é devido, primariamente, à fermentação em meio de viscosidade muito alta, como uma consequência da formação do produto. Esta viscosidade torna a fermentação de polissacarídeos microbianos verdadeiramente excepcional pelo fato de que parâmetros da fermentação, tais como aeração e agitação, são criticamente requisitados e necessários.

### 1.3.2 GOMA GELANO ("Gellan gum" ou S-60)

#### 1.3.2.1 Produção da goma gelano e Gelrite®

A goma gelano é produzida pela bactéria *Pseudomonas elodea* numa fermentação submersa aeróbica. O meio contém glucose como fonte de carbono, fosfato de potássio como agente tamponante, nitrato de amônio e proteína de soja ("Promosy") como fontes de nitrogênio, e elementos traço tais como magnésio, ferro, cobre, zinco, molibdênio, cobalto, manganês e boro. Numa típica fermentação, *P. elodea* converterá aproximadamente 50% da glucose à goma gelano em 50 horas. A viscosidade do líquido de fermentação alcança 5000-8000 cP, quando medido num viscosímetro modelo Brookfield LVF em 60 rpm a 25 °C (KANG, VEEDER et al., 1982).

A goma gelano tem a propriedade de produzir um gel termorreversível quando esquentado e esfriado. As características deste gel variam de acordo com o conteúdo de grupos *O*-acetil do polissacarídeo. Um gel elástico ou macio é produzido quando o polissacarídeo contém grupos *O*-acetil e um gel firme, quebradiço, quando o polissacarídeo é desacetilado. O último gel é o mais interessante e tem muitas possibilidades comerciais. A versão clarificada

deste biopolímero, chamado Gelrite®, tem grande potencial como um substituto do ágar em meio microbiológico (ANON., 1985a; ANON., 1985b; KANG, VEEDER et al., 1982).

Como primeiro passo para desacetilação, o líquido de fermentação é esquentado entre 90-95 °C. Neste ponto, o líquido de fermentação afina consideravelmente. O pH é ajustado para 10 com KOH e mantido naquele pH por 15 minutos. O líquido é neutralizado usando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e o polissacarídeo recuperado por precipitação com dois volumes de isopropanol. Gelrite® é produzido, por filtração do líquido quente tratado com álcali para produzir um produto clarificado seguido pela recuperação do polissacarídeo no filtrado por precipitação com isopropanol. Gelrite® também pode ser produzido por reconstituição, a partir da goma gelano desacetilada não clarificada, esquentando para reduzir a viscosidade e filtração para remover materiais insolúveis, com o polissacarídeo sendo novamente recuperado por precipitação com isopropanol. A filtração é necessária para remover células de *P. elodea* e outros resíduos insolúveis do meio de cultura, ou aquelas produzidos durante a fermentação e processos de desacetilação (KANG, VEEDER et al., 1982)

### 1.3.2.2 Composição e estrutura da goma gelano

O polissacarídeo nativo é composto de unidades repetitivas tetrassacarídicas de ácido *D*-glucurônico (1), *D*-glucose (2) e *L*-ramnose (1), esterificado no resíduo 3) $\beta$ -D-glucopiranósido com uma substituição éster glicérico parcial no C<sub>2</sub> e 50% de substituições éster acético no C<sub>6</sub>, tendo a estrutura da figura 10a (O'NEILL, SELVENDRAN et al., 1983; JANSSON, LINDBERG et al., 1983; KUO, MORT et al., 1986). A esterificação não impede a geleificação mas altera a textura dos géis através de inibição da associação intermolecular e cristalização (CARROL, CHILVRES et al., 1983; SANDFORD, COTTRELL et al., 1984).

### 3.2.3. Propriedades do gel de Gelrite®

As propriedades do gel foram revisadas por KANG, VEEDER et al. (1982). Gelrite® produz um gel firme, não elástico e quebradiço, semelhante a um gel de ágar. Gelrite® é caracterizado pelas seguintes propriedades:

- a) Gelrite® tem boa estabilidade térmica e é capaz de suportar um ciclo de autoclavação normal (121 °C, 15 psi, 15 minutos) sem significativa perda da força do gel. Quando comparado ao ágar, sua estabilidade térmica é excepcionalmente semelhante durante o ciclo inicial de autoclavação, que é mais significante uma vez que a maioria dos meios sólidos sofrem apenas um ciclo de esterilização.
- b) Gelrite® requer a presença de cátions tanto mono como divalentes para geleificação. Tanto a concentração como o tipo de cátion afetam a força do gel. Cátions divalentes, tais como magnésio ou cálcio têm um efeito muito mais profundo na força do gel do que íons monovalentes tais como sódio ou potássio. Os meios de gelano, preparados com Gelrite®, empregando-se uma pequena quantidade de  $\text{CaCl}_2$  (< 0,1%) são notavelmente estáveis a 80 °C pelo mínimo de 10 dias.
- c) Gelrite® requer tanto um ciclo de aquecimento como a presença de cátions para que a geleificação ocorra. Gelrite® necessita aquecimento de aproximadamente 100 °C para atingir sua completa solubilidade. A solução de Gelrite® permanece então essencialmente não viscosa até que, sob resfriamento, alcança seu ponto de solidificação, tempo no qual a geleificação ocorre muito rapidamente.

A tabela 4 compara a goma gelano com os géis de carragenano e ágar (SANDFORD, COTTRELL et al., 1984; KANG, VEEDER et al., 1982).

Tabela 4 - Propriedades da goma gelano: comparação com carragenano e ágar

	Natureza do gel	Ponto de fusão (°C)	Ponto de soli- dificação (°C)	Histerese (°C)
Goma gelano (Gelrite)	Firme/quebradiço	90-100	35-50 <sup>a</sup>	45-60
Carragenano (Kappa)	Firme/quebradiço	40-95	25-75	12-20
Ágar	Firme/quebradiço	60-97	32-39	<65

<sup>a</sup> - depende das concentrações do polissacarídeo e do cátion.

#### 1.3.2.4 Aplicações potenciais do gelano/Gelrite®

a) Como substituto ao ágar microbiológico, Gelrite® forma géis de alta força que são estáveis à múltiplas autoclavações, quimicamente inerte à maioria dos aditivos do meio de crescimento, geralmente resistente à degradação enzimática e, como o ágar, apresenta reversibilidade fusão/solidificação (KANG, VEEDER et al., 1982). Tipicamente, a força do gel de meios microbiológicos está entre 200-400 g/cm<sup>2</sup>. Três vantagens aparentes de Gelrite® sobre o ágar são: 1) claridade melhorada; 2) força do gel equivalente apenas com 1/3 a 1/2 da quantidade de ágar empregada; e, 3) toxicidade reduzida a microrganismos sensíveis e cultura de tecidos vegetais (SANDFORD, COTTRELL et al., 1984). Um estudo mostra que Gelrite® é superior ao ágar como o agente geleificante em meio para o crescimento de microrganismos termofílicos (LIN & CASIDA JR, 1984; ANON., 1985a; ANON., 1985b).

b) A goma gelano forma gel rígido coacervado na presença de gelatina. Estes géis foram descobertos como sendo adequados para microencapsulamento (ANON., 1983; CHILVRES & MORRIS, 1987). Acima de 60 °C, este coacervado apresenta baixa viscosidade enquanto que a 25 °C ele produz um gel de alta força. Coacervados de goma gelano/gelatina são estáveis sobre uma ampla faixa de pH e na presença de sais solúveis; além do que, contêm grupos carboxilas que estão disponíveis para ligações cruzadas.

- c) A goma gelano ainda não foi autorizada pela FDA ("Food and Drug Administration") para uso em alimentos. Particularmente atrativas, são as temperaturas de fusão que a goma oferece. Alguns produtos alimentares necessitam que sejam fundidos para serem processados, enquanto que outros, podem necessitar de uma estrutura de gel, que seja estável para tratamento a quente (*e.g.* frituras). A temperatura de solidificação está normalmente entre 30 e 45 °C, enquanto que a fusão pode estar acima ou abaixo de 100 °C, dependendo das condições de formação tal como o tipo e quantidade de cátions. Em alguns produtos, desejada estrutura, corpo e sensação na boca, podem ser conseguidos empregando a goma gelano em combinação com outros hidrocolóides alimentares, tais como a goma xantana, goma de alfarroba, guar, carboximetilcelulose, alginato ou pectina (SANDFORD, COTTRELL et al., 1984).
- d) Tanto géis com água como com glicóis (etilenoglicol, propilenoglicol, glicerol) têm usos industriais (ANON., 1983). Por exemplo, podem ser feitos desodorizadores de ar em forma de géis, controlando assim, a velocidade de evaporação variando apenas o conteúdo do glicol (KANG, VEEDER et al., 1983). Também pode ser empregado como matriz para imobilização de células inteiras, ou ainda, ser usado como gel de eletroforese, após a neutralização das cargas aniónicas com grupos metfílicos, anulando o efeito eletroforético (KANG, VEEDER et al., 1983).

### 1.3.3 POLISSACARÍDEO S-130 ("Welan gum")

#### 1.3.3.1 Produção do polissacarídeo S-130

Este polissacarídeo é produzido por uma espécie de *Alcaligenes* (ATCC 31555) num processo de fermentação submersa aeróbica. O meio contém 3% de glucose como fonte de carbono, e os outros componentes semelhantes à produção da goma gelano. A fermentação está completa em 60-70 horas, com a conversão de aproximadamente 60% da fonte de carbono inicial a polissacarídeo. O polissacarídeo é recuperado por precipitação com dois volumes de isopropanol (KANG, VEEDER et al., 1983).

#### 1.3.3.2 Composição e estrutura do polissacarídeo S-130

Com sua estrutura química relacionada àquela da goma gelano, este polissacarídeo é composto de unidades repetitivas pentassacarídicas, contendo ácido *D*-glucurônico (1), *D*-glucose (2), *L*-manose (1 ou 0) e *L*-ramnose (1 ou 2), *O*-acetil (O'NEILL, SELVENDRAN et al., 1986; JANSSON, LINDBERG et al., 1985) estabeleceram que aproximadamente 50% das unidades repetitivas são mono *O*-acetiladas, embora a localização do substituinte não seja conhecida. A estrutura do S-130 ("welan gum") está representada na figura 10b.

### 1.3.3.3 Propriedades do polissacarídeo S-130

Este polissacarídeo tem alta viscosidade em baixa concentração, (0,1%) i.e., aproximadamente 40 cP quando medido num viscosímetro Brookfield LVF em 60 rpm empregando o adaptador UL. A alta viscosidade que exibe em baixa velocidade de cizalhamento ("shear rate"), mas a alta viscosidade em baixa concentração do polímero contribuem para a excelente capacidade de suspensão deste polímero. Este polímero é hoje o mais termoestável polissacarídeo disponível no mercado, sob o nome comercial de Welan®, para o uso no campo do petróleo. Ele pode suportar temperaturas de até 142 °C por 1 hora, sem perda significante de viscosidade (KANG, VEEDER et al., 1983; SANDFORD, COTTRELL et al., 1984). A viscosidade do S-130 não é afetada pela mudança de pH (2-12) e o polímero é compatível e estável em altas concentrações de sal.

Uma outra propriedade chave deste polissacarídeo é sua capacidade de suspensão. Ele tem um valor de rendimento de trabalho de aproximadamente 80 dinas/cm<sup>2</sup>. Um valor de 60 dinas/cm<sup>2</sup> é indicativo de boa capacidade de suspensão, tal como aquela exibida pela goma xantana (KANG, VEEDER et al., 1983; SANDFORD, COTTRELL et al., 1984).

### 1.3.3.4 Aplicações potenciais

Poços de petróleo agora estão sendo perfurados a maiores profundidades e/ou em locais onde na base do buraco, as temperaturas são muito maiores do que 120 °C, portanto, excedendo a estabilidade térmica dos polissacarídeos disponíveis. Com base nas suas propriedades, S-130 funciona bem tanto como um aditivo fluido para perfuração como numa repetição e sistema de conclusão para poços com altas temperaturas (GABRIEL, 1979; KANG, VEEDER et al., 1983; SANDFORD, COTTRELL et al., 1984).

### 1.3.4 POLISSACARÍDEO S-194 ("Rhamsan gum")

#### 1.3.4.1 Produção do polissacarídeo S-194

O polissacarídeo S-194 é produzido por outra cepa de *Alcaligenes* sp ATCC 31961 (empregada em nosso trabalho), num processo de fermentação aeróbica. O meio de cultura consiste de glucose como uma fonte de carbono e dos mesmos componentes empregados na produção da goma gelano e S-130. O tempo de fermentação é 60-72 horas com viscosidade do meio de 3400-4900 cP, medido num viscosímetro Brookfield LVF com êmbolo ("spindle") nº 4 em 60 rpm. Este organismo converte aproximadamente 50% da fonte de carbono inicial a polissacarídeo (KANG, VEEDER et al. 1983).

#### 1.3.4.2 Composição e estrutura do polissacarídeo S-194

Com sua estrutura química relacionada àquela da goma gelano, este polissacarídeo é composto de unidades repetitivas hexassacarídicas, contendo ácido *D*-glucurônico (1), *D*-glucose (4), e *L*-ramnose (1), carregando aproximadamente um grupo *O*-acetil por unidade repetitiva, distribuído sobre posições secundárias (JANSSON, LINBERG et al., 1986). A estrutura do S-194 ("rhamsan gum") está representada na figura 10e.

#### 1.3.4.3 Propriedades do polissacarídeo S-194

Este polímero exibe alta viscosidade em baixa concentração (0.1%), i.e., aproximadamente 50 cP quando medido num viscosímetro Brookfield LVF em 6 rpm usando

um adaptador UL. Ele tem boa estabilidade térmica até excedendo 100 °C. Além disso, sua viscosidade é conservada sob estas condições. S-194 apresenta comportamento pseudoplástico, ou seja, uma diminuição de viscosidade com um aumento de cizalhamento. Novamente, a alta viscosidade em baixa concentração e o comportamento pseudoplástico contribuem para a excelente capacidade de suspensão. Na mesma viscosidade, S-194 supera de longe a carboximetilcelulose, hidroxietilcelulose e guar, na suspensão de contas de resina ou de vidro. Também é necessário muito menos S-194 do que outras gomas para produzir a mesma viscosidade (KANG, VEEDER et al., 1983).

A viscosidade de S-194 não é afetada pelo pH. Este polímero também apresenta boa estabilidade de cizalhamento sob as condições geradas no moedor "Dyno Mill®". Dyno Mill® é empregado para moer ingredientes ativos à partículas finas de modo a produzir suspensões estáveis. Trata-se de um moedor horizontal que emprega contas de vidro como meio moedor e também impõe intensa força de cizalhamento às partículas. A maioria dos espessantes não podem suportar esta alta força de cizalhamento e sofrem severa perda de viscosidade. S-194 é compatível com altas concentrações de sais (presentes nos fertilizantes), incluindo fosfato. Esta propriedade é nova, desde que outros polissacarídeos comercialmente à disposição precipitarão na presença de altas concentrações de tais sais (COLEGROVE, 1983).

#### 1.3.4.4 Aplicações potenciais

Devido a sua excelente capacidade de suspensão, S-194 deveria ser muito útil em qualquer aplicação que exija esta capacidade. Por causa de sua compatibilidade com sais tais como sulfato, polifosfato ou ortofosfato de amônio, ele funciona muito bem como um agente de suspensão em fertilizantes. Atualmente a argila de "attapulgite" é o agente normalmente empregado para esta aplicação. Enquanto que a argila é facilmente disponível e barata, ela tem várias desvantagens que incluem problemas de controle da poeira, inativação de alguns

pesticidas por absorção e a necessidade de alta força de cizalhamento de mistura para efetuar a completa hidratação e inchamento. O uso de S-194 nestes sistemas, elimina o problema de poeira da argila e não existe nenhuma inativação dos princípios ativos (COLEGROVE, 1983; KANG, VEEDER et al., 1983).

Os fertilizantes fluidos tipo suspensões têm se tornado muito importantes na agricultura nos últimos anos, e sua popularidade tem aumentado devido às várias vantagens oferecidas sobre os outros sistemas: 1) os custos de produção são mais baixos devido ao grau de pureza dos materiais empregados; 2) padrões de análise mais alto do que com líquidos normais, especialmente misturas contendo alta percentagem de potássio; 3) os micronutrientes podem ser uniformemente misturados e suspensos; e, 4) os pesticidas podem ser adicionados e uniformemente distribuídos através das suspensões (COLEGROVE, 1983).

## 1.4 POLÍMEROS DE RESERVA

### 1.4.1 INTRODUÇÃO E DEFINIÇÃO

Há muitos anos, os compostos armazenadores de energia são elementos reconhecidamente presentes em plantas superiores e animais. Suas funções como fontes provedoras de carbono e energia, como no caso do amido, glicogênio e lipídeos, ou apenas energia como a creatina e arginina fosfato, conduziram à especulação sobre a possível existência de compostos análogos que desempenhassem esse papel nos microrganismos. O fato de ocorrerem polissacarídeos que lembram amido e glicogênio em alguns microrganismos, não é, naturalmente, evidência de suas funções como compostos armazenadores de energia.

Wilkinson foi o primeiro a revisar este tópico em 1959. No início ele estava preocupado em dissipar o ceticismo que, naquele tempo, envolvia a existência de tais compostos em bactérias (WILKINSON, 1959).

Segundo ele, se a função de armazenamento fosse atribuída a um composto celular, três critérios, deveriam ser primeiramente satisfeitos:

- (1) Que o composto seja acumulado intracelularmente, quando o suprimento de energia proveniente de fonte exógena estiver além daquele necessário pela célula, para o crescimento e processos relacionados;
- (2) Que o composto seja utilizado quando o suprimento de energia exógena não for suficiente para sustentar o crescimento e a energia de manutenção necessária para a preservação da viabilidade; e
- (3) Que o composto seja degradado para fornecer energia numa forma utilizável pela célula, e por este processo confira à célula uma vantagem biológica para sobrevivência sobre uma célula correspondente que não possua a reserva.

Wilkinson enfatizou a indispensável confiança nos dois primeiros critérios para a avaliação de uma função armazenadora, desde que alguns compostos possam claramente ser produzidos pela célula numa tentativa de destoxicificar produtos finais do metabolismo, que poderiam de outro modo ser acumulados em alta velocidade e tornarem-se tóxicos à célula. Contudo, se o primeiro critério de Wilkinson for qualificado como o acúmulo *intracelular* de um composto, então a maioria de sua preocupação original em distinguir entre compostos de armazenamento genuíno e de desvio ou produtos do super fluxo metabólico, torna-se desnecessária (DAWES & SENIOR, 1973). Uma clara distinção também deve ser feita entre compostos que servem como reservas especializadas de carbono e de energia e aquelas que são essencialmente basais à célula, *e.g.* proteínas e RNA, mas que sob condições de fome, podem ser degradados para fornecer energia (DAWES & SENIOR, 1973)

A aceitação do critério para estabelecer o papel de um composto como material armazenador de energia, conduz ao prognóstico geral de que sob condições onde o crescimento microbiano é limitado por algum fator, outro do que a fonte de carbono e energia, pode ocorrer acúmulo do material de reserva. Tais condições deveriam conduzir a um estado energético intracelular favorável que provavelmente atuaria como um sinal para estimular a biossíntese do composto de armazenamento apropriado. Desde que alguns microrganismos são capazes de acumular mais do que um tipo de material de reserva, os processos regulatórios são de considerável significância (DAWES & SENIOR, 1973)

A década de 60 assistiu à descoberta do controle alostérico de enzimas e o reconhecimento da importância dos nucleotídeos de adenina e nicotinamida em muitos destes processos regulatórios. Estas características do metabolismo passaram a receber um tratamento unificado com o conceito de carga energética de Atkinson (DAWES & SENIOR, 1973). Atkinson sugeriu que é a carga energética que regula as vias que produzem e utilizam compostos de alta energia, garantindo deste modo que estes processos sejam mantidos em um estado equilibrado para a economia celular. Uma carga energética de aproximadamente 0,85 foi

considerada representar o ponto de equilíbrio para o balanço das reações produtoras e consumidoras de energia.

Como os compostos armazenadores de energia devem estar necessariamente envolvidos na economia geral da célula microbiana, pareceria razoável supor que suas biossínteses e subsequentes degradações poderiam ser controladas de alguma forma pela carga energética. É importante notar que a biossíntese de glicogênio e polifosfatos envolve a direta utilização de ATP, enquanto que a de póli-hidróxibutirato não, uma característica sem igual entre tais compostos (DAWES & SENIOR, 1973).

As três principais classes de materiais de armazenamento são **poliglucanas** (glicogênio e granulose), **poliésteres** [póli-3-hidróxibutirato (PHB) e póli-hidróxialcanoatos relacionados (PHA)], e **polifosfatos**. Algumas bactérias acumulam mais do que um tipo de material de armazenamento e, nestes casos, condições ambientais e mecanismos regulatórios envolvidos determinam a proporção dos diferentes polímeros sintetizados. Exemplos de tais reservas duplas incluem glicogênio e lipídeo (*Mycobacterium phlei*), glicogênio e PHB (*Rodospirillum rubrum*, *Bacillus megaterium*), glicogênio e polifosfatos (*Enterobacter aerogenes*) (DAWES & SENIOR, 1973).

Compostos de armazenamento acumulam, normalmente, em grânulos citoplasmáticos, em resposta a uma limitação nutricional na presença de excesso do substrato relevante, *e.g.* no final da fase de crescimento em cultivo em batelada ("batch culture"), ou sob uma determinada limitação nutricional em cultivo contínuo. Porém, são conhecidas algumas bactérias que sintetizam reservas em crescimento não restrito. A quantidade de reserva acumulada varia amplamente dependendo do organismo e das condições ambientais predominantes. Como os compostos de armazenamento são polímeros de alto peso molecular, sua síntese exerce um efeito mínimo na pressão osmótica intracelular (DAWES & SENIOR, 1973).

A pesquisa sobre os compostos de armazenamento avançou muito na última década. Houve um grande impulso na genética da biossíntese do glicogênio; os genes estruturais de

*Escherichia coli* foram caracterizados e investigados os fatores reguladores de suas funções. (PREISS & ROMEO, 1989). No mesmo período, o intenso interesse industrial despertado por PHB e polímeros relacionados, por conta de suas propriedades como biodegradabilidade, termoplásticos biocompatíveis e suas aplicações comerciais em potencial têm estimulado esforços da pesquisa mundial (DAWES, 1991).

## 1.4.2 POLISSACARÍDEOS SEMELHANTES AO GLICOGÊNIO

### 1.4.2.1 Ocorrência em Bactérias

A presença de glicogênio já foi relatada em mais de 40 espécies bacterianas (PREISS & ROMEO, 1989). O glicogênio acumula no citoplasma como grânulos, cuja localização pode variar dependendo do gênero em questão. Estudos com *Methanolobus* e *Methanococcus* mostram que os grânulos estão aparentemente distribuídos pelo citoplasma, e não predominantemente localizados próximos à membrana citoplasmática, porém, células lisadas de *Methanococcus vannielii* revelaram o glicogênio ligado principalmente ao envelope (KÖNIG, NUSSER et al., 1985).

Os grânulos bacterianos podem variar de 20 a 100 nm em diâmetro, mas em cianobactérias o glicogênio pode ocorrer como cristais, esferas ou bastonetes, normalmente encontrados entre as membranas dos tilacóides. Já os grânulos isolados de *Oscillatoria rubescens* podem ser tão longos quanto 300 nm e são compostos de discos de 7 nm com um póro central (DAWES, 1991). Nas bactérias estudadas, não parece existir uma membrana ligada ao grânulo, mas PREISS e seus colegas relataram que a glicogênio sintase pode ser encontrada na forma solúvel ou particulada, sendo esta normalmente ligada a glicogênio (PREISS & WALSH, 1981). A granulose sintetase de *Clostridium pasteurianum* também está

intimamente associada com os grânulos e a glicogênio fosforilase de *Streptococcus mitis* igualmente se liga a grânulos de glicogênio (DAWES, 1991).

Normalmente o glicogênio é acumulado quando o crescimento é limitado pelo suprimento de nitrogênio utilizável na presença de excesso de carbono exógeno, mas são conhecidas exceções. Por exemplo, glicogênio é sintetizado durante o crescimento exponencial de *Rhodopseudomonas capsulata* e *Sulfolobus solfataricus*, e durante cultivo contínuo com limitação de carbono de *Streptococcus sanguis* (EIDELS & PREISS, 1970; KÖNIG, SKORKO et al., 1982; KEEVIL, MARCH et al., 1984).

Existe uma relação inversa entre a velocidade de crescimento e a quantidade de glicogênio acumulado por *E. coli* B crescida em cultivos com glucose e limitação de nitrogênio (HOLME, 1957); este é um tipo geral de comportamento que tem sido observado com outras bactérias.

#### 1.4.2.2 Estrutura Química

As poliglucanas que funcionam como compostos de armazenamento são constituídos de  $\alpha$ -D-glucose,  $\alpha$ -1,4 ligadas com algumas ramificações  $\alpha$ -1,6. Após a síntese de uma cadeia linear de unidades glucosil  $\alpha$ -1,4 ligadas, uma enzima de ramificação transfere unidades glucosil da extremidade da cadeia linear, produzindo ligações glucosil  $\alpha$ -1,6. O comprimento das cadeias e o grau de ramificação variam consideravelmente. Em glicogênio bacteriano, aproximadamente 10% das ligações são  $\alpha$ -1,6, mas o valor mais preciso depende da bactéria e possivelmente do estágio de síntese, e.g. em *Mycobacterium smegmatis* o grau de polimerização diminui e o coeficiente de sedimentação aumenta quando os grânulos aumentam de tamanho (ANTOINE & TEPPER, 1969). Os pesos moleculares do glicogênio de diferentes bactéria também variam; *Mycobacterium phlei* possui um glicogênio de peso molecular  $1-2 \times 10^8$

comparado com  $8,2 \times 10^7$  para *E. coli* (ANTOINE & TEPPER, 1969; HOLME, LAURENT et al., 1957).

O comprimento da cadeia ramificada da maioria dos glicogênios bacterianos é de aproximadamente 10 a 13 unidades glucosil, mas algumas bactérias formam glicogênio com cadeias ramificadas mais curtas, na faixa de 7 a 9 unidades. Glicogênio com baixo nível de ramificações, lembrando a amilopectina e denominada granulose, foi encontrado em *Clostridium pasteurianum* com comprimento de 21 a 41 unidades glucosil e *Selenomonas ruminantium* com uma cadeias de 23 unidades (DARVILL, HALL et al., 1977; KAMIO, TERAWAKI et al., 1981).

#### 1.4.2.3 Enzimologia da Biossíntese de Glicogênio

##### 1.4.2.3.1 A via biossintética bacteriana

A síntese do glicogênio bacteriano ocorre principalmente por via nucleotídeo açúcar, envolvendo a polimerização das unidades glucosil derivadas de glucose 1-fosfato (vide figura 11). O verdadeiro doador glucosil para síntese do polissacarídeo em procariotos é a ADPglucose (em contraste com os microorganismos eucariotos que empregam a UDPglucose), que é formada a partir de glucose 1-fosfato e ATP pela reação da ADPglucose pirofosforilase (RIBEREAU-GAYON, SABRAW et al., 1971; PREISS, 1984). A unidade glucosil é então doada a uma  $\alpha$ -glucana iniciadora ("primer") para alongar a cadeia linear  $\alpha$ -1,4, catalisado pela glicogênio sintase, e finalmente, uma enzima ramificadora introduz ramificações  $\alpha$ -1,6 dentro da estrutura (DAWES, 1991).

Em *Neurospora* (fungo ascomiceto), foi bem estabelecido que, pelo menos *in vitro*, a glicogênio sintase pode atuar usando ADPglucose, além de UDPglucose (FONTANA & KRISMAN, 1978).

Figura 11 - Biossíntese e degradação de glicogênio em procariotos e sua regulação

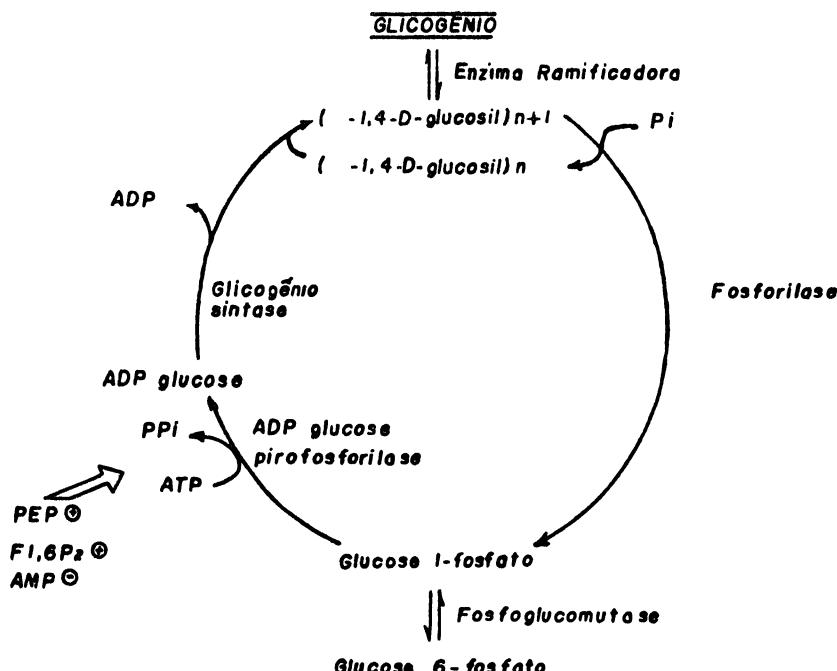


Figura retirada da referência Dawes, 1991.

O controle da atividade da ADPglucose pirofosforilase é afetada positivamente por intermediários da glicólise, *e.g.* fosfoenolpiruvato (PEP) e frutose 1,6-bifosfato (F1,6P<sub>2</sub>), e negativamente por AMP

#### 1.4.2.3.2 ADPglucose pirofosforilase

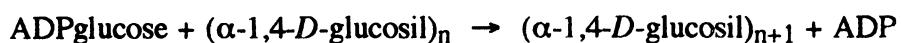
Esta enzima, primeiramente relatada em bactérias por (SHEN & PREISS, 1964) e desde então identificada em 46 espécies bacterianas (PREISS & ROMEO, 1989), catalisa a reação:



Ela é a primeira enzima chave à seqüência biosintética do glicogênio e desempenha o papel regulatório no processo. Na maioria das bactérias é ativada por intermediários da glicólise e inibida por AMP, ADP e/ou fosfato inorgânico (Pi). Como o ATP é um substrato, a carga energética da célula pode ser considerada como um regulador da síntese de glicogênio (SHEN & ATKINSON, 1970), enquanto intermediários glicolíticos podem ser vistos como indicadores do excesso de carbono intracelular. Na maioria dos casos, o ativador glicolítico intermediário aumenta a afinidade aparente da enzima por seus substratos, glucose 1-fosfato e ATP. A inibição causada por AMP, ADP e/ou Pi pode ser revertida ou prevenida pelo aumento da concentração do ativador, assegurando, deste modo, uma formação de glicogênio otima apenas sob condições de excesso de carbono e alta carga energética (PREISS & ROMEO, 1989).

#### 1.4.2.3.3 Glicogênio sintase

Esta enzima catalisa a transferência de uma unidade glucosil de ADPglucose para um "primer"  $\alpha$ -1,4-glucana, do seguinte modo:



Glicogênio sintase é específica por ADPglucose nas enterobactérias e é o substrato preferido em algumas arquibactérias (KÖNIG, SKORKO et al., 1982). Ela não manifesta nenhuma propriedade regulatória e não existe nas formas ativa e inativa; portanto difere da enzima de mamíferos, em substrato e características. Os fons magnésio estimulam sua atividade, provavelmente por ligação a ADP e deste modo inibindo o efeito inibitório do nucleotídeo (DAWES, 1991).

#### 1.4.2.3.4 Enzima ramificadora

Esta enzima transfere unidades glucosil da extremidade não redutora de uma  $\alpha$ -1,4-glucana para a posição 6 de certas unidades glucosil dentro da cadeia, criando desta forma pontos de ramificação  $\alpha$ -1,6. O grau de ramificação é uma característica da espécie bacteriana e por isso alguma especificidade de funcionamento deve estar envolvida (DAWES, 1991)

#### 1.4.2.4 Gens Estruturais para a Síntese de Glicogênio

Em *E. coli* foram feitos avanços significativos envolvendo os gens estruturais na síntese de glicogênio. Os gens para ADPglucose pirofosforilase (*glg C*), glicogênio sintase (*glg A*) e enzima ramificadora (*glg B*) estão localizadas juntas na ordem *glg B-glg C-glg A*. Técnicas de DNA recombinante foram subsequentemente aplicadas com um mutante faltando os gens *glg* e a ordem dos genes foi confirmada. Porém duas regiões codificadoras de cadeias polipeptídicas, designadas *glg X* e *glg Y*, foram encontradas num grupo de gen ("gene cluster"), na ordem *glg B-glg X-glg C-glg A-glg Y* (transcrição da esquerda para a direita), e evidências alegam *glg X* codificando para enzimas do tipo que hidrolisam  $\alpha$ -1,4-glucanas ou catalizam reações de  $\alpha$ -1,4-glucana transferase ( $\alpha$ -amilase, pululanase etc); o produto de *glg Y* é glicogênio fosforilase (ROMEO, KUMAR et al., 1988; YU, JEN et al., 1988), designado como *glg P* pelos últimos pesquisadores. Portanto as enzimas para síntese e degradação de glicogênio parecem estar codificadas sobre o mesmo operon.

#### 1.4.2.5 Controle da Expressão Gênica do Glicogênio

Além da regulação alostérica da síntese de glicogênio, também ocorre o controle da formação de enzima. Durante o crescimento rápido de *E. coli* B, as enzimas biossintéticas de

glicogênio são reprimidas e o acúmulo de glicogênio é mínimo. A desrepressão ocorre quando as células em cultivo em batelada entram na fase estacionária em exaustão de nitrogênio, ou quando é diminuída a taxa de crescimento das culturas em cultivo contínuo em limitação de nitrogênio; sendo o efeito mais pronunciado em meio rico do que em meio mínimo de sais.

Existem vários inibidores postulados da síntese de ADPglucose, mas agora há boa evidência de que AMPc e guanosina tetrafosfato (ppGpp) estão envolvidos na regulação da expressão gênica do glicogênio. Após a observação original de que AMPc e a proteína receptora de AMPc (CRP) são requeridos para a síntese de glicogênio, obteve-se evidência para um efeito direto de AMPc na expressão do gen *glg C* (DIETZLER, LECKIE et al., 1977; URBANOWISK, LEUNG et al., 1983). Mais tarde, PREISS & ROMEO (1989) encontraram que AMPc e CRP juntos estimulavam a síntese de ADPglucose pirofosforilase até 25 vezes e glicogênio sintase até 10 vezes num sistema *in vitro*, mas não obtiveram efeito significativo sobre a enzima ramificadora. O AMPc não intermedia seu efeito por alosterismo direto, nem afeta as concentrações dos moduladores de ADPglucose pirofosforilase.

Mutantes bacterianos que foram alterados no gen *rel A* (que codifica a enzima necessária para síntese do nucleotídeo guanosina pppGpp e ppGpp) são incapazes de sintetizar glicogênio com tanta eficiência quanto a cepa isogênica *rel A<sup>+</sup>*. Direto aumento da síntese de ADPglucose pirofosforilase e glicogênio sintase por ppGpp foi demonstrado, embora tenha havido pouco efeito sobre a enzima de ramificação (PREISS & ROMEO, 1989). A ativação efetuada por ppGpp foi intensificada pela presença de AMPc e CRP.

#### 1.4.2.6 Degradação do Glicogênio

A degradação de glicogênio intracelular ocorre quando a fonte de carbono exógena está seriamente reduzida ou esgotada. Enquanto tem sido identificado, em bactérias, um número de enzimas que são capazes de catalisar a hidrólise ou fosforólise das ligações glicosídicas  $\alpha$ -

1,4 e hidrólise das ligações  $\alpha$ -1,6, os detalhes precisos da degradação de glicogênio e seu controle ainda estão incompletos. Uma observação geral indica que a velocidade de utilização do glicogênio é significativamente mais baixa do que sua velocidade de síntese (DAWES, 1991).

A *Escherichia coli* K-12 possui uma glicogênio fosforilase constitutiva (CHEN & SEGAL, 1968a; CHEN & SEGAL, 1968b). Ela catalisa a fosforólise de ligações  $\alpha$ -1,4 do glicogênio, dando glucose 1-fosfato e eventualmente um produto que requer a atividade de uma enzima desramificadora para seu posterior metabolismo. A glucose 1-fosfato entra nas principais vias metabólicas depois de convertida a glucose 6-fosfato pela ação da fosfoglucomutase. ADPglucose inibe competitivamente a fosforilase com respeito a glucose 1-fosfato. Diferente da enzima de mamíferos, não existe nenhuma evidência para o controle da atividade da fosforilase bacteriana por modificação química (DAWES, 1991).

Em bactérias foram encontradas dois tipos de enzimas desramificadoras ( $\alpha$ -1,6): pululanase que desramifica maltodextrinas ramificadas exógenas mas com pouco efeito sobre glicogênio, duvidosamente presente em *E. coli*, e uma enzima que desramifica glicogênio e amilopectina, mas não o pululano. A última enzima provavelmente funciona na degradação de glicogênio em *E. coli*. O esquema proposto para este organismo envolve um duplo ataque ao glicogênio pela glicogênio fosforilase e uma amilase desramificadora que dá maltodextrinas lineares, das quais é produzida glucose pela ação da amilomaltase e glucose 1-fosfato pela maltodextrina fosforilase (PALMER, WOBER et al., 1973).

A observação de que ADPglucose, o substrato para a glicogênio sintase, inibe competitivamente a glicogênio fosforilase, oferece o único meio racional de controle da degradação do glicogênio evitando a ação da fosforilase quando estiver ocorrendo síntese ativa de glicogênio. (CHEN & SEGAL, 1968a).

A velocidade com que as bactérias degradam seus glicogênios deve estar individualmente correlacionada com a estrutura de suas poliglucanas. Organismos tais como *Arthrobacter* e *Mycobacterium* que possuem glicogênio altamente ramificado (*i.e.* com cadeias

curtas de 7 a 9 unidades glucosil), degradam-no mais lentamente do que aqueles, como *E. coli* e *Enterobacter aerogenes*, cujas cadeias são mais longas (12 a 15 unidades) (ZEVENHUIZEN & EBBINK, 1974). Foi proposto que a degradação do glicogênio é limitada pela baixa atividade da enzima desramificadora.

#### 1.4.2.7 Papéis Fisiológicos do Glicogênio

A posse do depósito intracelular de glicogênio permite que algumas bactérias sobrevivam melhor, sob condições de fome, do que organismos correspondentes que não são dotados; todavia, acredita-se que a velocidade com que o material é utilizado seja um fator crucial. Aquelas bactérias que são capazes de igualar intimamente as velocidades de degradação do glicogênio e seus requerimentos de energia de manutenção sobrevivem por períodos mais longos (DAWES, 1991).

O glicogênio freqüentemente exerce uma ação poupadora da degradação de proteínas e RNA celular, provendo a célula com energia e carbono. Porém, este comportamento não é universal, e existem bactérias (e.g. *Sarcina lutea*) que mesmo contendo poliglucanas morrem numa velocidade mais rápida do que seus similares sem poliglucana (PREISS & ROMEO, 1989).

O polissacarídeo também desempenha um papel na esporulação em várias cepas de *Clostridium*, *Bacillus cereus* e *Streptomyces viridochromogenes*. Previamente à esporulação, o acúmulo de granulose pode chegar até 60% da biomassa, sendo então rapidamente consumida, paralelamente com a formação e maturação dos esporos (PREISS & ROMEO, 1989).

É interessante notar que a síntese de glicogênio e sua posterior degradação por bactérias bucais (e. g. *Streptococcus mutans* ou *Streptococcus mitis*) podem ser um importante processo no desenvolvimento da cárie dentária. Quando comparados com bactérias bucais que

não são capazes de sintetizar glicogênio, eles produzem mais ácido de açúcar exógeno e podem produzir ácido na ausência de carboidrato exógeno (PREISS & ROMEO, 1989).

As cianobactérias são capazes de acumular uma variedade de materiais, considerados como sendo de reserva. Polissacarídeos como o glicogênio, contudo, representam nestes organismos os principais estoques de energia. ERNEST, KIRSCHENLOHR et al. (1984) e ERNEST & BÖGER, (1985) demonstraram que o suprimento de carboidratos para respiração é um pré-requisito para a resistência da nitrogenase ao oxigênio.

Embora as evidências disponíveis não sejam inteiramente decisivas, existem hoje boas razões para considerar que, em muitas bactérias, o glicogênio e polissacarídeos relacionados sirvam como reservas de carbono e energia.

### 1.4.3 PÓLI-HIDRÓXIALCANOATOS

#### 1.4.3.1 Ocorrência e Estrutura

Quase sete décadas se passaram desde que LEMOIGNE (1926) relatou pela primeira vez a existência do poliéster póli-3-hidróxibutirato (PHB) em grânulos citoplasmáticos de *Bacillus megaterium*. Posteriormente foi descoberto ter uma distribuição espalhada entre bactérias aeróbicas Gram-positivas e Gram-negativas, e em espécies anaeróbicas fotossintéticas, litotrofos, organotrofos e arquibactérias (DAWES & SENIOR, 1973; PREISS, 1989; DAWES, 1989). A primeira indicação de que o polímero descoberto por Lemoigne poderia conter outras porções de 3-hidroxiácidos além de 3-hidróxibutirato (3HB) foi fornecida por WALLEN & ROHWEDDER (1974), que relataram heteropolímeros em extratos clorofórmicos de lodo de esgoto ativado. Eles notaram a presença de 3HB e 3-hidróxivalerato (3HV; 3-hidróxipentanoato) como principais constituintes junto com menores quantidades de 3-

hidroxiácidos com C<sub>6</sub> e possivelmente C<sub>7</sub>. Estas observações foram extendidas e um significante desenvolvimento foi a descoberta de que *Pseudomonas oleovorans*, quando crescida em 50% (v/v) de n-octano, acumulava grânulos que se pareciam com inclusões de PHB, mas consistiam principalmente de um poliéster de 3-hidróxioctanoato (FINDLEY & WHITE, 1983; ODHAM, TUNLID et al., 1986; SMET, EGGINK et al., 1983). Desde aquele tempo, florescente pesquisa, alimentada pelas atrativas propriedades comerciais destes polímeros que se comportam como termoplásticos biodegradáveis, tem conduzido à descoberta de uma ampla faixa de polímeros de composição variada. Veio então o reconhecimento de que PHB é mais um exemplo, embora o mais abundante, de uma classe geral de poliésteres microbianos oticamente ativos denominado póli-hidróxialcanoato (PHA), com fórmula geral: (ANDERSON & DAWES, 1990)



Estes poliésteres são acumulados em grânulos citoplasmáticos, são normalmente esféricos e variam em tamanho de acordo com o microrganismo: os diâmetros estão tipicamente na faixa de 0,2 a 0,7  $\mu\text{m}$ . Estudos de microscopia ótica e crio-fratura de vários organismos indicaram a presença de uma membrana ligada, sem unidade, com 2,5 a 4,5 nm de espessura, e a análise de grânulos de *Bacillus megaterium* revelou que 2% (p/p) do grânulo de PHB nativo era proteína e aproximadamente 0,5% (p/p) lipídeo, principalmente ácido fosfatídico (GRIEBEL, SMITH et al., 1968). A PHB sintase (e em alguns casos a PHB despolimerase) parece estar associada com a membrana.

Estudos com *Alcaligenes eutrophus* mostraram que o número de grânulos por célula é aparentemente fixada nos estágios iniciais do acúmulo do polímero (BALLARD, HOLMES et al., 1987). O número e o tamanho dos grânulos foram determinados em dois experimentos de diferente escala empregando-se crio-fratura e microscopia eletrônica de transmissão, com microrganismos limitados em nitrogênio. O número médio de grânulos permaneceu constante em  $12,7 \pm 1,0$  e  $8,6 \pm 0,6$ , respectivamente, e aumentaram uniformemente em diâmetro médio de 0,24 a 0,5  $\mu\text{m}$  para acomodar o PHB sintetizado. A produção do polímero no organismo

cessou num conteúdo de aproximadamente 80% (p/p), embora a PHB sintase tenha permanecido com alta atividade e o substrato ainda disponível. Foi concluído, portanto, que acontece o constrangimento físico e as células são incapazes de acomodar mais polímero dentro do espaço delimitado pela parede celular.

Estudos conformacionais e de difração de raio X mostraram que PHB é uma hélice compacta com orientação no sentido horário apresentando eixo de dois giros e uma repetição de fibra de 0,596 nm (CORNIBERT & MARCHSSAULT, 1972). É oticamente ativo, com o centro quiral da unidade monomérica sempre na configuração R absoluta D(-).

A maioria da pesquisa publicada sobre PHA, outros além do PHB, tem sido concentrada em duas bactérias: *Alcaligenes eutrophus* e *Pseudomonas oleovorans*.

#### 2.4.3.1.1 PHA produzidos por *Alcaligenes eutrophus*

Um mutante de *A. eutrophus*, que utiliza glucose como fonte de carbono, acumula até 80% (p/p) de PHB (HOLMES, 1985). Quando se incluiu ácido propiônico no meio, foi produzido um copolímero randômico contendo unidades mononéricas de 3HB e 3HV. O conteúdo de 3HV do PHA era dependente da proporção de ácido propiônico para glucose no meio, durante o estágio de acúmulo do polímero, e foram descritas condições sob as quais a bactéria acumula 70% (p/p) do polímero contendo 33 mol% de monômeros de 3HV. Tendo o ácido propiônico como única fonte de carbono, foi alcançado um conteúdo de 43 mol% de 3HV, mas o conteúdo total do polímero na bactéria foi relativamente mais baixo, 35% (p/p) (ANDERSON & DAWES, 1990).

O ácido butírico, como substrato combinado à glucose, produz apenas PHB (ANDERSON & DAWES, 1990). Um copolímero contendo 90 mol% de unidades de HV pode ser produzido por *A. eutrophus* com ácido valérico (pentanóico) como única fonte de carbono, e como um co-substrato com glucose, este composto produz um PHA contendo uma maior

proporção de 3HV do que o obtido sob condições comparáveis com glucose e ácido propiônico (DOI, TAMAKI et al., 1987; HAYWOOD, ANDERSON et al., 1989a)

Além do acúmulo de poliésteres de 3-hidróxiácidos com C<sub>4</sub> e C<sub>5</sub>, *A. eutrophus* também é capaz de produzir PHA contendo monômeros de 4-hidróxibutirato e 5-hidróxivalerato; DOI e seus colegas demonstraram que estes monômeros são incorporados em copolímeros e terpolímeros quando se fornece fontes de carbono únicas ou misturas (DOI, TAMAKI et al., 1987). A composição de tais poliésters é determinada pelas concentrações relativas das fontes de carbono disponíveis durante o acúmulo do polímero, e estas unidades monoméricas são em cada caso, derivadas a partir de um substrato que tenha o mesmo comprimento de cadeia carbônica.

#### 1.4.3.1.2 PHA produzidos por *Pseudomonas oleovorans*

De Smet e seus colegas observaram a presença de grânulos intracelulares constituídos de poli(3-hidróxioctanoato) em *P. oleovorans* ATCC 29347 quando crescidas em duas fases contendo 59% (v/v) de n-octano (SMET, EGGINK et al., 1983). Mais tarde, LAGEEVEN, HUISMAN et al. (1988) estenderam seu estudo e demonstraram o acúmulo de polímeros contendo dois ou mais 3-hidróxiácidos a partir de n-alcanos (C<sub>8</sub> a C<sub>12</sub>) como única fonte de carbono, sendo que os maiores rendimentos foram obtidos a partir de alcanos de C<sub>8</sub> a C<sub>10</sub>. Quando o organismo foi suprido com octeno-1, o 3-hidróxi-7-octenoato foi incorporado como principal unidade monomérica, apesar de que uma quantidade substancial de 3-hidróxioctanoato também estivesse presente no PHA. Os poliésteres contendo unidades monoméricas insaturadas também foram produzidos com noneno-1 e deceno-1 como principais fontes de carbono. Esta cepa de *P. oleovorans* também produz representativas quantidades de PHA a partir de ácidos n-alcanóicos e de n-álcoois de C<sub>8</sub> a C<sub>10</sub> (HAYWOOD, ANDERSON et al., 1989b; GROSS, MELLO et al., 1989; BRANDAL, GROSS et al., 1988).

O comprimento da cadeia carbônica do substrato determina a série de unidades monoméricas incorporadas no PHA, com o 3-hidroxiácido possuindo o mesmo comprimento da cadeia carbônica do substrato ou, sendo pelo menos o principal componente do polímero em todos os casos. É evidente, a partir da incorporação de proporções significativas de outros 3-hidroxiácidos, que diferem do comprimento da cadeia do substrato carbônico, por duas unidades carbônicas, que a remoção ou adição de unidades C<sub>2</sub> estão envolvidas na biossíntese de PHA por *P. oleovorans*. (HAYWOOD, ANDERSON et al., 1989b).

#### 1.4.3.1.3 PHA produzidos por outras espécies de *Pseudomonas*

O acúmulo de PHA a partir de ácidos n-alcanóicos não é restrito a *P. oleovorans*. HAYWOOD, ANDERSON (1989b) examinaram várias espécies de *Pseudomonas*, avaliando o crescimento e acúmulo de poliéster com alcanos de cadeia reta, álcoois e ácidos alcanóicos de C<sub>6</sub> a C<sub>10</sub> como única fonte de carbono. O acúmulo de poliéster foi demonstrado em *P. aeruginosa* (três cepas), *P. putida*, *P. fluorescens*, e *P. testosteroni*; e em cada caso, a série de substratos que sustentaram a síntese de PHA foi diferente e também diferiu daquela da *P.oleovorans*. O modelo de acúmulo de PHA nas *Pseudomonas* são similares a de *P. oleovorans*, pois os 3-hidroxiácidos possuem o mesmo comprimento da cadeia carbônica do substrato ou diferem por unidades múltiplas de dois carbonos são as principais unidades monoméricas encontradas nos poliésteres, e nenhum monomônero de 3HB (característica de PHB) está presente no polímero.

#### 1.4.3.2 Vias e Enzimologia da Biossíntese de PHA

### 1.4.3.2.1 Investigação das vias

Em 1973, foi estabelecida uma via cíclica para a síntese e degradação de PHB em *Azotobacter beijerinckii* e *Alcaligenes eutrophus* (SENIOR & DAWES, 1973; OEDING & SCHLEGEL, 1973) (vide figura 12). A rota biossintética para a síntese de PHB a partir de glucose, e substratos que fornecem acetil-CoA, nestes e em outros organismos envolve a ação sequencial de três enzimas: 3-cetotiolase, acetoacetil-CoA redutase NADPH-dependente e PHB sintase (polimerase) que catalisam respectivamente as reações abaixo (DAWES, 1991):

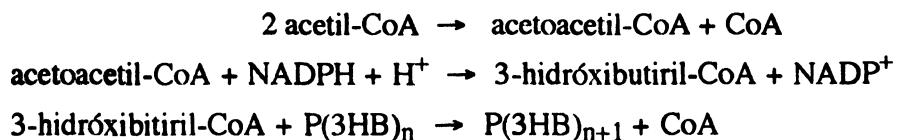


Figura 12 - Interrelação do ciclo do ácido tricarboxílico e ciclo metabólico do PHB, e seu controle, em *A. beijerinckii* e *A. eutrophus*; (Dawes, 1991)

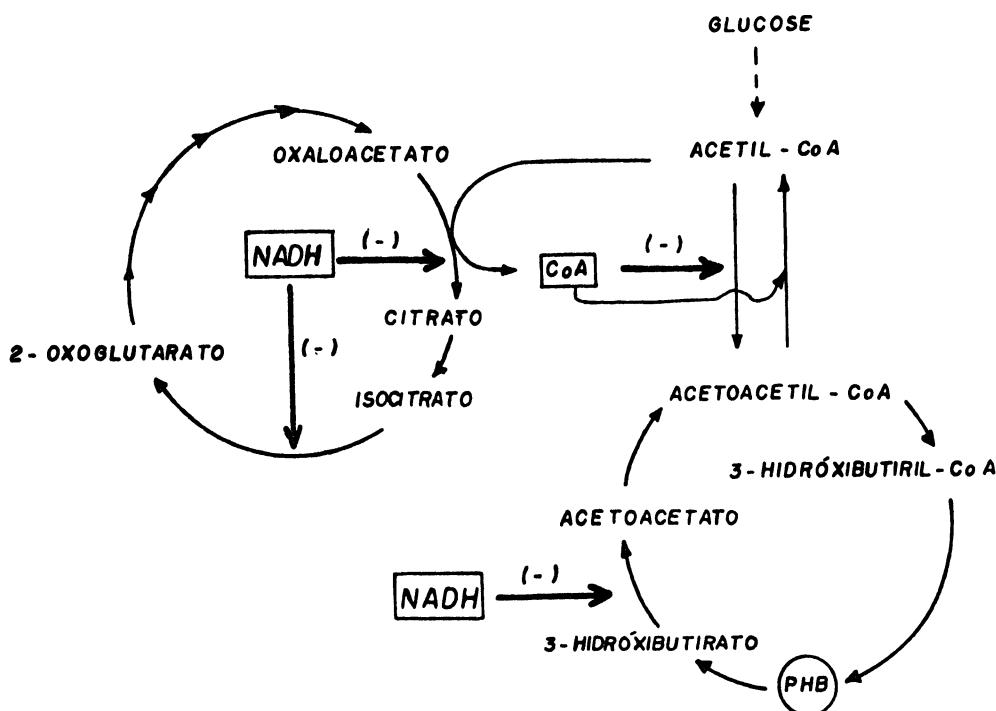


Figura retirada da referência Dawes, 1991

Uma variação desta via ocorre em *Rhodospirillum rubrum* envolvendo duas enzimas adicionais, enoil-CoA hidratase estereoespecífica, que convertem S-3-hidróxiacil-CoA (formado neste organismo pela ação de uma acetoacetil-CoA redutase NADH-dependente) para o enantiômero R, requerido para a atividade da PHA sintase (MOSKOWITZ & MERRICK, 1969).

Também são conhecidas duas outras vias para a síntese de PHA em *Pseudomonas*. Organismos do grupo I de homologia do RNAr sintetizam poliésteres constituídos por 3-hidróxi-alcanoatos de cadeia média derivados a partir de intermediários acil-CoA da beta-oxidação de alkanos, ácidos alcanoicos e alcanoís (SMET, EGGINK et al., 1983; BRANDAL, GROSS et al., 1988; HUISMAN, LEEUW et al., 1989; HAYWOOD, ANDERSON et al., 1989a). Com exceção de *P. oleovorans*, quase todos estes organismos possuem uma outra via que habilita a síntese de poliésters de cadeia média a partir de acetil-CoA, e.g. *Pseudomonas aeruginosa*, quando crescida num carboidrato tal como gluconato, acumula um polímero composto principalmente de 3-hidróxidecanoato (PHD) (HAYWOOD, ANDERSON et al., 1990; TIMM & STEINBÜCHEL, 1990).

A bactéria fotossintética *Rhodospirillum rubrum*, apresenta um outro modelo para o acúmulo de PHA, produzindo poliésters que contêm hidróxi-ácidos de C<sub>4</sub> a C<sub>6</sub> a partir de uma série ácidos alcanoicos de C<sub>2</sub> a C<sub>10</sub> (vide figura 13). Terpoliésteres que contêm estes hidróxi-ácidos foram obtidos de substratos com C<sub>6</sub>, C<sub>7</sub> e C<sub>10</sub>. Os substratos de cadeias mais curtas produziram poliésters contendo 3-hidróxi-ácidos de C<sub>4</sub> e/ou C<sub>5</sub>, mas menos do que um por cento da unidade monomérica C<sub>6</sub> (BRANDAL, KNEE JR et al., 1989).

Figura 13 - Propostas das vias de biossíntese de PHA e PHB a partir de alcanos, ác. alcanoicos e alcanoís

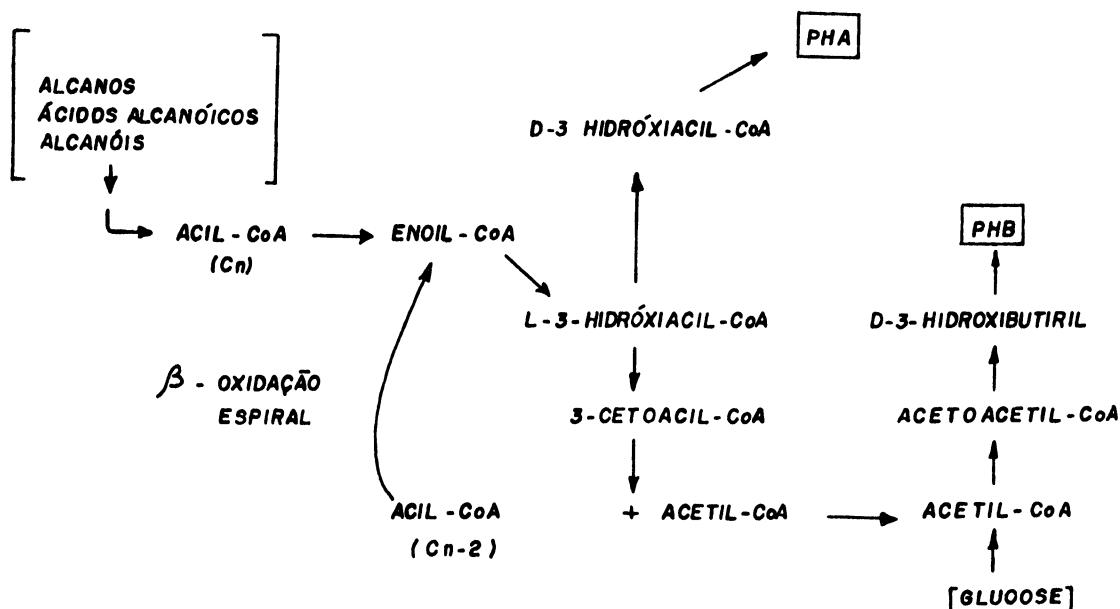


Figura retirada da referência Dawes, 1991.

#### 1.4.3.2.2 Etapas da síntese de PHA

A 3-cetoliase é a enzima controladora para síntese de PHB, tendo a CoA como chave moduladora (OEDING & SCHLEGEL, 1973; SENIOR & DAWES, 1973). Existem duas isoenzimas com especificidades predominantemente para 3-cetoacil-CoAs de C4 e C5 e para substratos de C4 a C10, respectivamente. A primeira é considerada como uma enzima biossintética e a última como uma enzima degradativa, envolvida principalmente no metabolismo de ácidos graxos; embora ambas possam, de fato, funcionar na síntese de PHB em *A. eutrophus* (HAYWOOD, ANDERSON et al., 1988)

Isoenzimas de acetoacetil-CoA redutase, possuindo diferentes especificidades para substrato e coenzimas, também existem em *Zoogloea ramigera* e *A. eutrophus*. Apenas a enzima NADPH-específica que atua sobre os substratos R-C<sub>4</sub> a C<sub>6</sub> na síntese de PHB em *A.*

*eutrophus*; a enzima NADH é específica para os S-substratos e portanto não pode funcionar diretamente na formação de PHB.

A PHB sintase está associada com os grânulos de bactérias sintetizadoras do polímero e a sua solubilização na forma nativa tem se mostrado difícil (LIEBERGESELL, SCHIMIDT et al., 1992). Todavia, foram encontradas formas solúveis da enzima em *Z. ramigera* e *A. eutrophus*. (FUKUI, YOSHIMOTO et al., 1976; HAYWOOD, ANDERSON et al., 1989a). HAYWOOD, ANDERSON et al. (1989a) demonstraram que a localização da sintase é dependente das condições prevalescentes de crescimento: os organismos que não estão sintetizando PHB ou que estão crescendo em cultivo contínuo limitado em carbono, contêm principalmente a forma solúvel. Com a transferência para limitação de nitrogênio começa o acúmulo de PHB, acompanhado por um rápido desaparecimento da forma solúvel da sintase e o aparecimento da enzima associada ao grânulo. Ambas as formas da enzima foram parcialmente purificadas, mas se mostraram altamente instáveis quanto mais purificados for.

A PHB sintase de *A. eutrophus* é específica por R-enantiômeros e apresenta atividade apenas com 3-hidróxi-acil-CoAs de C<sub>4</sub> e C<sub>5</sub>. Embora a descoberta de que este organismo pode incorporar 4-hidróxibutirato e 5-hidróxivalerato no polímero pareça necessitar de uma sintase adicional para que isso ocorra (DOI, TAMAKI et al., 1987). Estas observações correlacionam com o fato de que as composições do poliéster em *A. eutrophus* são limitadas a hidróxi-ácidos de C<sub>4</sub> e C<sub>5</sub> (DOI, SEGAWA et al., 1990).

O mecanismo de ação da PHB sintase permanece um desafio atual. GRIEBEL & MERRICK (1971) propuseram uma reação de polimerização em dois estágios, envolvendo uma acil-S-enzima intermediária; enquanto que BALLARD, HOLMES et al. (1987) propuseram um modelo envolvendo dois grupos tióis e um estado de transição de quatro membros. Supõe-se que a função de transferência da cadeia, realizada pela sintase, deva controlar de algum modo o peso molecular do polímero produzido, que é característico de um dado organismo.

A descoberta mais surpreendente foi que certas *Pseudomonas* produzem PHA de substratos quimicamente não relacionados, e.g. a síntese de polímero contendo principalmente

3-hidróxidecanoato (3HD) a partir de gluconato, glucose, frutose, glicerol, lactato ou acetato como única fonte de carbono (HAYWOOD, ANDERSON et al., 1990). Esta capacidade foi demonstrada como sendo característica de muitas cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e certas outras espécies do mesmo gênero. As vias biossintéticas envolvidas estão sob investigação, e parece que os precursores dos polímeros sejam derivados de reações envolvidas na síntese de ácidos graxos (TIMM & STEINBÜCHEL, 1990).

#### 1.4.3.3 Regulação da Biossíntese de PHA

O PHB e a maioria dos outros PHA são sintetizados e acumulados na célula se a fonte de carbono é fornecida em excesso, mas a proliferação de células é diminuída devido à falta de um nutriente essencial para o crescimento, tal como nitrogênio, fósforo, ferro, magnésio ou potássio. Em muitas bactérias aeróbicas, a síntese de PHB também é desencadeada se o crescimento máximo não pode ocorrer devido à limitada disponibilidade de oxigênio. Em algumas bactérias, tal como *Azotobacter vinelandii*, o acúmulo de PHB ocorre numa extensão ainda maior durante limitação de oxigênio do que, por exemplo, durante limitação de nitrogênio (BRIVONESE & SUTHERLAND, 1989). Como as vias biossintéticas de PHA para *A. eutrophus* e *R. rubrum* incluem a redução de acetoacetil-CoA (piridina nucleotídeo-dependente), PHB é um reservatório para equivalente redutores e o polímero pode ser considerado como um produto de fermentação. Em contraste, a deficiência de oxigênio exerce um efeito negativo sobre o acúmulo de PHA em bactérias como *P. oleovorans* e *P. aeruginosa*, ou porque estas vias biossintéticas de PHA incluem a formação de equivalentes redutores ou energia na forma de ATP é consumida (STEINBÜCHEL, 1991).

Nas bactérias que sintetizam PHB a partir de glucose via acetil-CoA, a 3-cetoliase é a enzima biossintética regulatória chave, modulada pela concentração intracelular de CoA. A característica chave do controle é o destino de acetil-CoA, que pode ser oxidado via ciclo do

ácido tricarboxílico (TCA) ou servir como substrato para a síntese de PHB; o desvio depende das condições ambientais, especialmente limitação de oxigênio, ou pela suspensão da síntese proteica causada por limitação de nitrogênio ou de outro nutriente, quando a razão NADH/NAD aumenta. A citrato sintase e a isocitrato desidrogenase são inibidas por NADH, em consequência, acetil-CoA não entra mais no TCA com a mesma velocidade e, em vez disso, é convertido a acetoacetil-CoA pela 3-cetotiolase, a primeira enzima da via biossintética de PHB, que é inibida por CoA. A suspensão da síntese proteica, um processo endergônico intimamente acoplado a geração de ATP via cadeia transportadora de elétrons, provavelmente conduziria a um aumento na concentração intracelular de NAD(P)H (SENIOR & DAWES, 1973; JACKSON & DAWES, 1976).

A 3-cetotiolase não está envolvida na regulação da biossíntese de PHB quando os substratos não são metabolizados via acetil-CoA. A adição de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a suspensões de *A. eutrophus*, limitados em nitrogênio acumulando PHB, inibe a biossíntese do polímero a partir de glucose mas não a partir de ácido butírico que é convertido a 3-hidróxibutiril-CoA e incorporado diretamente (DOI, TAMAKI et al., 1988). O acúmulo de PHA por *P. oleovorans* a partir de n-alcanos e ácidos n-alcanóicos, sob condições de crescimento aparentemente não restritas, sugere que pode não ocorrer um controle efetivo da síntese do polímero durante o crescimento exponencial neste organismo (LAGEEVEN, HUISMAN et al., 1988; GROSS, MELLO et al., 1989). Porém, é necessário pesquisa adicional para elucidar a regulação da síntese de PHA a partir de substratos não carboidratos.

A síntese e degradação simultânea de PHA foi demonstrada com suspensões de *A. eutrophus* livres de nitrogênio (STEINBÜCHEL, 1991). Quando bactérias contendo 55% (p/p) de PHB (derivado de ácido butírico como substrato) foram incubadas com ácido valérico, a composição bruta do poliéster acumulado em função do tempo, aumentou o conteúdo de 3HV de 0 para 49 mol% após 96h, enquanto que o conteúdo total de PHA, depois de uma diminuição inicial, mostrou pouca mudança em 52% (p/p). No experimento inverso, bactérias contendo 50% (p/p) de PHA (copolímero de 3HB-3HV, derivado a partir de ácido valérico

como substrato) foram incubadas com ácido butírico por 48h; durante este tempo o conteúdo de 3HB do polímero subiu de 44 para 81 mol%. O conteúdo total do polímero, depois de um aumento transiente para 66%, permaneceu em 50%.

Em contraste, nenhuma evidência foi obtida para o "turnover" de PHB em células de *A. eutrophus* quando estas foram crescidas com glucose em cultivo contínuo sob condições de limitação de nitrogênio em estado de equilíbrio (HAYWOOD, ANDERSON et al., 1989a).

#### 1.4.3.4 Genética da Biossíntese de PHB e PHA

Os genes estruturais para a via biossintética de PHB em *A. eutrophus* foram clonados e expressados em *Escherichia coli* por três grupos independentes (SLATER, VOIGE et al., 1988; SCHUBERT, STEINBÜCHEL et al., 1988; PEOPLES & SINSKEY, 1989a; PEOPLES & SINSKEY, 1989b). Os genes estão agrupados, são organizados em um operon, quando sequenciados, mostrou-se que são transcritos na ordem *phb C* (sintase), *phb A* (tiolase), *phb B* (redutase) (PEOPLES & SINSKEY, 1989b; STEINBÜCHEL, SCHUBERT et al., 1990; JANES, HOLLAR et al., 1990).

A análise molecular do operon biossintético de PHB permitiu a identificação *N*-terminal da sintase, e também revelou o promotor e o sítio de início traducional do gen *phb C* de *A. eutrophus* (SCHUBERT, KRUGER et al., 1991). Contudo, a expressão do gen *phb C* sozinho em *E. coli* não produz PHB nem níveis significantes de atividade da PHB sintase (PEOPLES & SINSKEY, 1989b).

Os genes biossintéticos para PHB em *A. eutrophus* foram expressados em *Pseudomonas oleovorans*; a cepa recombinante resultante sintetizou uma mistura de PHB e poli-hidróxi-octanoato (STEINBÜCHEL & SCHUBERT, 1989; STEINBÜCHEL, SCHUBERT et al., 1990). Mais recentemente, os genes biossintéticos para PHB em *A. eutrophus* também foram expressados em *E. coli* e cepas de *Kebsiella*, as cepas

recombinantes resultantes produziram PHA utilizando a sacarose como fonte de carbono (ZHANG, OBIAS et al., 1994).

Investigações do lócus da PHA sintase de *P. oleovorans* evidenciaram a presença de dois gens para a PHA sintase, com gen para a PHA despolimerase localizado entre eles. Quando os gens para a sintase foram introduzidos em alto número de cópias, o resultante aumento no nível de PHA sintase permitiu o alongamento mais rápido da cadeia, mas não um aumentado no acúmulo do polímero; indicando que outros fatores, ainda desconhecidos, estão envolvidos no controle ou limitação da produção total de PHA (WITHOLT, HUISMAN et al., 1990; PEOPLES & SINSKEY, 1990).

#### 1.4.3.5 Degradação de PHB e PHA

Ao contrário dos intensivos estudos sobre a biossíntese de PHA, relativamente pouco é conhecido sobre a degradação destes polímeros. Todas as bactérias nas quais o PHA ocorre naturalmente, provavelmente possuirão um sistema de enzimas que, sob certas condições, mobilize intracelularmente o PHA. Estas despolimerases intracelulares são diferentes das enzimas de microrganismos que usam PHA exógeno no ambiente como a única fonte de carbono para o crescimento. As enzimas que degradam PHA exógeno não são sintetizadas apenas por bactérias mas também por fungos, e são excretadas pelas células para hidrolisar o PHA extracelularmente. Posteriormente, as células usam os produtos de hidrólise (STEINBÜCHEL, 1991). Tem havido um aumento de interesse na degradação extracelular destes polímeros, estimulado por suas explorações comerciais como plásticos biodegradáveis ("environmentally-friendly plastics") (STEINBÜCHEL, 1991).

#### 1.4.3.5.1 Degradação intracelular de PHB

A degradação de PHB normalmente começa quando a fonte de carbono exógena disponível torna-se muito limitada ou é esgotada. Dois diferentes tipos de PHB despolimerase foram reconhecidas em *Rhodospirillum rubrum* e *Bacillus megaterium*, tendo R-3-hidróxibutirato como produto das reações (DAWES & SENIOR, 1973). Os grânulos nativos de *R. rubrum* são auto-hidrolisados enquanto aqueles de *B. megaterium* são bastante estáveis. Embora um extrato solúvel de *R. rubrum* fosse capaz de degradar grânulos nativos de *B. megaterium*; o polímero purificado ou grânulos desnaturados não puderam servir como substrato. Uma proteína ativadora solúvel isolada de extratos de *R. rubrum*, em presença de despolimerase, ativou a hidrólise de PHB, produzindo R-3-hidróxibutirato como principal produto junto com algum éster dimérico (DAWES & SENIOR, 1973).

A PHB despolimerase de *A. eutrophus* produziu R-3HB como único produto de hidrólise, enquanto que a enzima solúvel de *B. megaterium* resultou na mistura de dímero e monômero. Um estudo detalhado do sistema de *B. megaterium* revelou que a despolimerização requeria um fator termo sensível associado com os grânulos junto com três componentes solúveis: um ativador proteico termoestável, PHB despolimerase e uma hidrolase.

Foi concluído que embora a despolimerase não esteja ligada ao grânulo, existe uma proteína associada ao grânulo que inibe a atividade despolimerase (GRIEBEL, SMITH et al., 1968). Embora seja assumido que a interação entre inibição e ativação controla a degradação de PHB, o mecanismo detalhado espera por elucidação e não tem havido relatos das despolimerases atuando em heteropolímeros contendo 3-hidróxi-ácidos de cadeia média.

#### 1.4.3.5.2 Degradação extracelular de PHA

A produção de hidrolases extracelulares para PHA é normalmente demonstrada por zonas de clareamento envolvendo colônias em agar meio mineral que contém PHA como única fonte de carbono. Um método de degradação alternativo é incubar solutos contendo a despolimerase com finos filmes do poliéster e acompanhar sua dissolução e erosão. A degradação de PHB parece ocorrer em dois passos. Primeiro, uma PHB despolimerase libera oligômeros, que são preferencialmente dímeros de 3HB. Segundo, uma oligômero hidrolase cliva o dímero em monômeros de 3HB (BRIESE, JENDROSSEK et al., 1994; MERGAERT, WEBB et al., 1993; STEINBÜCHEL, 1991)

#### 1.4.3.6 Funções Fisiológicas de PHB e outros PHA

##### 1.4.3.6.1 Reservas de carbono e energia

Para um organismo, uma das principais vantagens resultantes da síntese destes materiais de alto peso molecular, contidos em uns 8 a 12 grânulos por célula, é a capacidade de estocar grandes quantidades de carbono reduzido sem afetar显著mente a pressão osmótica da célula. A posse de PHA freqüentemente, mas não universalmente, retarda a degradação de componentes celulares tais como proteína e RNA durante a fome nutricional, embora não exista um modelo comum de comportamento e, dependendo da bactéria, pode haver uma utilização seqüencial ou simultânea destas macromoléculas. O PHB aumenta a sobrevivência de algumas, mas não de todas as bactérias investigadas. Também serve como uma fonte de carbono e energia para a esporulação em algumas espécies de *Bacillus*, ainda que seu acúmulo não seja fundamental para o processo. Da mesma forma, PHB pode servir como

uma fonte de carbono e energia para o encistamento de *Azotobacter*. Também tem sido proposto que PHB proporciona um substrato oxidável para fornecer proteção respiratória à nitrogenase de *Azotobacter* quando substrato exógeno adequado não é imediatamente disponível para oxidação (SENIOR & DAWES, 1971). Um papel similar para PHB foi formulado para a cepa de *Rhizobium* sp. ORS 571 (STAM, VERSEVELD et al., 1986).

Embora ainda não tenha havido quaisquer estudos relatando as características de sobrevivência de bactérias possuindo outros PHA do que PHB, foi notado que PHA é degradado quando a fonte de carbono externa é esgotada, podendo ser deduzido que eles também podem ser utilizados como reservas de carbono e energia. Parece provável que, para a maioria das bactérias que crescem em seus ambientes naturais, a proporção de PHA relativo a PHB é bastante baixa, e seus papéis seriam por conseguinte menores (KNEE JR, WOLF et al., 1990).

#### 1.4.3.6.2 PHB na fixação de nitrogênio simbiótica

O PHB serve como fonte energia no processo de fixação de nitrogênio simbiótica que ocorre entre *Rhizobium* e/ou *Bradyrhizobium* e plantas leguminosas (KAAR, WATERS et al., 1984; MCDERMOTT, GRIFFTH et al., 1989). A energia requerida para a fixação de nitrogênio por bacteróides é largamente alcançada pelo metabolismo de compostos fotossintéticos transportados pelos nódulos da raiz. Os bacteróides acumulam até 50% de sua biomassa em PHB apesar do fato que tanto a fixação de nitrogênio quanto a síntese de PHB competem pela disponibilidade de equivalentes redutores. Foi sugerido que, como em *Azotobacter beijerinckii*, o acúmulo de PHB cumpre um papel regulatório redox (SENIOR, BEECH et al., 1972; MCDERMOTT, GRIFFTH et al., 1989).

#### 1.4.3.6.3 PHB em membranas procarióticas e eucarióticas

Um progresso na bioquímica foi a descoberta da presença de dois polímeros de armazenamento, PHB e polifosfatos, em associação, com as membranas plasmáticas de algumas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (REUSCH & SADOFF, 1983), e em fragmentos de membranas eucarióticas (REUSCH, 1989). Como estes complexos atravessam a membrana, foi sugerido que eles podem desempenhar um papel na regulação das concentrações de cálcio intracelular e na sinalização de cálcio (REUSCH, 1989).

REUSCH & SADOFF (1983) relataram primeiro a presença de PHB nas membranas citoplasmáticas de *Azotobacter vinelandii*, *Bacillus subtilis* e *Haemophilus influenzae*, três bactérias que sofrem transformação natural, mas que diferem estrutural e metabolicamente. Embora *A. vinelandii* sintetise quantidades representativas de PHB em grânulos citoplasmáticos, o *B. subtilis* acumula significativamente menos polímero, e o *H. influenzae* não acumula nada. Porém, dentro de cada espécie, as concentrações de PHB em suas membranas estavam correlacionadas com sua transformabilidade (REUSCH, HISKE et al., 1987).

Foram apresentadas evidências de que para *A. vinelandii* e *B. subtilis* o PHB de membrana existe como um gel lável. Foi levantada a hipótese de que a síntese de PHB seja um pré-requisito para o transporte de DNA exógeno através da membrana, i.e. a aquisição de competência genética (REUSCH & SADOFF, 1983; REUSCH, HISKE et al., 1986).

O desenvolvimento de competência dependente de cálcio em *E. coli* foi associada com síntese *de novo* e incorporação de PHB na membrana plasmática, acompanhado por modificação da estrutura em bicamada, como indicado por uma aguda transição irreversível da nova fase lipídica em aproximadamente 56°C (REUSCH, HISKE et al., 1986). Foi possível extrair um complexo de PHB das membranas plasmáticas de *E. coli* geneticamente competente, e a análise dos extratos de clorofórmio revelou a presença de PHB, fosfato inorgânico e fons cálcio na razão molar de aproximadamente 1 : 1 : 0.5. O complexo teve

integridade estrutural suficiente para permitir a sua incorporação em liposomos (REUSCH & SADOFF, 1988).

Um modelo de estrutura foi proposto para o complexo, que poderia funcionar como um canal transmembrana (REUSCH & SADOFF, 1988; REUSCH, 1989). Uma camada lipofílica externa, compreendendo um cilindro helicoidal de PHB com quatorze unidades do monômero por volta. Apenas estas configurações particulares fornecem a geometria adequada para acomodar  $\text{Ca}^{2+}$  no complexo. Os íons  $\text{Ca}^{2+}$  (3,5 por unidade) ligam os dois polímeros, sendo cada íon ligado a quatro fosforil-oxigênio e quatro oxigênios do ester PHB. Esta suposta estrutura tem um diâmetro de 240 nm com um comprimento médio de 450 nm. Além de sua importância como estoque de cálcio, sugere-se que o complexo transmembrana funcione no transporte de cálcio, fosfato e DNA (REUSCH & SADOFF, 1988). Por exemplo, a exportação de  $\text{Ca}^{2+}$  e fosfato poderia ser afetada pelo alongamento da cadeia polifosfato na interface citoplasmática pela ação da polifosfato quinase, de acordo com a atividade polifosfatase na face citoplasmática na face periplasmática. Também, a importação de  $\text{Ca}^{2+}$  poderia ser proveniente de mudanças no potencial de membrana ou nos gradientes de concentração.

REUSCH (1989) obteve evidência de que existem complexos similares nas membranas eucarióticas, derrubando a crença de que PHB seja uma característica exclusiva de procariotos.

#### 1.4.3.7 Propriedades Físicas e Significância Comercial de PHA

Os PHA são polímeros parcialmente cristalinos, e a definição de suas propriedades térmicas e mecânicas é expressa normalmente em termos da temperatura de transição vidro-para-borracha ( $T_g$  - "glass transition") da fase amorfia, e da temperatura de fusão ( $T_m$  - "melting temperature") da fase cristalina. Calorimetria de varredura diferencial é usada para estas

determinações. Amostras de PHB comumente exibem um grau de cristalinidade na faixa de 60 a 80%, que diminui para 30 a 40% quando o conteúdo de 3HV do poli(3HB-co-3HV) aumenta para 30 mol% (MITOMO, BARHAM et al., 1987).

Marchessault e colegas mostraram que PHB é uma hélice em sentido horário compacta com eixo de duas voltas e uma repetição de fibra de 0,596 nm (OKAMURA & MARCHESSAULT, 1967; CORNIBERT & MARCHSSAULT, 1972). É oticamente ativo, com o centro quiral da unidade monomérica sempre em configuração R absoluta (D-(-) na nomenclatura tradicional). A similaridade da estrutura do PHB com àquela do polipropileno, que também tem uma configuração compacta e um ponto de fusão próximo de 180°C, atraiu a atenção da Imperial Chemical Industries (ICI) ao potencial do PHB para aplicações em fibras e plásticos (ANDERSON & DAWES, 1990), particularmente no campo biomédico, onde a biocompatibilidade e biodegradabilidade são características importantes (GOGOLEWSKI, JOVANOVIC et al., 1993; BOEREE, DOVE et al., 1993). PHB e polipropileno apresentam graus de cristalinidade e  $T_g$  semelhantes, embora suas propriedades químicas sejam completamente diferentes, com o PHB possuindo resistência inferior a solventes mas melhor resistência aos raios ultra violeta ambientais. Fisicamente, PHB é mais rígido e mais quebradiço do que o polipropileno (HOLMES, 1985).

Porém, quando ocorre a formação do copolímero com unidades monoméricas de 3HB e 3HV, as propriedades do material (Biopol; ICI) são alteradas como uma consequência da diminuição da cristalinidade e  $T_m$ . Isto resulta, em termos mecânicos, numa diminuição na rigidez (módulo de Young) e num aumento na dureza, produzindo propriedades mais desejáveis para aplicações comerciais. Consequentemente, uma série de propriedades são possíveis a partir de um homopolímero rígido e quebradiço via um balanço de rigidez e dureza para macio e resistente, com alta incorporação de 3HV. Contudo, este tipo de polímero, o Biopol não é um material especialmente engenhado para aplicações mecânicas de alto desempenho (HOLMES, 1985).

Embora as propriedades do PHB enquanto um material termoplástico biodegradável tenham chamado a atenção por mais de 20 anos, e patentes foram depositadas inicialmente nos Estados Unidos pela W. R. Grace & Co (BAPTIST, 1962; BAPTIST & WEBER, 1965), a primeira produção industrial de PHB e PHA não ocorreu até 1982, quando a ICI comercializou os sob a marca registrada de Biopol (ANDERSON & DAWES, 1990).

Ainda que PHB e PHA também estejam à disposição a partir de síntese química, no momento apenas os processos biotecnológicos produzem-nos em quantidade suficiente para aplicações técnicas.

Póli(3HB-co-3HV) é produzido pela ICI em escala industrial a partir de um mutante da cepa de *Alcaligenes eutrophus* H16 tendo uma mistura de glucose e ácido propiônico como única fonte de carbono sob condições de limitação de fósforo (BYRON, 1990) O copolímero já está sendo usado para a fabricação de filmes biodegradáveis e frascos (Brandal & Püchner, 1990). Frascos para xampu feitos de Biopol já podem ser encontradas em teste de mercado na Alemanha (BRANDAL & PÜCHNER, 1990)

PHB e póli-(3HB-co-3HV) são atóxicos e biodegradáveis, dando horizonte a várias aplicações dos polímeros para a liberação controlada de drogas, tal como a liberação de buserelina. Outras aplicações médicas possíveis são como suturas cirúrgicas, "swabs" cirúrgicos, proteção para feridas ou lubrificantes para luvas cirúrgicas. Como os PHA são oticamente ativos, os monômeros derivados dos poliésters são considerados como uma fonte para a síntese de produtos químicos enantioméricos puros. Além disso, os PHA foram testados como fontes de carbono em processos de desnitrificação para a eliminação de nitrato de água potável (STEINBÜCHEL, 1991).

## OBJETIVOS

Determinar as concentrações iniciais de carbono, nitrogênio e magnésio que restringem o crescimento das cepas de *Enterobacter aerogenes* tipo 8 e *Alcaligenes* sp (ATCC 31961 e mut), em cultivo em batelada ("batch culture");

Estudar a produção de exopolissacarídeo e polímero de reserva em cepas isogênicas de *Enterobacter aerogenes* tipo 8 e *Alcaligenes* sp (ATCC 31961 e mut), em "batch culture" em meios de cultura sintético e semi-sintético sob diferentes razões iniciais de C:N;

Determinar se a fonte de carbono foi preferencialmente usada para a síntese de exopolissacarídeo ou polímero de reserva (glicogênio e PHB para *Enterobacter* e *Alcaligenes*, respectivamente), e se a degradação do polímero de reserva, após o esgotamento da fonte de carbono externa, poderia favorecer posterior produção de exopolissacarídeo;

Avaliar as melhores condições para a produção do exopolissacarídeo pelas cepas acima listadas;

Avaliar o comportamento reológico (viscosidade) dos meios de cultura e das soluções preparadas a partir dos exopolissacarídeos isolados;

Investigar a natureza de compostos provenientes de plantas, tais como *Camellia* (chá comercial), *Paulinia* (guaraná), *Coffea* (sementes cruas de café) *Theobroma* (cacao), *Kola* ou

*Sterculia* (semente de cola) e *Ilex* (chá-mate) e seus possíveis papéis como efetor(es) positivo(s) na síntese de celulose por *Acetobacter xylinum*..

Realizar a caracterização parcial do biofilme celulósico, produzido por uma cepa tipo selvagem com propriedades morfológicas, fisiológicas e bioquímicas de um *Acetobacter* sp;

Relatar algumas das aplicações médicas da película celulósica (BioFill®), na terapia de injúrias da pele.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 MATERIAIS

a) Todos os reagentes empregados foram considerados quimicamente puros, isto é, produtos P.A., adquiridos da Sigma Chemical, British Drug House Ltd (BDH), Oxoid, Disco Technical e Merck;

b) As enzimas foram adquiridas da Sigma Chemical, Boehringer Mannheim e Novo Nordisk do Brasil;

c) Os microrganismos utilizados foram:

*Enterobacter aerogenes* A4.87SI, (EPS<sup>+</sup>);

*Enterobacter aerogenes* A4.O31, (EPS<sup>-</sup>);

*Alcaligenes* sp ATCC 31961, (EPS<sup>+</sup>);

*Alcaligenes* sp 31961M (EPS<sup>-</sup>), mantidos liofilizados pelo Banco de Cepas do Departamento de Microbiologia da Universidade de Edinburgh (Escócia), e gentilmente fornecidos pelo Prof. Dr. Ian W. Sutherland;

*Acetobacter* sp, uma cepa tipo selvagem, isolada por L.F.X. Farah, gentilmente fornecida pela empresa Bio Fill Produtos Biotecnológicos S.A. e denominada cepa "BF"

*Acetobacter* sp, uma cepa tipo selvagem, isolada por J.D. Fontana e denominada cepa "JF"

*Acetobacter xylinum* 10245 (= D1), 23769 (= D2), 821 (= D3) e B42/2 Nich 1 (= D4), gentilmente fornecidos por M. Dankert (Argentina)

*Acetobacter xylinum* NRRC 207 e NRRL 17005, gentilmente fornecidos por R. Tanner (USDA)

d) As plantas empregadas foram:

*Ilex paraguayensis*, *Kola nitida*, *Coffea arabica*, *Theobroma cacao*, *Camellia sinensis* e *Paulinia cupana*.

## 2.2 MÉTODOS ANALÍTICOS

### 2.2.1 Determinação de carboidratos

#### 2.2.1.1 Determinação da glucose residual

Um ensaio de enzimas associadas, envolvendo glucose oxidase e peroxidase foi empregado para medir a concentração da glucose residual nos sobrenadantes dos cultivos, tendo o ácido sulfônico 2,2'-di-azino-3-etil benziltiazolina (ADTS) como cromógeno. (BRIVONESE & SUTHERLAND, 1989)

760  $\mu$ l do sistema de incubação contendo: 450  $\mu$ l de tampão Tris/HCl (0,5 M pH 7,0), 100  $\mu$ l de amostra contendo entre 0-15  $\mu$ g de glucose, 50  $\mu$ l de glucose oxidase (1 mg/ml), 10  $\mu$ l de peroxidase (2 mg/ml) e 150  $\mu$ l de ADTS (10 mg/ml) foram incubadas a 37°C em banho-maria por 1 hora. A seguir a absorbância foi lida a 415 nm, num espectrofotômetro

PHILIPS, modelo PU 8800 UV/VIS, contra o branco no qual a amostra foi substituída por água destilada. Empregaram-se padrões contendo 5 e 10  $\mu\text{g}$  de glucose.

Todas as determinações foram realizadas em triplicatas. As enzimas e o ADTS foram preparados no mesmo tampão do ensaio.

### 2.2.1.2 Determinação de glicogênio pelo método da antrona

Foi utilizada uma micromodificação do método da antrona (TREVELYAN & HARRISON, 1952). Células lavadas, liofilizadas e dessecadas segundo o item 2.3.5.2. das cepas de *E. aerogenes* foram empregadas para a medida do glicogênio intracelular, pois os carboidratos componentes de LPS de *E. aerogenes* são conhecidos por darem uma resposta relativamente baixa à antrona (SUTHERLAND & WILKINSON, 1966).

Amostras de 15 mg de células, finamente pulverizadas, foram suspensas em 15 ml de água destilada, e quando necessário foram diluídas até uma concentração celular de 0,6 mg/ml.

Em tubos de ensaio (75 x 10 mm), lavados com ácido nítrico concentrado, mantidos em banho de gelo, foram adicionados: 0,1 ml de água destilada, 0,1 ml da suspensão de células e 1 ml do reagente de antrona recentemente preparado - antrona a 0,1% (p/v) em ácido sulfúrico a 72% (p/v). Os tubos foram vigorosamente agitados e incubados a 100 °C em banho-maria fervente por exatamente 7 minutos, resfriados e lidos em 625 nm, num espectrofotômetro PHILIPS, modelo PU 8800 UV/VIS, contra o branco cuja suspensão teste foi substituída por água destilada. Empregaram-se padrões contendo 5 e 10  $\mu\text{g}$  de glucose. Todas as determinações foram realizadas em triplicatas. A quantidade de glicogênio foi estimada como equivalentes de glucose anidra e expressa como porcentagem em relação ao peso seco de células (%PSC).

Alternativamente, o glicogênio foi extraído por lise alcalina forte, e determinado espectrofotometricamente com  $I_2$ -KI na presença de  $CaCl_2$  saturado, para identificação do grau médio de ramificação (FONTANA, 1980; KRISMAN, 1962).

### 2.2.1.3 Determinação de açúcar total e redutor

O monitoramento da liberação de açúcares redutores nos hidrolizados enzimático e ácido dos biofilmes celulósicos, submetidos aos diferentes tratamentos (nativa, lavagem com água, ou álcali, ou detergente), e de açúcares residuais (totais) nos meios de cultura de *Acetobacter*, foram realizados pelos métodos cúprico em meio alcalino (SOMOGYI, 1945) e do fenol-sulfúrico (DUBOIS, GILLES et al., 1956), respectivamente. As determinações espectrofotométricas foram efetuadas num espectrofotômetro Varian-Intralab modelo DMS-80;

### 2.2.2 Extração e determinação de poli- $\beta$ -hidróxibutirato (PHB)

Método modificado segundo BRIVONESE & SUTHERLAND (1989), adaptado do procedimento de extração de WILLIAM & WILKINSON (1958) e do ensaio de LAW & SLEPECKY (1961). 10-20 mg de células liofilizadas, dessecadas, obtidas segundo o item 2.3.5.2., foram finamente pulverizadas e tratadas com 1 ml de solução comercial de hipocloritode sódio (10-14% p/v do sal) a 37 °C em banho-maria por 1 hora, em tubos de vidro Pirex® de boca rosqueada e tampa com proteção de Teflon®. A seguir, 4 ml de água destilada foram adicionados, a suspensão agitada e então centrifugada a 5 000 rpm, numa centrífuga MSE Centaur 2. O sobrenadante foi decantado dos grânulos de lipídio depositados no fundo do tubo e descartado. Os grânulos foram então sequencialmente lavados com 5 ml de acetona, 5 ml de éter etílico e 5 ml de etanol absoluto para remover lipídios contaminantes. Cada lavagem foi

seguida de centrifugação e descarte do sobrenadante. O PHB foi extraído do material com 3 ml de clorofórmio em banho-maria fervente por 2 minutos. Depois de resfriada, a mistura foi centrifugada e o sobrenadante transferido para balão volumétrico de 10 ml. Esta extração foi repetida mais duas vezes; as soluções de PHB foram reunidas e o volume completado para 10 ml com clorofórmio. Alíquotas, em triplicatas, contendo entre 0,5-3,0  $\mu$ g de PHB, foram transferidas para tubos Pirex® com boca rosqueada e o clorofórmio evaporado completamente, e 1 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado foi adicionado para hidrolisar o PHB a ácido crotônico. Os tubos foram fechados com tampa protegida por Teflon® e incubados a 100 °C em banho-maria fervente por 10 minutos. Depois de frio, foram realizadas leituras a 235 nm, num espectrofotômetro PHILIPS, modelo PU 8800 UV/VIS, contra o branco contendo apenas ácido sulfúrico concentrado tratado nas mesmas condições da amostra.

O coeficiente de extinção molar do ácido crotônico a 235 nm é 1,56 x 10<sup>4</sup> (SLEPECKY & LAW, 1960), de modo que, uma absorção de 0,1 é equivalente a uma concentração original de 0,551  $\mu$ g/ml de PHB no ensaio. A relação entre concentração e absorbância é linear até 3  $\mu$ gPHB/ml. A concentração de PHB foi expressa como porcentagem em relação ao peso seco de células (%PSC).

### 2.2.3 Avaliação do crescimento celular

A fim de acompanhar o crescimento bacteriano das cepas de *Enterobacter* e *Alcaligenes*, a cada período, foram feitas leituras espectrofotométricas a 600 nm (DO<sub>600nm</sub>), tendo como branco o meio de cultura não inoculado. Amostras com valores para DO acima de 0,6 foram diluídas. Todas as leituras foram feitas em triplicatas, num espectrofotômetro PHILIPS, modelo PU 8800 UV/VIS.

O crescimento de *Acetobacter* spp não foi avaliado uma vez que a maioria das células bacterianas se encontram aprisionadas no biofilme, como uma consequência da gradativa produção de celulose.

#### 2.2.4 Determinação do pH

A fim de acompanhar as variações de pH resultantes do metabolismo celular e/ou detectar possíveis contaminações, nos cultivos de *Enterobacter* e *Alcaligenes*, foram utilizadas amostras do meio de cultura recentemente coletadas a cada intervalo de tempo, e as determinações realizadas à temperatura ambiente em pHmetro portátil Cole-Palmer, aferido entre a faixa de pH 4,0 e 7,0.

Com *Acetobacter* apenas foi possível a determinação do pH após a inoculação e ao término do cultivo, devido à presença do biofilme celulósico produzido na interface líquido-ar.

#### 2.2.5 Determinação do peso seco de exopolissacarídeo, células e biofilmes celulósicos

Após serem processados segundo o item 2.3.5., todos os materiais foram avaliados gravimetricamente, numa balança analítica digital Mettler ou Sartorius H-51, e os valores representados em grama de exopolissacarídeo e/ou células por litro (g/l) de meio de cultura.

## 2.2.6 Obtenção das infusões vegetais

1,2 gramas de folhas ou sementes trituradas de: *Camellia sinensis* (chá comercial - CAC), *Paulinia cupana* (guaraná em pó), *Coffea arabica* (café - semente crua), *Theobroma cacao* (cacau - semente crua), *Ilex paraguayensis* (Mate Leão®), *Kola nitida* (cola - semente) foram submetidas a infusão, por 30 minutos, em 1 litro de água destilada recentemente fervida, seguido de filtração numa espessa camada de lã de vidro, a fim de remover toda matéria particulada.

## 2.2.7 Determinação da matéria seca de infusão

100 ml de cada infusão obtida segundo o item 2.2.6. foram concentradas até 5 ml em rotaevaporador, o material liofilizado e dessecado por 12 horas na presença de pentóxido de fósforo, determinando-se o peso seco gravimetricamente, numa balança analítica Sartorius H-51.

## 2.2.8 Obtenção de extratos clorofórmicos e metanólicos a partir das infusões vegetais

Parte das infusões de chá foram extraídas com clorofórmio em diferentes pH: no pH original (pH 5,6); num pH ácido (0,01M HCl); e sob condições básicas (0,01M NaOH); nas duas últimas preparações o pH foi ajustado para 5,6. Uma quantidade equivalente de NaCl foi adicionada às amostras controle e extraída em pH original, para igualar as concentrações de cloreto de sódio.

Amostras dos resíduos, resultantes das infusões vegetais (de chá e outras plantas) que foram extraídas com clorofórmio em pH alcalino, foram acidificadas com HCl e ressolvabilizados com metanol, a fim de obter os cloridratos correspondentes. Estes materiais foram submetidos ao teste cromogênico da reação de murexida (HORWITZ, 1975) em placa de toque, cromatografia líquido-gás (GLC), e às espectrometrias de ultra violeta (UV) e massa (GLC-MS).

#### 2.2.9 Teste em placa de toque para detecção de xantinas

Aos extratos metanólicos obtidos no ítem 2.2.8., empregou-se uma barata modificação da reação de murexida (HORWITZ, 1975): adição de iguais partes de NaClO<sub>4</sub> (< 10% de Cl<sub>2</sub> ativo) e HCl fumegante. Dependendo da quantidade do material ensaiado, a cor laranja-avermelhada se desenvolve em aquecimento a 100 °C.

#### 2.2.10 Espectrometria de massa para as xantinas

A espectrometria de massa (GLC-MS), para as xantinas, foi realizada usando o método de impacto de elétron (e.i.), empregando-se coluna capilar de dimetilsilicone (PONA) num espectrômetro de massa trimodular 5890/5970/ChemiStation (J & W Scientific Inc.). Ambas as colunas (GLC e MS) operaram isotermicamente a 240 °C, empregando respectivamente N<sub>2</sub> e He como gases de arraste.

### 2.2.11 Extração alcalina do biofilme de *Acetobacter*

20 g de biofilme nativo, bem escorrido, foram deslipidificadas em clorofórmio-metanol (2:1 v/v) e a seguir extraídos exaustivamente com NaOH 5 M contendo 20 mg de NaBH4. O extrato foi filtrado por membrana de vidro porosa M, seguido de precipitação com 3 volumes de etanol.

### 2.2.12 Tratamento dos biofilmes celulósicos para as hidrólises e difração de raio-X

Uma película celulósica, proveniente da linha de produção da Bio Fill Produtos Biotecnológicos S.A., com 48 horas de cultivo, foi quadriculada e cortada em pequenos pedaços de 1,5 x 1,5 cm. Este material foi tratado como segue:

Nativa: película apenas enxaguada com água destilada para remover o meio de cultura residual;

Água: película exaustivamente lavada com água destilada e espremida (durante 2 dias com trocas de água, sob agitação);

SDS: 12 horas sob agitação em SDS a 1 g%. Exaustivamente lavada com água destilada (durante 3 dias com trocas de água, sob agitação);

NaOH: 12 horas sob agitação com NaOH a 8,65 g% (para o ensaio de hidrólise) ou 17,5% (para a difração de raio-X). Exaustivamente enxaguada com água destilada (3 dias com trocas de água, sob agitação).

## 2.2.13 Hidrólise dos biofilmes celulósicos

### 2.2.13.1 Hidrólise enzimática com Celluclast® ou suco gástrico de caramujo

As amostras dos biofilmes hidratados (10 mg de peso seco, antes do tratamento) previamente tratados (nativo, ou lavado com água, ou SDS, ou NaOH) foram hidrolizadas num sistema de incubação contendo: 4 ml de tampão citrato-fosfato (20 mM, pH 4,8), 100 µl de enzima (Celluclast® bruta ou "pool" de S-10 de *Megalobulimus paranaguensis* (FONTANA, GEBARA et al., 1988), filtrada por Biogel P2/P4), a 35 °C durante 80 horas sob agitação. Foram retiradas alíquotas de 500 µl nas primeiras 3 e 6 horas, seguindo-se a amostragem cada 12 horas. As alíquotas foram imediatamente transferidas para tubos de cnsaio e submetidas a fervura para a inativação das enzimas. Com este material centrifugado, procedeu-se a determinação de açúcares redutores (SOMOGYI, 1945) e a cromatografia em camada delgada (TLC) com períodos curtos e longos de incubação.

As membranas obtidas nos experimentos com estimuladores xantínicos na presença de <sup>14</sup>C-glucose foram hidrolizadas com Celluclast® durante 24 horas, com o mesmo sistema de incubação anteriormente empregado

### 2.2.13.2 Hidrólise ácida com ácido trifluoracético (TFA)

As amostras dos biofilmes hidratados (10 mg de peso seco, antes do tratamento) previamente tratados (nativo, ou lavado com água, ou SDS, ou NaOH) foram pré-inchados, com 1 ml de TFA concentrado durante 2 horas a 95 °C (concentração final do TFA foi aproximadamente 50% devido à hidratação da amostra), seguido de incubação a 95 °C em tubo selado durante 18 horas. A seguir, o material foi centrifugado e o ácido do sobrenadante

eliminado por rotaevaporação, seguido de liofilização e ressolvabilização da amostra com 500  $\mu$ l de água destilada. Este material foi empregado para a determinação de açúcares redutores e cromatografia em camada delgada (TLC).

#### **2.2.13.3 Hidrólise ácida do material obtido por extração alcalina do biofilme de *Acetobacter***

15 mg do material extraído segundo o item 2.2.11 foram hidrolizados segundo ALBERSHEIN, NEVINS et al. (1967). O ácido foi eliminado por rotaevaporação, o material liofilizado e derivatizado para cromatografia líquido-gás.

### **2.2.14 Análises Cromatográficas**

#### **2.2.14.1 Cromatografia em camada delgada dos hidrolizados de biofilmes celulósicos tratados**

Os hidrolizados de biofilmes celulósicos tratados (W, D e A, tratamento com água, detergente e álcali, respectivamente) resultantes da degradação ácida e enzimática (S e L, tempos de incubação curto e longo, respectivamente), foram submetidas a cromatografia em camada delgada (TLC), utilizando os solventes isopropanol/acetato de etila/água (85:5:10 v/v), em cromatoplacas de Sílica Gel 60 (Merck E. Merchag, Darmstadt, W. Germany), e visualizados com "spray" orcinol-sulfúrico com aquecimento à 80-100 °C segundo LEWIS & SMITH (1969).

#### 2.2.14.2 Cromatografia líquido-gás de componentes obtidos por extração alcalina do biofiolme de *Acetobacter*

Após a hidrólise ácida (TFA) do material obtido por extração alcalina da película celulósica, os açúcares liberados foram analizados através de cromatografias líquido-gás (GLC), empregando-se os derivados alditol acetato numa coluna OV-225, ou per-silil derivados dos padrões mono e dissacarídicos e amostras, numa coluna SE-30 (FONTANA, GEBARA et al., 1988).

#### 2.2.14.3 Cromatografia líquido-gás das xantinas

As cromatografias líquido-gás (GLC) para as xantinas (padrões de cafeína, teofilina e teobromina) e extratos vegetais, sem prévia derivatização, foram realizadas num cromatógrafo a gás Varian-Intralab 3300 equipado com uma coluna capilar SE-30 (J & W Scientific Inc.) e detector de ionização de chama (FID).

#### 2.2.15 Microscopia ótica dos biofilmes celulósicos

Os dois macrocomponentes dos biofilmes celulósicos, a saber, a celulose e a biomassa bacteriana aderente ou aprisionada, foram microscopicamente monitorados após tingimento com corantes específicos e inespecíficos. A celulose foi convertida em celulose fluorescente após ligação com "CalcoFluor White", utilizando-se o corante (10 mg/ml) e tempo de contato de cerca de 30 minutos (HAIGLER, BROWN JR et al., 1980); ou ainda Vermelho Congo (1 mg/ml) a fim de interagir com  $\beta$ -D-glucanas (TEATHER & WOOD, 1982; WOOD, 1980).

A biomassa bacteriana, através de seus componentes proteicos, foi alternativamente corada com reagentes cromogênicos para proteínas, ou seja, "Coomassie Brilliant Blue R-250" ou "Ponceau S" (CONN'S, 1977). Os referidos corantes, bem como alguns componentes de coloração empregadas em bacterioscopia (e.g., safranina), foram igualmente utilizados para monitorar a remoção da massa bacteriana da rede celulósica, como resultado das extensivas lavagens dos biofilmes nativos. As micrografias óticas foram obtidas com um microscópio Nikon-Labophot modelo AFX-II.

#### 2.2.16 Teste cromogênico em placa de Petri para a natureza celulósica do biofilme de *Acetobacter*

A fim de verificar a liberação de *D*-glucose do biofilme de *Acetobacter* pela ação dos complexos celulolíticos de *Trichoderma* (Celluclast<sup>®</sup>) e do suco gástrico de caramujo *Megalobulimus paranaguensis* (FONTANA, GEBARA et al., 1988), um biofilme lavado exaustivamente com água foi tamponado (tampão citrato-fosfato 10 mM, pH 4,8), recortado e depositado sobre uma placa de Petri contendo agar solidificado. Este biofilme foi dividido em setores denominados: 1, 2 e 3 onde foram adicionadas diferentes preparações de enzimas de suco gástrico de caramujo, diluídas três vezes (nativa, precipitada com sulfato de amônio saturado, e filtrada através de BioGel P-2, respectivamente; 4 = Celluclast<sup>®</sup>, (-) = enzima inativada pelo calor; e (+) = teste com a enzima ativa. B = zona onde não foi aplicada nenhuma enzima. 20  $\mu$ g de *D*-glucose foram aplicadas no centro do biofilme. Após incubação por 2 horas (35 °C) o biofilme foi retamponado com tampão fosfato 100mM, pH 7,0, contendo um coquetel de glucose-oxidase mais peroxidase/aminoantipirina.

### 2.2.17 Diagrama de raio-X do biofilme de *Acetobacter* sob diferentes tratamentos

Os diagramas de difração de raio-X, para as membranas celulósicas, foram obtidos com uma câmera "Flat Laue" usando geometria de transmissão e radiação de cobre ( $K_{\alpha}$ ) filtrado com níquel. As amostras foram colocadas num segurador de espécime com janelas "mylar", onde elas puderam ser mantidas úmidas durante a exposição. Amostras secas foram montadas sobre um segurador de espécime de fibra. Os tempos de exposição foram geralmente 4 horas, e a distância entre o espécime e o filme de 42 mm.

## 2.3 PROCESSO FERMENTATIVO

### 2.3.1 Meios de cultura

#### 2.3.1.1 Meios de manutenção

##### 2.3.1.1.1 Meio sólido para manutenção de *Alcaligenes* e *Enterobacter*

Durante o período do trabalho, as cepas de *Alcaligenes* e *Enterobacter* sp foram mantidas viáveis em meio sólido de extrato de levedura (ou meio de casaminoácidos) (SUTHERLAND & WILKINSON, 1965) e transferidas quinzenalmente.

Composição do meio de extrato de levedura:

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4,0 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,0 g/l
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,0 g/l
NaCl	1,0 g/l
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2 g/l
CaCl <sub>2</sub>	0,01 g/l
FeSO <sub>4</sub>	0,001 g/l
Casaminoacidos	1,0 g/l
Extrato de levedura	1,0 g/l
D-glucose	20,0 g/l
Agar	20,0 g/l
Água destilada q.s.p.	1,0 l

CaCl<sub>2</sub> e FeSO<sub>4</sub> foram esterilizados separadamente sob vapor fluente por uma hora.

Os demais componentes, com exceção da glucose, foram esterilizados conjuntamente a 1 atm por 30 minutos. A glucose, esterilizada sob as mesmas condições, foi adicionada assepticamente, e o meio distribuído em placas de Petri para solidificar.

### 2.3.1.1.2 Meio sólido/líquido para manutenção de *Acetobacter*

As cepas de *Acetobacter* foram mantidas a 28 °C num meio sólido ou líquido, não agitado, contendo 50,0 g/l de glucose, 10,0 g/l de extrato de levedura, 30,0 g/l de carbonato de cálcio ("GYC medium") (LEY, SWINGS et al., 1984), usando o halo de solubilização deste sal como índice de acidificação do meio. As culturas estoques foram transferidas quinzenalmente.

Culturas de enriquecimento, quando necessárias, foram obtidas substituindo-se a glucose por 40 ml/l de etanol, como única fonte de carbono (BROCK, 1979);

### 2.3.1.2 Meios de cultivos dos microrganismos

#### 2.3.1.2.1 Meio basal modificado de Davis & Mingoli (D&M)

Em todos os cultivos das cepas de *Enterobacter* e *Alcaligenes*, foi empregada a composição básica deste meio contendo a seguinte composição (CRUICKSHANK, DUGUID et al., 1965):

$K_2HPO_4$	7,0 g/l
$KH_2PO_4$	3,0 g/l
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,1 g/l
$(NH_4)_2SO_4$	1,0 g/l
<i>D</i> -glucose	20,0 g/l
Água destilada q.s.p.	1,0 l

O meio basal, sem a glucose, foi esterilizado a 1 atm por 30 minutos. A solução de glucose, esterilizada sob as mesmas condições, foi adicionada assepticamente de modo a obter a concentração final desejada.

Para a cepa *Alcaligenes* (EPS<sup>-</sup>), que não apresentou bom crescimento em sulfato de amônio, como fonte de nitrogênio, a caseína hidrolizada foi empregada como substituto

Foram testadas condições, para as quatro cepas, com 3,0; 5,0; 10,0; e 20,0 g/l de glucose, tendo 0,5 g/l de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ou 1,0 g/l de caseína hidrolizada como fonte de nitrogênio; com a metade da concentração de ambas as fontes de nitrogênio e 10,0 g/l de glucose; e com 1/16 da concentração de magnésio (0,00625 g/l) com 10,0 g/l de glucose em ambas as fontes de nitrogênio.

### 2.3.1.2.2 Meio de cultivo de *Acetobacter*

Os cultivos de *Acetobacter*, em escala laboratorial, para preparação de membranas celulósicas (36-96 horas a 28 °C) foram realizadas em meio líquido não agitado com 50,0 g/l de D-glucose, ou sacarose ou sacarose parcialmente hidrolizada (por invertase de levedura de panificação, ou hidrólise ácida branda por autoclavação e posterior ajuste de pH) suplementada com 5 ml/l de etanol e 0,005-0,01 g% de extrato de levedura, ou alternativamente a partir de água de levedura, gerada por autólise seguida de um procedimento de breve fervura (TARR & HIBBERT, 1931).

Nos experimentos de estimulação da produção de celulose por infusões vegetais, os meios de cultura foram obtidos a partir da adição dos sólidos ou soluções 10x concentradas às diferentes infusões vegetais. As fontes de carbono foram 50,0 g/l de glucose ou sacarose, ou sacarose invertida, suplementado com 5 ml/l de etanol. O extrato de levedura (0,005-0,010 g%) foi incluído nos meios a fim de evitar a redução de massa de membranas celulósicas nos experimentos controles. Todos os componentes, com exceção da fonte de carbono, foram esterilizados sob vapor fluente por 45 minutos. A fonte de carbono, esterilizada sob as mesmas condições, foi adicionada de modo a obter a concentração final desejada.

Em todos os cultivos de *Acetobacter* foram adicionados ao meio de cultura, no momento da inoculação, 0,1 ml% de Mycostatin® (Squibb Indústria Química SA) e 0,05 g% de Benomyl® (du Pont), para evitar o crescimento de microrganismos indesejáveis.

### 2.3.2 Preparo do inóculo

#### 2.3.2.1 Inóculo de *Alcaligenes* e *Enterobacter*

Uma alçada de células do microrganismo, recentemente crescido no meio de manutenção, foi transferida para um Erlenmeyer de 250 ml, contendo 50 ml de meio basal (D&M) com concentrações variáveis de carbono e nitrogênio, estipuladas nos ensaios a que se destinavam. Os frascos foram incubados sob agitação a 30 °C e 250 rpm por 12-24 horas. As suspensões de células obtidas foram utilizadas como inóculo.

#### 2.3.2.2 Inóculo de *Acetobacter*

Para *Acetobacter* cepa "BF", os inóculos foram preparados a partir do meio líquido incorporado numa membrana celulósica, proveniente da planta da Bio Fill Produtos Biotecnológicos S.A., que era liquidificada em condições assépticas, filtrada por gaze dobrada 8x e sua pureza determinada microscopicamente com relação a microrganismos morfologicamente estranhos. Este filtrado foi utilizado como inóculo na proporção de 5% (v/v) em relação ao volume do meio;

Para *Acetobacter* cepa "JF", 5% (v/v) de líquido proveniente da liquidificação de membranas celulósicas frescas, produzidas com glucose 5 g%, extrato de levedura 0,01 g%, etanol 0,5 ml%, 0,1 ml% de Mycostatin® e 0,05 g% de Benomyl®;

Para *Acetobacter xylinum* NRRC 207, NRRL 17005 e D1-D4, 5% (v/v) do líquido proveniente de uma película espremida, obtido no meio indicado anteriormente, foi adicionado ao meio de cultura .

### 2.3.3 Condições de Cultivo

#### 2.3.3.1 Condições de cultivo de *Enterobacter* e *Alcaligenes* sp

Todos os experimentos com variação na concentração nutricional para *Enterobacter* e *Alcaligenes* sp foram realizados em duplicatas, em Erlenmeyers de 2 litros contendo inicialmente 500 ml de meio de cultura. Os cultivos foram inoculados assepticamente com 5 ml de suspensão obtida segundo o item 2.3.2.1., e incubados em agitador-incubador de movimento rotatório da L.H. Engineering Co Ltd (Bells Hill, Stoke Poges/ Bucks, England) a 30 °C e 250 rpm por 96-120 horas, com retirada de alíquotas de 50 ml em intervalos de 4-12 horas, nas primeiras 72 horas, seguido de amostragem a cada 24 horas.

Todas as curvas de crescimento foram realizadas em duplicatas, em Erlenmeyers de 250 ml contendo 50 ml de meio de cultura. Os cultivos, inoculados assepticamente com 0,5 ml de suspensão obtida segundo o item 2.3.2.1., foram incubados em agitador rotatório a 30 °C e 250 rpm pelo tempo especificado em cada experimento, com retirada de alíquotas de 2 ml a cada 2 horas nas primeiras 12 horas e a seguir a cada 6 horas

#### 2.3.3.2 Condições de cultivo de *Acetobacter* sp

##### 2.3.3.2.1 Cultivo de *Acetobacter* sp na presença de infusões vegetais

Nos experimentos de estimulação da produção de celulose por infusões vegetais, os cultivos de *Acetobacter*, em duplicatas, foram realizados em copos de 200 ml (tipo "whisky"

da Cisper®), contendo 100 ml de meio, cobertos com papel absorvente Chiffon® previamente esterilizado sob luz UV (evitando o acesso de *Drosophila* ). Os cultivos foram incubados, sem agitação, numa incubadora BOD 347-CD (Tecnal, São Paulo) a 28 °C e umidade relativa acima de 80%;

Nos experimentos de estimulação da produção de celulose por infusões vegetais, em temperatura ambiente (verão curitibano), os cultivos de *Acetobacter*, em duplicatas, foram realizados em frascos de 1 litro , contendo 400 ml de meio, e cobertos com papel absorvente Chiffon® previamente esterilizado sob luz UV , deixados sobre uma bancada isolada na sala intermediária do LQBB.

### 2.3.3.2.2 Cultivo de *Acetobacter* sp em cultivos normais

Nos cultivos visando a utilização de diferentes fontes de carbono bem como de variação na concentração dos nutrientes empregados, ou ainda para obtenção de inóculo, os cultivos de *Acetobacter* , em duplicatas, foram realizados em copos de 200 ml (tipo "whisky" da Cisper®), contendo 150 ml de meio, cobertos com papel absorvente Chiffon® previamente esterilizado sob luz UV (evitando o acesso de *Drosophila* ). Os cultivos foram incubados, sem agitação, numa incubadora BOD 347-CD (Tecnal, São Paulo) a 28 °C, com umidade relativa acima de 80% durante 72-96 horas

### 2.3.4 Coleta e conservação das amostras

Após o inóculo de *Enterobacter* e *Alcaligenes* sp no meio basal (D&M), a cada intervalo de tempo, 50 ml de meio de cultura foram coletados assepticamente para a

determinação da DO (controle do crescimento bacteriano), pH, glucose residual, peso seco dc exopolissacarídeo e/ou células e posteriormente dos polímeros intracelulares.

Imediatamente após cada amostragem, 1 ml de cultivo foi centrifugado, numa centrífuga Spin 15.000 para separação das células e o sobrenadante conservado sob congelamento até o momento do doseamento da glucose residual.

Após ter sido retirada a amostra para determinação da glucose, determinada a leitura da DO e do pH, aproximadamente 0,5 ml de solução de formalina foi adicionado ao restante de cada amostra ( $\approx$  47 ml) para inibir o metabolismo celular. Em seguida, as amostras foram centrifugadas ou mantidas sob refrigeração até o dia seguinte.

### 2.3.5 Processamento da amostras

#### 2.3.5.1 Obtenção dos exopolissacarídeos

Os cultivos das cepas de *Alcaligenes* e *Enterobacter*, produtoras de EPS (EPS<sup>+</sup>), foram diluídos para a centrifugação, permitindo assim uma eficiente deposição das células. Os cultivos da cepa *Alcaligenes* (EPS<sup>+</sup>) necessitaram diluições de até 1:8 e os da *Enterobacter* (EPS<sup>+</sup>) de apenas 1:2. Todos cultivos foram centrifugados, em centrífuga Sorval RC-SB (du Pont), a 50 000 xg por 30 minutos.

Após a sedimentação do material celular, os sobrenadantes das cepas EPS<sup>+</sup> foram decantados, precipitados com 2-3 volumes de acetona e deixados em repouso pelo mínimo 24 horas. Os precipitados foram recuperados com o auxílio de um bastão de vidro, ressuspensos em água destilada e dialisados contra água de torneira por 48 horas, em câmara fria, seguido de 12 horas com água destilada. Os sobrenadantes das cepas EPS<sup>-</sup> foram descartados.

Decorrido o tempo de diálise, os EPS foram transferidos para recipientes plástico de boca larga, congelados, liofilizados num "Edwards Freeze Drier Super module (Pirani 1001)", dessecados por 12 horas na presença de pentóxido de fósforo e pesados numa balança analítica digital Mettler.

### 2.3.5.2 Obtenção das Células

Os sedimentos celulares das quatro cepas foram ressuspensos em água destilada e submetidos à nova centrifugação. No caso da cepa *Alcaligenes* (EPS<sup>+</sup>), a operação foi repetida até total eliminação do EPS, evitando deste modo uma interferência do material extracelular na determinação do peso seco de células.

As amostras celulares das cepas de *Enterobacter* (EPS<sup>-</sup> e EPS<sup>+</sup>) foram lavadas até total eliminação da glucose residual, servindo-se de um teste rápido com glucose oxidase/peroxidase para verificação, pois a presença de glucose proveniente do meio de cultura poderia interferir no posterior doseamento do polímero de reserva, o glicogênio, pelo método da antrona (TREVELYAN & HARRISON, 1952).

As amostras celulares, devidamente lavadas, foram transferidas para tubos eppendorf®, centrifugadas em centrifuga Spin 15.000, congeladas, liofilizadas num "Edwards Freeze Drier Super module (Pirani 1001)", dessecadas por 12 horas na presença de pentóxido de fósforo e pesadas numa balança analítica digital Mettler.

### 2.3.5.3 Obtenção dos biofilmes celulósicos

Após a interrupção dos cultivos de *Acetobacter*, as membranas nativas formadas foram coletadas e mantidas imersas em água para remover o meio de cultura residual, seguido

de exaustivas lavagens com água destilada, congeladas, liofilizadas num liofilizador Labconco 4.5, dessecadas na presença de pentoxído de fósforo por 12 horas e pesadas numa balança analítica Sartorius H-51.

## **2.4 PROCESSO FERMENTATIVO DAS CEPAS DE *ENTEROBACTER* E *ALCALIGENES***

### **2.4.1 Aspectos gerais de cultivo em meio sólido e líquido**

Visando a observação de diferenças entre as colônias formadas pelas cepas produtoras de exopolissacarídeo (EPS<sup>+</sup>) e seus mutantes (EPS<sup>-</sup>), as mesmas foram cultivadas em meio sólido (casaminoácidos) e líquido (D&M).

### **2.4.2 Determinação das concentrações ideais das fontes de carbono, nitrogênio e magnésio para o crescimento de *Enterobacter* e *Alcaligenes***

Visando o estabelecimento das concentrações nutricionais restritoras ou não do crescimento, como uma estratégia para posterior obtenção de EPS e/ou células em diferentes relações C:N, foram realizadas curvas de crescimento para todas as cepas, em que o meio de D&M foi empregado com as devidas alterações.

#### 2.4.2.1 Determinação do efeito da concentração da fonte de carbono no crescimento de *Enterobacter* e *Alcaligenes*

Foram realizados os crescimentos de *Enterobacter* e *Alcaligenes* no meio de D&M variando a concentração de *D*-glucose de 1,0; 2,5; 5,0; 10,0 e 20,0 g/l.

**Tabela 5 - Composição dos meios empregados para determinação do efeito da concentração da fonte de carbono no crescimento de *Enterobacter* e *Alcaligenes***

<i>D</i> -Glucose	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Tampão Fosfato
<b>1,0</b>	1,0	0,1	10,0
<b>2,5</b>	1,0	0,1	10,0
<b>5,0</b>	1,0	0,1	10,0
<b>10,0</b>	1,0	0,1	10,0
<b>20,0</b>	1,0	0,1	10,0

Todas as concentrações estão expressas em g/l

#### 2.4.2.2 Determinação do efeito da concentração da fonte de nitrogênio no crescimento de *Enterobacter* e *Alcaligenes*

Foram realizados os crescimentos de *Enterobacter* e *Alcaligenes* no meio basal de D&M variando a concentração de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  de 0,1; 0,25; 0,5; 0,75 e 1,0 g/l

**Tabela 6 - Composição dos meios empregados para determinação do efeito da concentração da fonte de nitrogênio no crescimento de *Enterobacter* e *Alcaligenes***

D-Glucose	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Tampão Fosfato
10,0	<b>0,1</b>	0,1	10,0
10,0	<b>0,25</b>	0,1	10,0
10,0	<b>0,5</b>	0,1	10,0
10,0	<b>0,75</b>	0,1	10,0
10,0	<b>1,0</b>	0,1	10,0

Todas as concentrações estão expressas em g/l

#### 2.4.2.3 Determinação do efeito da concentração da fonte de magnésio no crescimento de *Enterobacter* e *Alcaligenes*

Foram realizados os crescimentos de *Enterobacter* e *Alcaligenes* no meio basal de D&M variando a concentração de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  de 0,00625; 0,0125; 0,025; 0,05 e 0,1 g/l

**Tabela 7 - Composição dos meios empregados para determinação do efeito da concentração da fonte de magnésio no crescimento de *Enterobacter* e *Alcaligenes***

D-Glucose	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Tampão Fosfato
10,0	0,5	<b>0,00625</b>	10,0
10,0	0,5	<b>0,0125</b>	10,0
10,0	0,5	<b>0,025</b>	10,0
10,0	0,5	<b>0,05</b>	10,0
10,0	0,5	<b>0,1</b>	10,0

Todas as concentrações estão expressas em g/l

### 2.4.3 Verificação do restabelecimento do crescimento após readição da fonte de magnésio em *Alcaligenes*

Uma vez que *Enterobacter* e *Alcaligenes* apresentaram curvas de crescimento com perfil de restrição quando se empregou 0,00625 g/l de MgSO<sub>4</sub>, foram repetidas, para todas as cepas, as curvas de crescimento com 0,1 (controle), 0,00625 e 0,0125 g/l de MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, a fim de verificar se naqueles cultivos (2.4.2.3.) o fator limitante do crescimento foi realmente a insuficiência de magnésio.

Cada um destes cultivos foi iniciado em quadruplicata. Após 24 horas de cultivo, uma duplicita com 0,00625 e 0,0125 g/l de MgSO<sub>4</sub> recebeu assepticamente uma alíquota de solução do sal de magnésio de modo a obter a concentração final de 0,1 g/l, enquanto que a outra não recebeu nada. O crescimento bacteriano do controle e dos testes, antes e depois da adição de magnésio, foi acompanhado pelas leituras da DO<sub>600nm</sub>.

Tomou-se o cuidado para que a restrição do crescimento fosse apenas devido à insuficiência de magnésio, uma vez que íon sulfato também foi adicionado na forma do sal de amônio, como fonte de nitrogênio.

### 2.4.4 Efeito da relação de C:N no crescimento e produção de EPS e polímero de reserva em *Enterobacter* e *Alcaligenes*

Com a finalidade de estudar o efeito das diferentes condições nutricionais, resultantes das relações molares entre os nutrientes primários potencialmente limitantes do crescimento (HARDER & DIJKHUIZEN, 1983), sobre a produção de EPS, produção/degradação do polímero de reserva, bem como uma possível relação existente entre a degradação do polímero de reserva em favor da produção de EPS, os meios foram preparados

empregando-se como referência a mesma base de sais (D&M), com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ou caseína hidrolizada como fonte de nitrogênio.

Em experimentos correspondentes, a concentração de caseína hidrolizada (1,0 g/l = 8 mM de N) foi empregada de forma a obter aproximadamente a mesma molaridade (em nitrogênio), presente em 0,5 g/l de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

**Tabela 8 - Composição dos meios de cultura utilizados por *Enterobacter* e *Alcaligenes* empregando sulfato de amônio como fonte de nitrogênio**

Condição	D-Glucose	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Tampão Fosf	C : N (mM)
EC 20 (SA)	<b>20,0</b>	0,5	0,1	10,0	14,7 : 1
EC 10 (SA)	<b>10,0</b>	0,5	0,1	10,0	7,3 : 1
EC 05 (SA)	<b>5,0</b>	0,5	0,1	10,0	3,7 : 1
EC 03 (SA)	<b>3,0</b>	0,5	0,1	10,0	2,2 : 1
EN/2 (SA)	10,0	<b>0,25</b>	0,1	10,0	14,7 : 1
EMg/16 (SA)	10,0	0,5	<b>0,0065</b>	10,0	7,3 : 1

Todas as concentrações estão expressas em g/l

**Tabela 9 - Composição dos meios de cultura utilizados por *Enterobacter* e *Alcaligenes* empregando caseína hidrolizada como fonte de nitrogênio**

Condição	D-Glucose	Caseína Hidr	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Tampão Fosf	C <sup>a</sup> : N (mM)
EC 20 (CH)	<b>20,0</b>	1,0	0,1	10,0	13,9 : 1
EC 10 (CH)	<b>10,0</b>	1,0	0,1	10,0	6,9 : 1
EC 05 (CH)	<b>5,0</b>	1,0	0,1	10,0	3,5 : 1
EC 03 (CH)	<b>3,0</b>	1,0	0,1	10,0	2,1 : 1
EN/2 (CH)	10,0	<b>0,5</b>	0,1	10,0	13,9 : 1
EMg/16 (CH)	10,0	1,0	<b>0,0065</b>	10,0	6,9 : 1

Todas as concentrações estão expressas em g/l

C<sup>a</sup> - Para efeito de cálculos foi considerada apenas a fonte de carbono presente na glucose

#### 2.4.5 Determinação do efeito da concentração do tampão fosfato sobre o crescimento da cepa *Enterobacter aerogenes* (EPS<sup>+</sup>)

A fim de verificar se uma variação na concentração dos sais de fosfato interferiria no crescimento do gênero *Enterobacter*, elegeu-se a cepa *Enterobacter* EPS<sup>+</sup>, avaliando desta forma, não apenas o crescimento mas também os possíveis efeitos sobre a produção do exopolissacarídeo.

Foram realizadas curvas de crescimento empregando-se como meio a base de sais de D&M, com 10,0 g/l de glucose e 0,5 g/l de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, nas quais as concentrações dos sais de fosfato (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) foram multiplicadas por 0,5; 1,0 (controle); 1,5; 2,5; 3,0 e 4,0. Os crescimentos foram realizadas em Erlenmeyers de 250 ml contendo inicialmente 50 ml de meio de cultura, 0,5 ml de inóculo foram adicionados assepticamente e o crescimento realizado nas condições já descritas. Retiraram-se alíquotas de 2 ml a cada 2 horas para avaliar o crescimento e a variação de pH. Às 74 horas de cultivo, o meio remanescente foi centrifugado, o sobrenadante precipitado com 2-3 volumes de acetona e processado segundo o item 2.3.5.1.

Tabela 10 - Composição dos meios empregados na determinação do efeito da concentração do tampão fosfato no crescimento da cepa *Enterobacter* (EPS<sup>+</sup>)

Condição	D-Glucose	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	Tampão Fosf	C : N (mM)
<b>0,5 x TF</b>	10,0	0,5	0,1	<b>5,0</b>	14,7 : 1
<b>1,0 x TF</b>	10,0	0,5	0,1	<b>10,0<sup>a</sup></b>	14,7 : 1
<b>1,5 x TF</b>	10,0	0,5	0,1	<b>15,0</b>	14,7 : 1
<b>2,5 x TF</b>	10,0	0,5	0,1	<b>25,0</b>	14,7 : 1
<b>3,0 x TF</b>	10,0	0,5	0,1	<b>30,0</b>	14,7 : 1
<b>4,0 x TF</b>	10,0	0,5	0,1	<b>40,0</b>	14,7 : 1

<sup>a</sup> - concentração presente no meio de Davis & Mingoli referencial  
TF - Tampão Fosfato

## 2.4.6 Cultivo comparativo das cepas de *Enterobacter aerogenes* em duas forças iônicas diferentes do tampão fosfato

A fim de verificar a possibilidade de cultivar as cepas de *Enterobacter aerogenes* (EPS<sup>-</sup>) e (EPS<sup>+</sup>) em força de tampão duplicada, visando desta forma uma melhora na manutenção do pH, e como consequência, obter a total incorporação da fonte de carbono exógena, foram empregadas as seguintes condições de cultivo:

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7,0 ou 14,0 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,0 ou 6,0 g/l
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,1 g/l
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,5 g/l
D-glucose	20,0 g/l
Água destilada q.s.p.	1,0 l
pH	7,00-7,20

Os experimentos foram realizados em duplicatas, em Erlenmeyers de 2 litros contendo inicialmente 500 ml de meio de cultura. Os cultivos foram incubados em agitador rotatório a 30 °C e 250 rpm por 120-128 horas, com retirada de alíquotas de 50 ml em intervalos de 9-24 horas.

## 2.4.7 Determinação da viscosidade dos meios de cultura durante a produção de EPS em *Enterobacter* e *Alcaligenes*

A fim de acompanhar o aumento de viscosidade nos meios de cultura das cepas de *Enterobacter* (EPS<sup>+</sup>) e *Alcaligenes* (EPS<sup>+</sup>), em diferentes tempos de cultivo (0-96 horas), bem como em diferentes concentrações de glucose inicial (3,0; 5,0 e 10,0 g/l), foram realizadas

medidas da viscosidade num viscosímetro digital "Wells-Brookfield Cone/Plate" empregando-se o êmbolo ("spindle") CP-41, com ângulo de 3,0 graus e temperatura de 25 °C.

Amostras de 2,0 ml de meio de cultura livre de célula, diluídas quando necessário, foram adicionadas sobre o receptor da amostra com o auxílio de uma seringa, evitando assim a formação de bolhas. Sobre as amostras foram exercidas velocidades gradientes ("shear rate") de 3, 6, 12 e 24 s<sup>-1</sup>. Com os dados a partir daí obtidos, foram construídos gráficos de viscosidade (cP) *versus* "shear rate"(s<sup>-1</sup>) em escalas logarítmicas. Destes gráficos, tomaram-se os valores da viscosidade obtidos com "shear rate" de 10 s<sup>-1</sup>, e construiram-se novos gráficos de viscosidade (cP) *versus* tempo de cultivo.

#### 2.4.8 Determinação das viscosidades das soluções preparadas a partir dos exopolissacarídeos isolados

A fim de verificar a diferença de viscosidade entre exopolissacarídeos produzidos em diferentes tempos de cultivo, com os polissacarídeos recuperados segundo o item 2.3.5.1. foram preparadas soluções em água destilada nas seguintes concentrações: PS-*Alcaligenes*, 0,1 g%; PS-*Enterobacter* , 0,5 g%.

As soluções das amostas de exopolissacarídeo produzidos em 24, 48 e 96 horas foram submetidos às mesmas condições do experimento anterior, e traçados os gráficos da viscosidade (cP) *versus* "shear rate" e viscosidade (cP) *versus* tempo de cultivo com "shear rate" de 10 s<sup>-1</sup>.

## 2.5 PROCESSO FERMENTATIVO DAS CEPAS DE *ACETOBACTER*

### 2.5.1 Aspectos gerais e de cultivo dos microrganismos

A fim de avaliar as características tintoriais e morfológicas, as cepas de *Acetobacter*, crescidas em meio de manutenção sólido, por uma semana, foram coradas pelo método de Gram (STANIER, INGRAHAM et al., 1990). Como uma estratégia para vizualizar a biomassa microbiana aprisionada nos biofilmes celulósicos recém formados (48 horas de cultivo), os mesmos foram exaustivamente lavados com água, depositados sobre uma lâmina microscópica e corados com "Coomassie Brilliant Blue R-250" ou "Ponceau S" (CONN'S, 1977).

### 2.5.2. Aumento da produção do biofilme de *Acetobacter* por infusões vegetais

#### 2.5.2.1 Produção do biofilme de *Acetobacter* na presença de infusões vegetais, em temperatura ambiente

A fim de verificar o efeito positivo de um grupo de fontes vegetais na produção de celulose em temperatura ambiente, as infusões vegetais foram empregadas como suplementos (0,12 g%), juntamente com 5 g% de sacarose invertida, 0,01 g% de extrato de levedura e 0,5 ml% de etanol.

### 2.5.2.2 Produção do biofilme de *Acetobacter* na presença de infusões de chá tratadas, em condições controladas

A fim de averiguar a hipótese da participação de bases nitrogenadas contidas na infusão de chá não tratada (**a**, controle), três amostras (**b**, pH original; **c**, pH ácido; e **d**, pH alcalino) foram pré tratadas por extração com clorofórmio, a fim de aumentar ou diminuir o conteúdo de xantinas na solução aquosa final, a ser empregada como suplemento do meio, juntamente com 5 g% de sacarose invertida, água de levedura 0,01% (base seca) e 0,5 ml% de etanol. Para confirmar a evidência da participação de composto(s) extratíveis por clorofórmio na infusão de chá, foi realizado outro experimento, em que foram empregadas as infusões de chá não tratada (controle), extraídas com clorofórmio em pH natural e extraídas em pH natural, mas reconstituída após a evaporação do solvente da fração clorofórmica, juntamente com 5 g% de glucose, água de levedura 0,01% (base seca) e 0,5 ml% de etanol.

### 2.5.2.3 Determinação da natureza do(s) estimulador(es) no extrato clorofórmico

A fim de avaliar a natureza do(s) estimulador(es) da produção de celulose no extrato clorofórmico, os resíduos das infusões vegetais (chá e outras plantas) extraídas com clorofórmio, em pH alcalino, foram acidificadas com HCl e ressolvabilizadas com metanol. Este material foi empregado para o teste cromogênico da reação de murexida (HORWITZ, 1975), cromatografia líquido-gás (GLC) e espectrometrias de ultra violeta (UV) e massa (GLC-MS)

#### 2.5.2.4 Confirmação do efeito estimulador das metil-xantinas na produção de celulose com as drogas puras

A fim de confirmar o efeito estimulador das metil-xantinas na produção de celulose, foram realizados cultivos contendo 5 g% de sacarose invertida, 5 mg% de extrato de levedura, 5 ml% de etanol, variando a concentração de cafeína ou teofilina de 0,075; 0,15; 0,3 e 0,6 mg% ou cafeína + teofilina de 0,15 + 0,15 mg%.

#### 2.5.3 Determinação da natureza do biofilme de *Acetobacter*

A fim de determinar a natureza do biofilme de *Acetobacter*, os mesmos foram submetidos a diferentes tratamentos e a ação dos complexos celulolíticos de *Trichoderma* (Celluclast<sup>®</sup>) e de *Megalobulimus paranaguensis*, sendo os produtos analizados por cromatografia em camada delgada (TLC) ou teste cromogênico com glucose oxidase/peroxidase em placa de Petri. A natureza dos biofilmes também foi acessada por hidrólise ácida, espectrometria de infra vermelho (IR) e interação com corantes e visualização sob luz ultra violeta (UV). Para a detecção de glicanas poliméricas, o biofilme nativo lavado foi deslipidificado, extraído com álcali e o material resultante hidrolizado com TFA. O hidrolizado foi derivatizado e avaliado através de cromatografia líquido-gás (GLC).

#### 2.5.4 Características da celulose de *Acetobacter*

A fim de caracterizar fisicamente a celulose de *Acetobacter* um biofilme nativo foi testado em sua capacidade de retenção de água e compactação das camadas celulósicas após o tratamento de secagem. Com o biofilme pressionado entre duas lamínulas, foi possível avaliar

microscopicamente a capacidade de re-hidratação do biofilme seco; a resistência ao rasgo foi testada no biofilme nativo e re-hidratados.

O grau de cristalinidade e a orientação das microfibrilas dos biofilmes submetidos a diferentes tratamentos físicos/químicos foi avaliada por difração de raio-X.

### 2.5.5 Aplicação médica do biofilme celulósico de *Acetobacter*

A avaliação dos tratamentos com biofilmes re-hidratados em salina ou água, foram conduzidos sob a supervisão do médico dermatologista J.A. Bichara, em pacientes sofrendo de feridas na pele resultantes de queimaduras, úlceras ou dermoabrasão facial.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

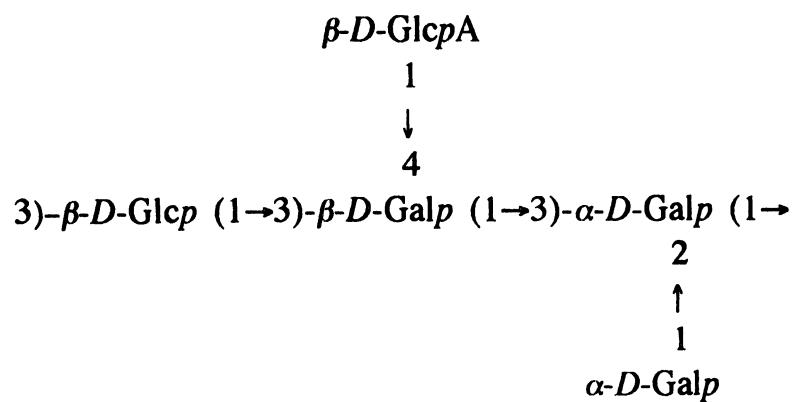
### 3.1 PROCESSO FERMENTATIVO DAS CEPAS DE *ENTEROBACTER* E *ALCALIGENES*

### 3.1.1 Aspectos gerais e de cultivo dos microrganismos

### 3.1.1.1 *Enterobacter* sp

*Enterobacter aerogenes* A4.87(SI), um mutante "slime" (= SI), pertencente ao sorotipo 8 (= A4), é produtor de um EPS ramificado, não acetilado, com uma unidade repetitiva pentassacarídica contendo *D*-glucose (1), *D*-galactose (3) e ácido *D*-glucurônico (1) (JANSSON, LINBERG et al., 1988).

Figura 14 - Estrutura da unidade repetitiva do EPS produzido por *Enterobacter aerogenes* A4.87(SI)



*Enterobacter aerogenes* A4.O31, um mutante não mucóide (EPS<sup>-</sup>) do mesmo sorotipo anterior. (O = mutante Ocasional espontâneo)

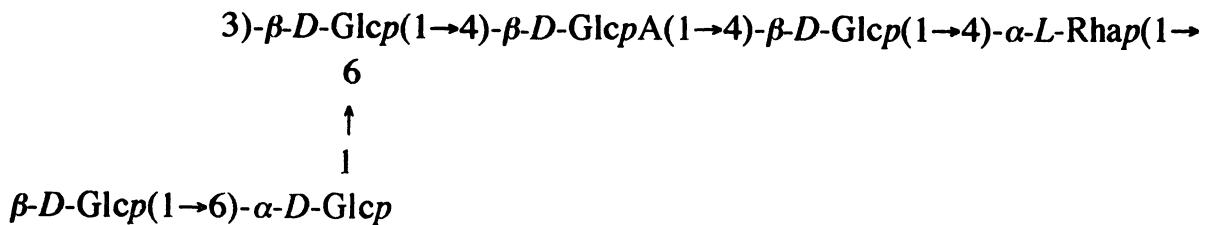
Em meio sólido (manutenção), a cepa *Enterobacter* EPS<sup>+</sup> produz colônias isoladas, esbranquiçadas e mucóides (vide figura 16a), que no decorrer do tempo se espalham por toda a superfície da placa de Petri. Em meio líquido (D&M), tanto com caseína hidrolizada quanto com sulfato de amônio, o *Enterobacter* EPS<sup>+</sup> apresenta bom e rápido desenvolvimento, levando a produção de um meio viscoso; o *Enterobacter* EPS<sup>-</sup> produz, em meio sólido, colônias isoladas esbranquiçadas e rugosas ("rough") (vide figura 16b). Como a cepa EPS<sup>+</sup>, *Enterobacter* EPS<sup>-</sup> também se desenvolve bem e rápido nas duas fontes de nitrogênio, contudo, há aglutinação de suas células em meio líquido.

O EPS, tipo "slime", apresenta relativa facilidade de separação das células bacterianas, por centrifugação. Ambas as cepas têm a capacidade de produzir/armazenar o polímero de reserva glicogênio (DUGUID & WILKINSON, 1953).

### 3.1.1.2 *Alcaligenes* sp

*Alcaligenes* sp ATCC 31961, produtor de um EPS da família do gelano ("gellan gum<sup>TM</sup>"), também conhecido como "rhamsan gum<sup>TM</sup>" ou S-194. Também é um EPS ramificado que contém aproximadamente um grupo O-Acetyl por unidade repetitiva - um hexassacarídeo contendo L-ramnose (1), D-glucose (4) e ácido D-glucurônico (1) (vide figura 15) (JANSSON, LINBERG et al., 1986). Tem excelente compatibilidade com soluções concentradas de sal possuindo aplicação em suspensões fluidas de fertilizantes (COLEGROVE, 1983);

Figura 15 - Estrutura da unidade repetitiva do EPS produzido por *Alcaligenes* sp ATCC 31961



*Alcaligenes* sp 31961Mut, um mutante espontâneo, EPS<sup>-</sup> da cepa *Alcaligenes* ATCC 31961.

Em meio sólido (manutenção), a cepa *Alcaligenes* EPS<sup>+</sup> produz colônias isoladas, amarelas e muito mucóides, que no passar do tempo se tornam altas, mas não se espalhavam como as *Enterobacter* EPS<sup>+</sup>. Em meio líquido (D&M), o *Alcaligenes* EPS<sup>+</sup> cresce e produz grandes quantidades de exopolissacarídeo, tanto com caseína hidrolizada quanto com sulfato de amônio, todavia, a primeira proporcionou uma fase lag mais curta. *Alcaligenes* EPS<sup>-</sup> cresce muito lentamente em meio sólido, formando colônias isoladas, amarelas, rugosas e menores que *Alcaligenes* EPS<sup>+</sup>. Em meio líquido, *Alcaligenes* EPS<sup>-</sup> somente cresce em presença de caseína hidrolizada, mesmo assim, muito lentamente; em meio líquido suas células se aglutinam como as *Enterobacter* EPS<sup>-</sup>. Ambas as cepas têm a capacidade de produzir/armazenar o polímero de reserva poli-β-hidroxibutirato (PHB).

O aspecto mucóide e não mucóide, das colônias de *Enterobacter aerogenes* tipo 8, cultivada em meio de manutenção durante 72 horas e 30 °C, pode ser observado nas figuras 16a e b.

Figura 16a - Aparência de uma cepa mucóide de *E. aerogenes* tipo 8 cultivada em meio sólido

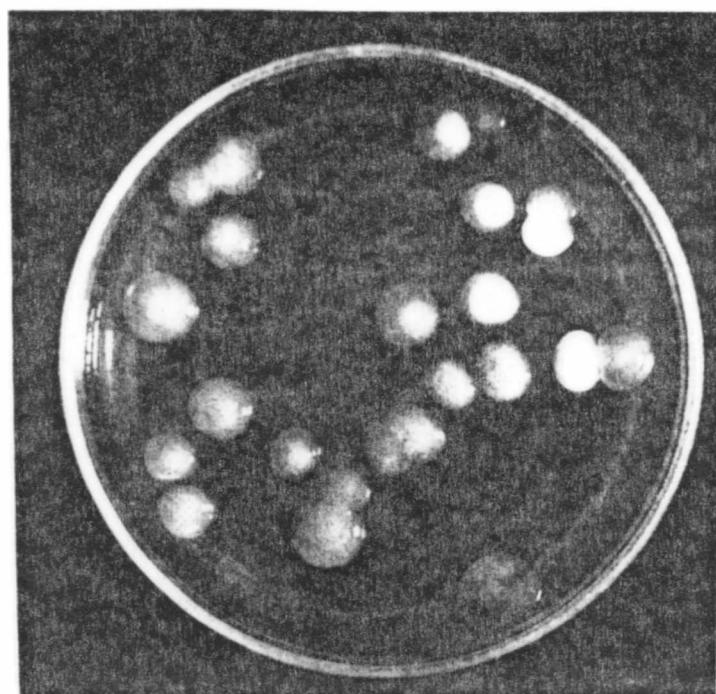
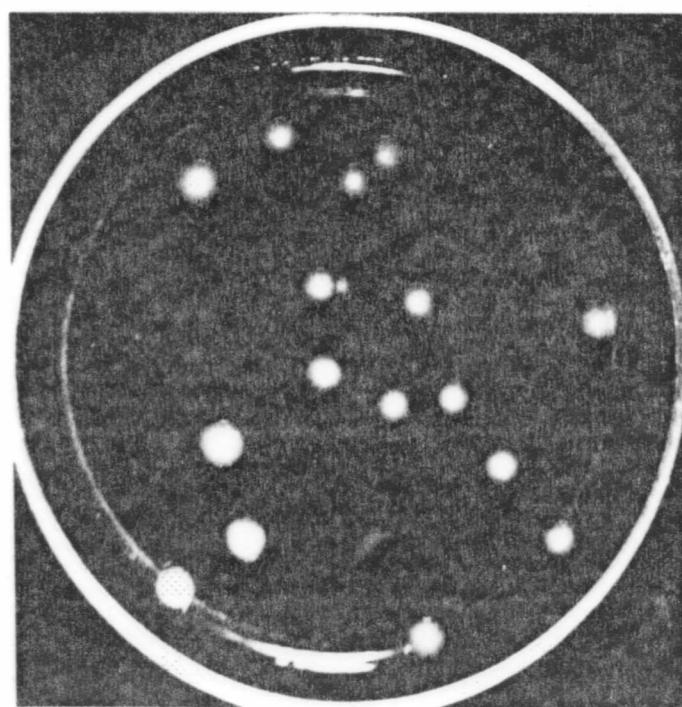


Figura 16b - Aparência de uma cepa não mucóide de *E. aerogenes* tipo 8 cultivada em meio sólido



### 3.1.2 Efeito das concentrações de carbono, nitrogênio e magnésio sobre o crescimento de *Enterobacter* e *Alcaligenes*

#### 3.1.2.1 Efeito da concentração da fonte de carbono no crescimento de *Enterobacter* e *Alcaligenes*

Devido à alta concentração da fonte de nitrogênio empregada (1,0 g/l de sulfato de amônio), espera-se que o único fator restritor ou não do crescimento tenha sido a concentração da fonte de carbono em cada cultivo.

**Tabela 11** - Crescimento máximo ( $DO_{600\text{nm}}$ ) alcançado pelas cepas de *Enterobacter* e *Alcaligenes* em diferentes concentrações de glucose e 1,0 g/l de sulfato de amônio

<i>D</i> -Glucose	<i>Enterobacter</i>		<i>Alcaligenes</i>	
	EPS <sup>+</sup>	EPS <sup>-</sup>	EPS <sup>+</sup>	EPS <sup>-</sup>
1,0	0,736	0,405	0,407	----
2,5	1,321	1,049	1,149	----
5,0	1,698	1,340	1,729	----
10,0	1,825	1,878	2,212	----
20,0	1,848	2,014	2,236	----

A concentrações de *D*-glucose estão expressas em g/l  
Os crescimentos bacterianos estão expressos em absorbância

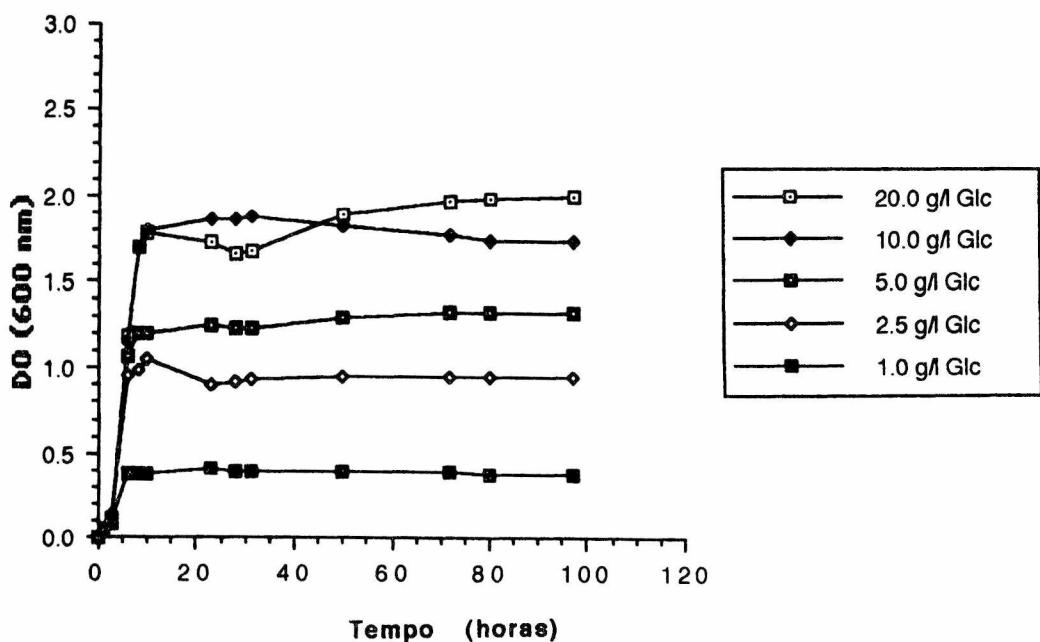
Os meios com 10,0 e 20,0 g/l de glucose proporcionaram excelente crescimento para todas as cepas, apesar de ter havido um ligeiro decréscimo no crescimento com a concentração de 20,0 g/l, para as cepas do gênero *Enterobacter* em torno de 30 horas, podendo isso estar relacionado com o efeito de queda brusca de pH, observado para este gênero em altas concentrações de açúcar (vide figura 17).

Os meios com 5,0 g/l de glucose proporcionaram curvas de crescimento intermediário, contudo estáveis.

Os meios com 1,0 e 2,5 g/l de glucose proporcionaram curvas com baixo crescimento relativamente às outras condições testadas, aparentando que estes cultivos estivessem com o crescimento restringido pela concentração da fonte de carbono.

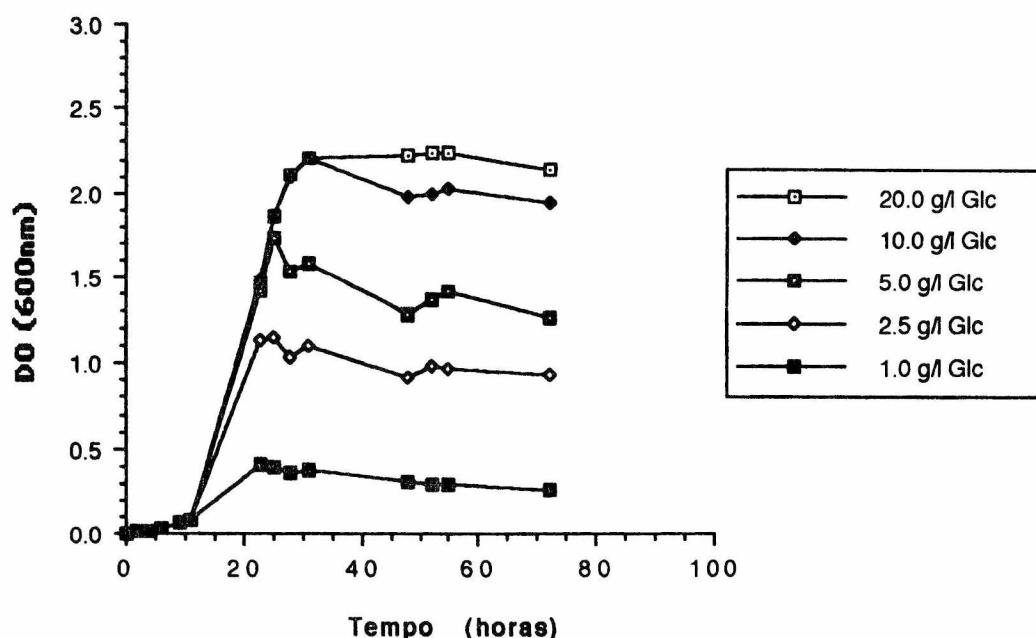
As curvas de crescimento da cepa *Enterobacter* EPS<sup>-</sup> e *Alcaligenes* EPS<sup>+</sup> estão representadas nos figuras 17a e b.

Figura 17a - Perfil de crescimento ( $DO_{600\text{nm}}$ ) da cepa *Enterobacter* EPS<sup>-</sup> em diferentes concentrações de glucose



Valores das leituras da  $DO_{600\text{nm}}$ , extraídos das curvas de crescimento

Figura 17b - Perfil de crescimento ( $DO_{600\text{nm}}$ ) da cepa *Alcaligenes* EPS<sup>+</sup> em diferentes concentrações de glucose



Valores das leituras da  $DO_{600\text{nm}}$ , extraídos das curvas de crescimento

### 3.1.2.2 Efeito da concentração da fonte de nitrogênio no crescimento de *Enterobacter* e *Alcaligenes*

Para assegurar que não haveria interferência de efeito de pH sobre as cepas de *Enterobacter* em alta concentração de açúcar, não se empregou a máxima concentração de glucose como era devido, mas sim 10,0 g/l, uma vez que esta concentração assegurou bom crescimento para todas as cepas no experimento anterior.

**Tabela 12 - Crescimento máximo ( $DO_{600nm}$ ) alcançado pelas cepas de *Enterobacter* e *Alcaligenes* em diferentes concentrações de sulfato de amônio e 10,0 g/l de glucose**

$(NH_4)_2SO_4$	<i>Enterobacter</i>		<i>Alcaligenes</i>	
	EPS <sup>+</sup>	EPS <sup>-</sup>	EPS <sup>+</sup>	EPS <sup>-</sup>
0,1	0,728	0,335	0,567	---
0,25	1,310	0,901	1,328	---
0,5	1,425	1,684	1,904	---
0,75	1,720	1,884	1,972	---
1,0	1,789	1,866	1,885	---

As concentrações de sulfato de amônio estão expressas em g/l  
Os crescimentos estão expressos em absorbância

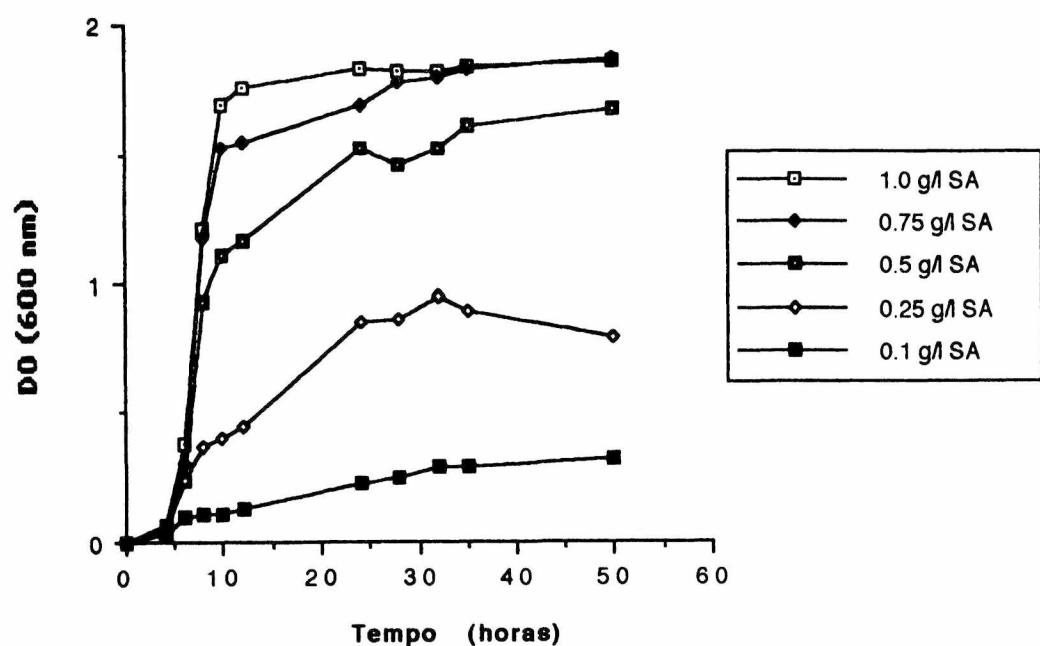
Os meios contendo 0,75 e 1,0 g/l de  $(NH_4)_2SO_4$  proporcionaram o máximo crescimento para todas as cepas, favorecendo grandemente a produção de massa celular. Estes cultivos não demonstraram, portanto, um perfil de cultivo restrinido pela concentração da fonte de nitrogênio, que é conhecidamente uma condição favorável à produção de EPS para a maioria dos microrganismos, sendo por esse motivo rejeitado o emprego destas concentrações em experimentos posteriores.

Os meios contendo 0,5 g/l de  $(NH_4)_2SO_4$  proporcionaram crescimento inferior aos das duas concentrações superiores, contudo os cultivos não apresentaram estar com seus crescimentos restrinidos pela quantidade da fonte de nitrogênio.

Os meios com 0,25 e 0,1 g/l de  $(NH_4)_2SO_4$  proporcionaram menor crescimento relativamente às outras condições testadas, aparentando que estes cultivos estivessem com o crescimento restrinido pela concentração da fonte de nitrogênio.

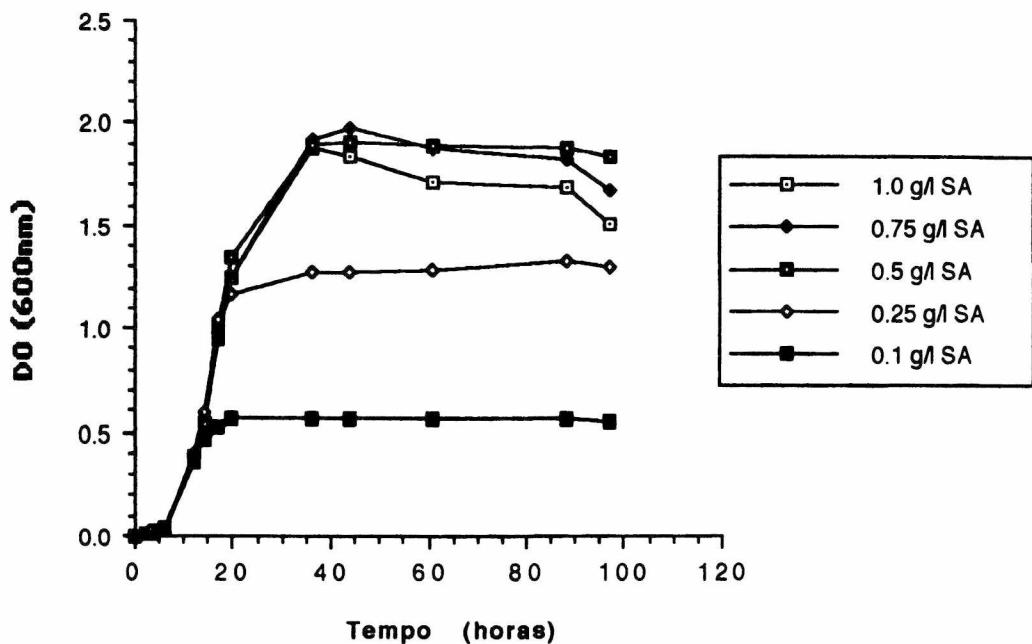
As curvas de crescimento da cepa *Enterobacter* EPS<sup>-</sup> e *Alcaligenes* EPS<sup>+</sup> estão representadas nos figuras 18a e b.

Figura 18a - Perfil de crescimento ( $DO_{600\text{nm}}$ ) da cepa *Enterobacter* EPS<sup>-</sup> em diferentes concentrações de sulfato de amônio



Valores das leituras da  $DO_{600\text{nm}}$ , extraídos das curvas de crescimento

Figura 18b - Perfil de crescimento ( $DO_{600\text{nm}}$ ) da cepa *Alcaligenes* EPS<sup>+</sup> em diferentes concentrações de sulfato de amônio



Valores das leituras da  $DO_{600\text{nm}}$ , extraídos das curvas de crescimento

### 3.1.2.3 Efeito da concentração da fonte de magnésio no crescimento de *Enterobacter* e *Alcaligenes*

Verificado que 10,0 g/l de glucose e 0,5 g/l de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  proporcionavam bom crescimento para todas as cepas (tabelas 11 e 12), estas concentrações foram empregadas em conjunto com cinco concentrações de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .

Tabela 13 - Crescimento máximo ( $DO_{600nm}$ ) alcançado pelas cepas de *Enterobacter* e *Alcaligenes* em diferentes concentrações de sulfato de magnésio e 10 g/l de glucose

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	<i>Enterobacter</i>		<i>Alcaligenes</i>	
	EPS <sup>+</sup>	EPS <sup>-</sup>	EPS <sup>+</sup>	EPS <sup>-</sup>
0,00625	1,164	1,088	1,006	----
0,0125	1,370	1,170	1,544	----
0,0250	1,479	1,145	1,656	----
0,05	1,457	1,180	1,697	----
0,1	1,551	1,144	1,722	----

As concentrações de sulfato de magnésio estão expressas em g/l

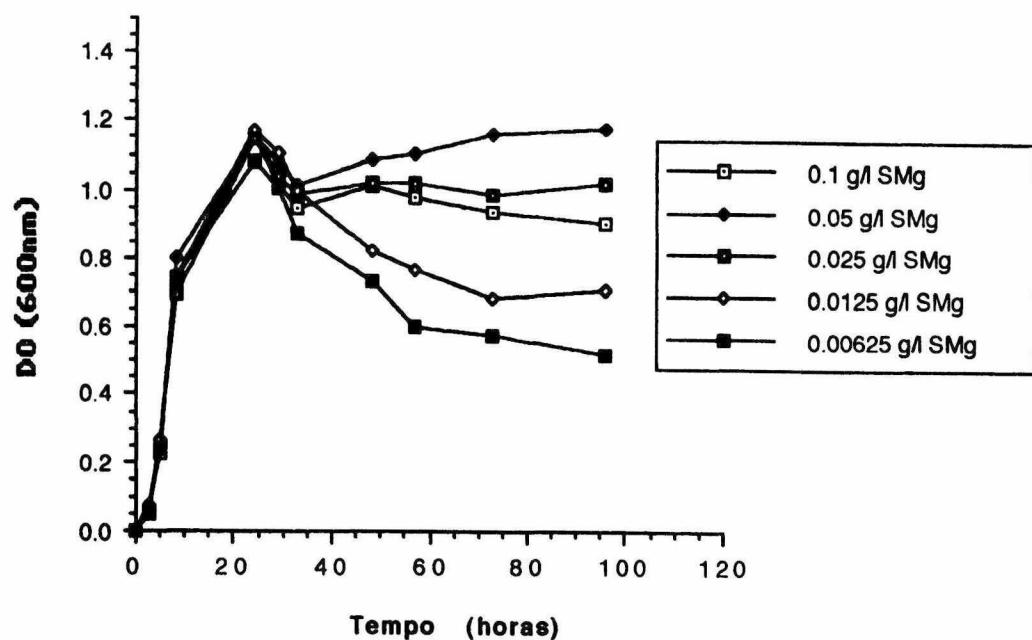
Os crescimentos estão expressos em absorbância

Observou-se que os meios contendo 0,025, 0,05 e 0,1 g/l de  $MgSO_4$  proporcionaram o máximo de crescimento para todas as cepas.

Os meios contendo 0,00625 e 0,0125 g/l de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  proporcionaram, para *Enterobacter*, crescimento máximo aproximado às concentrações superiores testadas; todavia, com curvas descendentes logo após o pico máximo. O gênero *Alcaligenes*, por sua vez, mostrou-se mais sensível à concentração de 0,00625 g/l de sulfato de magnésio.

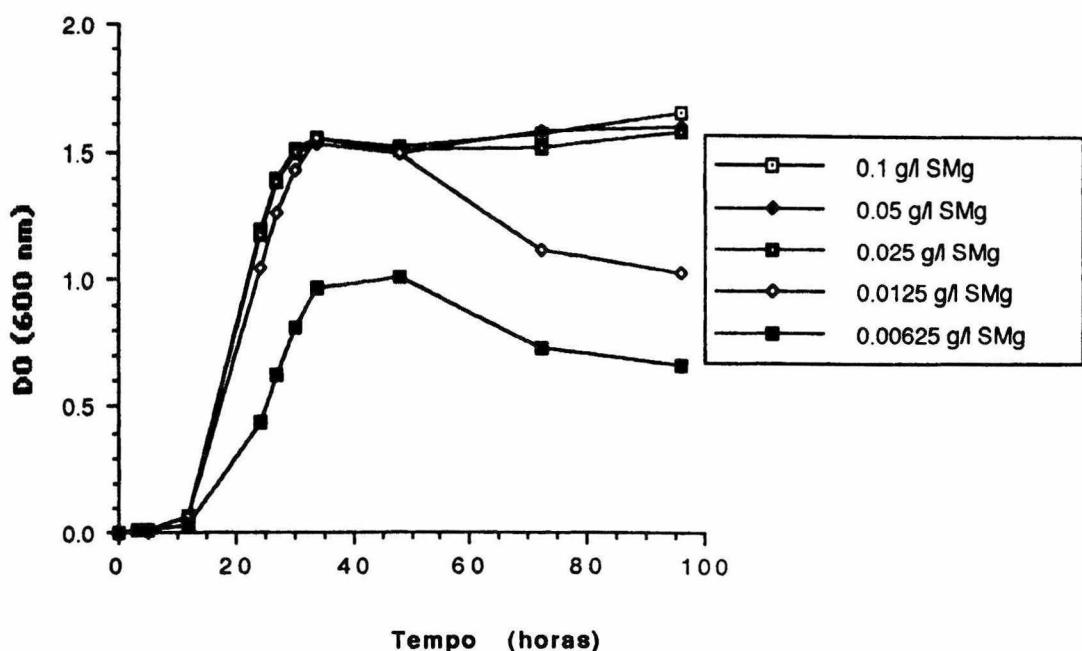
As curvas de crescimento das cepas *Enterobacter* EPS<sup>-</sup> e *Alcaligenes* EPS<sup>+</sup> estão representadas nos figuras 19a e b.

Figura 19a - Perfil de crescimento ( $DO_{600\text{nm}}$ ) da cepa *Enterobacter* EPS<sup>-</sup> em diferentes concentrações de Sulfato de Magnésio (SMg))



Valores das leituras da  $DO_{600\text{nm}}$ , extraídos das curvas de crescimento

Figura 19b - Perfil de crescimento ( $DO_{600\text{nm}}$ ) da cepa *Alcaligenes* EPS<sup>+</sup> em diferentes concentrações de Sulfato de Magnésio (SMg))



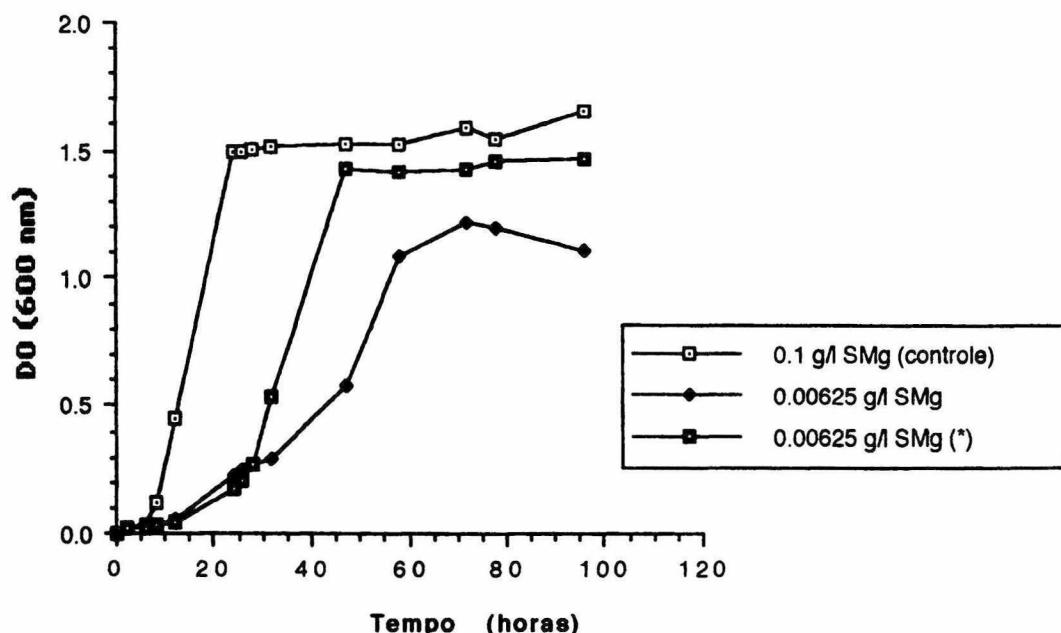
Valores das leituras da  $DO_{600\text{nm}}$ , extraídos das curvas de crescimento

### 3.1.3 Verificação do restabelecimento do crescimento após readição da fonte de magnésio em *Alcaligenes*

Repetidas as curvas de crescimento com 0,00625 e 0,0125 g/l de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , verificou-se que com até 0,0125 g/l era possível assegurar bom crescimento para todas as cepas, estando portanto, o limiar da concentração restritora abaixo de tal valor.

Quando se empregou 0,00625 g/l de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , houve uma mudança drástica no perfil da curva de crescimento, em relação ao controle, que foi restaurada mediante à adição do sal de magnésio às 24 horas de cultivo, resultando numa curva com forma semelhante à da curva controle. Ficou deste modo, demonstrada a restrição do crescimento causado pela insuficiência do íon  $Mg^{2+}$ , e o reestabelecimento do crescimento após a readição do íon (vide figura 20).

Figura 20 - Perfil de crescimento ( $DO_{600nm}$ ) da cepa *Alcaligenes* EPS<sup>+</sup> mediante readição de Sulfato de Magnésio (SMg)



Valores das leituras da  $DO_{600nm}$ , extraídos das curvas de crescimento

0,1 g/l SMg (controle) - concentração presente no meio de D&M

0,00625 g/l SMg - nenhum sal foi adicionado, além do inicial

0,00625 g/l SMg (\*) - uma alíquota do sal de magnésio foi adicionada às 24 horas de cultivo, de modo a obter a concentração inicial do controle

### 3.1.4 Meio de cultivo otimizado para o crescimento de *Enterobacter* e *Alcaligenes*

Após a avaliação das curvas de crescimento para todas as cepas, optou-se pela redução das concentrações de glucose e de sulfato de amônio, na formulação do Meio Basal Modificado de D&M, a fim de controlar a produção de massa celular, na tentativa de minimizar os problemas de troca gasosa decorrentes do aumento da viscosidade nos cultivos das cepas EPS+. Esta composição (abaixo) tornou-se referencial para todas as variações de concentração executadas e discutidas no trabalho:

#### Composição do Meio Basal Modificado de Davis & Mingoli (referencial)

$K_2HPO_4$	7,0 g/l
$KH_2PO_4$	3,0 g/l
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,1 g/l
$(NH_4)_2SO_4$	0,5 g/l ou
Caseína hidrolizada	1,0 g/l
D-glucose	10,0 g/l
Água destilada q.s.p.	1,0 l

### 3.1.5 Efeito da relação de C:N na produção de massa celular, polímeros de reserva e EPS em *Enterobacter* e *Alcaligenes*

No ambiente as bactérias raramente encontram condições que lhes permitam um crescimento contínuo balanceado. Quando os nutrientes são abundantes, as bactérias podem manter velocidades de crescimento relativamente rápidas. Mas o fato das populações bacterianas poderem usar os nutrientes com eficiência, produzindo rápido aumento em sua biomassa, significa que elas estão nutricionalmente famintas a maioria do tempo. Ainda, estes organismos podem sobreviver por períodos extremamente longos na ausência de nutrientes. As condições laboratoriais não refletem exatamente o que as bactérias encontram na natureza; contudo, pode-se simular curtos períodos de disponibilidade nutricional e períodos prolongados de fome para culturas crescendo em meio definido. Na maioria dos meios, as células que estão crescendo exponencialmente usam os nutrientes disponíveis e cessam seu aumento exponencial em biomassa, entrando portanto na fase de cultivo referida como fase estacionária (KOTLER, SIEGELE et al., 1993).

Nas fermentações de muitas bactérias produtoras de EPS em batelada ("batch"), o crescimento celular é tipicamente completado entre 15-20 horas, enquanto que a produção de EPS pode continuar por mais 30-50 horas (SENGHA, ANDERSON et al., 1989); (LINTON, ASH et al., 1991) Portanto, para muitas bactérias a síntese de EPS ocorre tanto durante a fase exponencial quanto na estacionária de crescimento. Durante a síntese do EPS succinoglucan em *Agrobacterium radiobacter*, a incorporação do substrato é o principal ponto de controle do fluxo (CORNISH, GREENWOOD et al., 1988a; CORNISH, GREENWOOD et al., 1988b). Um mutante estável desta bactéria pode ser parcialmente desreprimido em cultivo com excesso de glucose. Isto resultou numa produção de EPS relativamente mais alta. Controles semelhantes podem existir em outras espécies bacterianas produtoras de EPS. A situação, porém, é mais complicada em espécies nas quais, a presença de excesso da fonte de carbono e de um nutriente

limitado tal como nitrogênio, enxofre, magnésio ou fósforo, favorece para que quantidades consideráveis de substrato sejam convertidas tanto a EPS como em polímero de reserva.

**3.1.5.1 Efeito da relação de C:N na produção de massa celular, polímero de reserva e EPS em *Enterobacter* EPS<sup>-</sup> e EPS<sup>+</sup>, crescidos em sulfato de amônio como fonte de nitrogênio**

**Tabela 14 - Crescimento de *Enterobacter aerogenes* em sulfato de amônio como fonte de nitrogênio:**

<i>Enterobacter</i>	PSC <sub>máx</sub> (g/l)		PR <sub>máx</sub> (g/l)		PR <sub>máx</sub> (%PSC <sub>máx</sub> )		PSC <sub>fe</sub> (g/l)	$\pi_{EPS}$ (g/g)	EPS (g/l)	Y <sub>EPS</sub> (%)
	EPS <sup>-</sup>	EPS <sup>+</sup>	EPS <sup>-</sup>	EPS <sup>+</sup>	EPS <sup>-</sup>	EPS <sup>+</sup>				
EC 20 (SA)	0,866	0,711	0,160	0,085	18,5	12,0	0,648	0,819	0,531	3,3
EC 10 (SA)	1,136	0,766	0,453	0,142	39,9	18,5	0,704	0,739	0,520	5,5
EC 05 (SA)	0,686	0,636	0,121	0,068	17,8	11,6	0,590	0,939	0,554	11,4
EC 03 (SA)	0,774	0,712	0,177	0,059	23,3	8,4	0,650	0,234	0,152	5,5
EN/2 (SA)	0,436	0,524	0,181	0,156	42,4	29,7	0,402	0,856	0,344	3,7
Mg/16 (SA)	0,886	0,822	0,259	0,273	30,4	33,6	0,722	1,148	0,829	8,0

PSC<sub>máx</sub> (g/l) - a máxima massa celular obtida no cultivo, que é coincidente com o máximo acúmulo do polímero de reserva (PR)

PR<sub>máx</sub> (g/l) - o máximo acúmulo absoluto do polímero de reserva obtido no cultivo

PR<sub>máx</sub> (%PSC<sub>máx</sub>) - o máximo acúmulo do polímero de reserva, representado como o percentual em relação à massa celular

PSC<sub>fe</sub> (g/l) - a média aritmética das massas celulares na fase estacionária

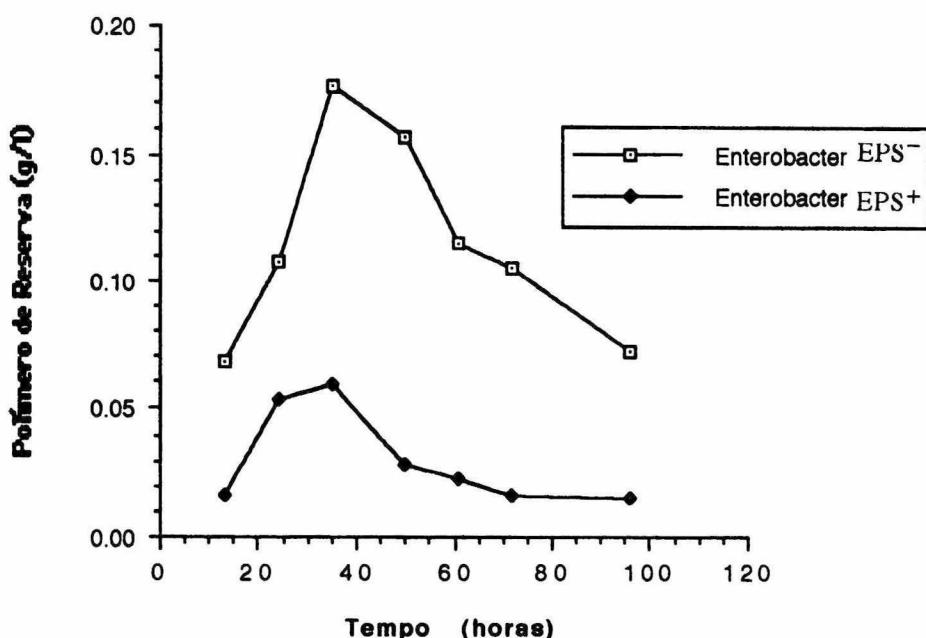
$\pi_{EPS}$  (g/g) - a relação entre a máxima produção absoluta de EPS pela média aritmética das massas celulares na fase estacionária (EPS/PSC<sub>fe</sub>)

EPS (g/l) - a máxima produção absoluta do polissacarídeo extracelular

Y<sub>EPS</sub> (%) - o fator de conversão da glucose consumida em polissacarídeo extracelular, ao final do cultivo

observa-se que, com exceção da condição EMg/16, a cepa de *Enterobacter* EPS<sup>-</sup> produziu maior quantidade, tanto absoluta (g/l) quanto relativamente à massa celular (%PSC) do que a cepa *Enterobacter* EPS<sup>+</sup> (vide figuras 21, 22, 23, 24 e tabela 14).

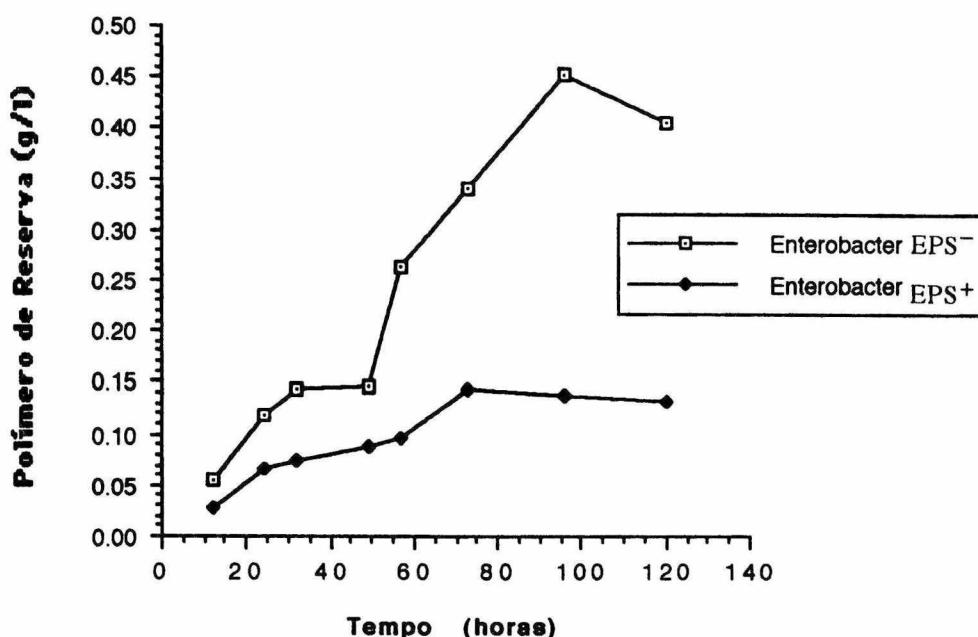
Figura 21 - Curvas comparativas de produção/degradação do polímero de reserva em *Enterobacter* EPS<sup>-</sup> e EPS<sup>+</sup>, crescido na presença de sulfato de amônio, na condição EC 03



Valores expressos em g/l de glicogênio, extraídos do experimento EC 03 (SA). 31 = EPS<sup>-</sup>; 87 = EPS<sup>+</sup>

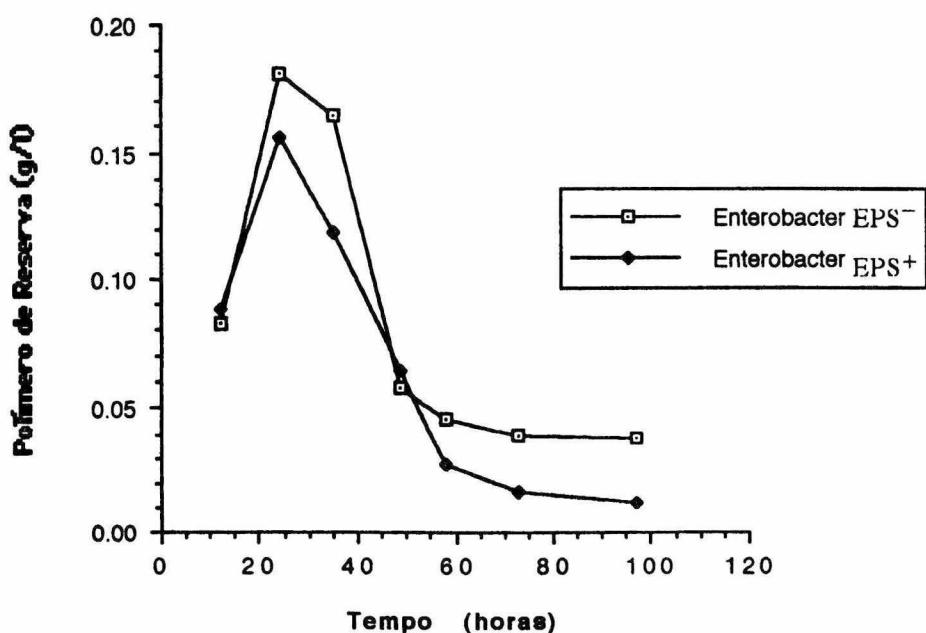
Comparando-se a produção de polímero de reserva no meio EN/2 em relação ao EC 10, a condição daquele difere deste apenas pela concentração da fonte de nitrogênio, verifica-se que as cepas *Enterobacter* EPS<sup>-</sup> e EPS<sup>+</sup>, na condição EN/2, não apresentaram um perfil de produção do polímero intracelular semelhante ao EC 10, mas sim, um perfil de produção/degradação muito semelhante ao do EC 20, cujas proporções de C : N se equivalem (14,7 : 1). Provavelmente, o rápido início da degradação, também tenha sido devido à queda brusca de pH, em valores próximos a 4, para ambas as cepas (vide figuras 22, 23 e 24).

Figura 22 - Curvas comparativas de produção/degradação do polímero de reserva em *Enterobacter* EPS<sup>-</sup> e EPS<sup>+</sup>, crescido na presença de sulfato de amônio, na condição EC 10



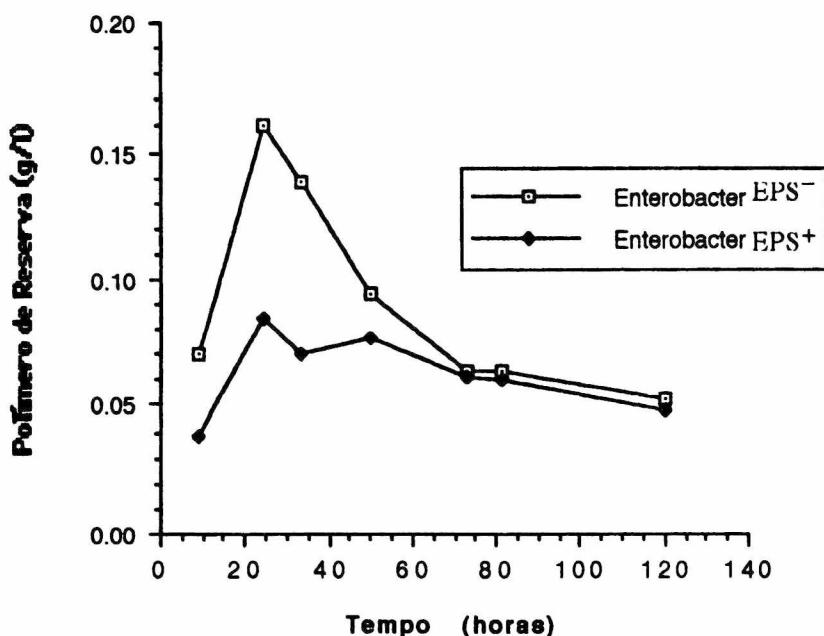
Valores expressos em g/l de glicogênio, extraídos do experimento EC 10 (SA). 31 = EPS<sup>-</sup>; 87 = EPS<sup>+</sup>

Figura 23 - Curvas comparativas de produção/degradação do polímero de reserva em *Enterobacter* EPS<sup>-</sup> e EPS<sup>+</sup>, crescido na presença de sulfato de amônio, na condição EN/2



Valores expressos em g/l de glicogênio, extraídos do experimento EN/2 (SA). 31 = EPS<sup>-</sup>; 87 = EPS<sup>+</sup>

Figura 24 - Curvas comparativas de produção/degradação do polímero de reserva em *Enterobacter* EPS<sup>-</sup> e EPS<sup>+</sup>, crescido na presença de sulfato de amônio, na condição EC 20



Valores expressos em g/l de glicogênio, extraídos do experimento EC 20 (SA). 31 = EPS<sup>-</sup>; 87 = EPS<sup>+</sup>

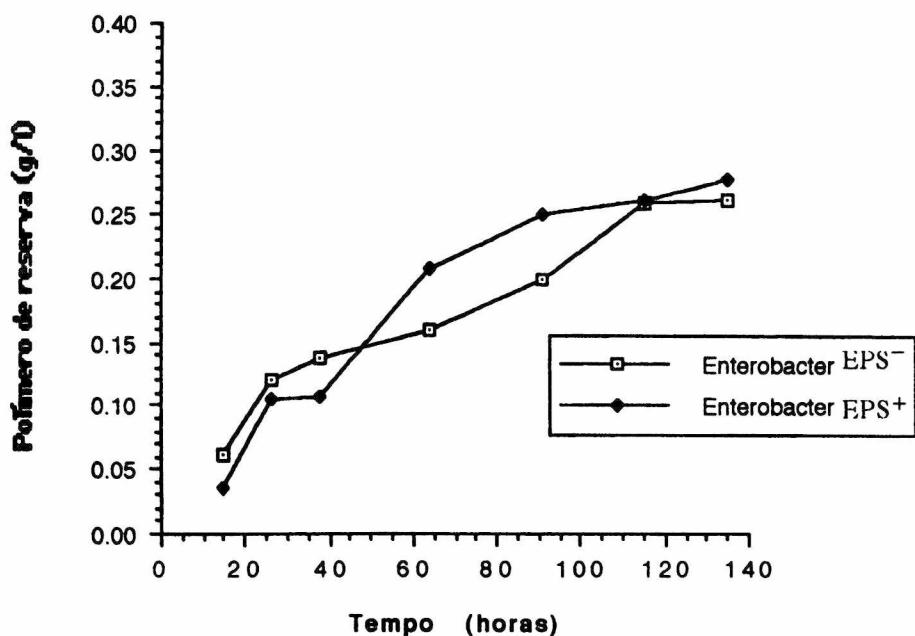
Para a cepa *Enterobacter* EPS<sup>-</sup>, na condição EN/2 em relação ao EC 10, observa-se ter havido um pequeno aumento (6%) no acúmulo do polímero intracelular (%PSC), apesar de ter ocorrido uma queda de 60% na quantidade absoluta (g/l), uma vez que também houve aproximadamente a mesma diminuição na produção de massa celular. Já a cepa *Enterobacter* EPS<sup>+</sup>, apresentou um aumento de 60% no acúmulo do polímero intracelular (%PSC), mas de apenas 10% na quantidade absoluta (g/l). Apesar de ter ocorrido um aumento de 16% na produção relativa ( $\pi_{EPS}$ ), não houve melhora na produção absoluta (g/l) nem no rendimento ( $Y_{EPS}$ ) do exopolissacarídeo (vide tabela 14).

Com a condição EMg/16, ambas as cepas de *Enterobacter* apresentaram um perfil de acúmulo progressivo do polímero de reserva, semelhante ao EC 10, sendo inclusive uma das exceções onde *Enterobacter* EPS<sup>+</sup> acumulou mais do que *Enterobacter* EPS<sup>-</sup> (vide figuras 22 e 25). Em relação ao EC 10, *Enterobacter* EPS<sup>+</sup> teve um aumento no polímero intracelular de 82% relativo à massa celular (%PSC) e de 92% na quantidade absoluta (g/l); havendo também um aumento de 59% na produção absoluta (g/l), 45% no rendimento ( $Y_{EPS}$ ) e 55% na

produção relativa ( $\pi_{EPS}$ ) do exopolissacarídeo (vide tabela 14). A cepa *Enterobacter* EPS<sup>-</sup> sofreu diminuição tanto na quantidade absoluta quanto no acúmulo intracelular do polímero de reserva.

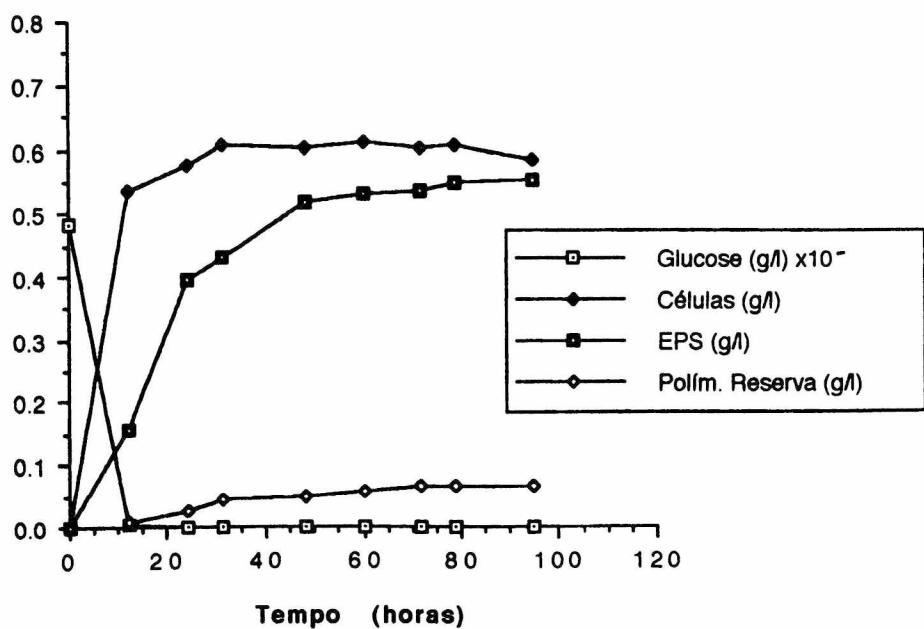
Dentre os experimentos com a fonte de carbono (EC), empregando-se a cepa *Enterobacter* EPS<sup>+</sup>, com sulfato de amônio como fonte de nitrogênio, a condição EC 05 (SA) foi a que apresentou o melhor rendimento ( $Y_{EPS}$ ) em exopolissacarídeo, a maior produção relativa ( $\pi_{EPS}$ ), o segundo menor acúmulo de polímero de reserva (g/l ou %PSC) e a menor produção de massa celular (PSC<sub>máx</sub>); além de ter produzido aproximadamente a mesma quantidade de exopolissacarídeo com 1/2 e 1/4 da glucose dos experimentos EC 10 e EC 20 respectivamente.(vide tabela 14 e figura 26a). A cepa *Enterobacter* EPS<sup>-</sup> na condição EC 05, em relação a todas condições testadas, apresentou o menor acúmulo do polímero de reserva (g/l ou %PSC) (vide tabela 14 e figura 26b). A condição EC 03 (SA), como se esperava pela baixa relação C : N, apresentou para *Enterobacter* EPS<sup>+</sup> o menor acúmulo do polímero de reserva (g/l ou %PSC), a menor produção absoluta (g/l) e relativa ( $\mu$ ) do exopolissacarídeo; todavia, proporcionou um rendimento ( $Y_{EPS}$ ) em exopolissacarídeo equivalente ao EC 10 (SA).

Figura 25 - Curvas comparativas de produção/degradação do polímero de reserva em *Enterobacter* EPS<sup>-</sup> e EPS<sup>+</sup>, crescido na presença de sulfato de amônio, na condição Mg/16



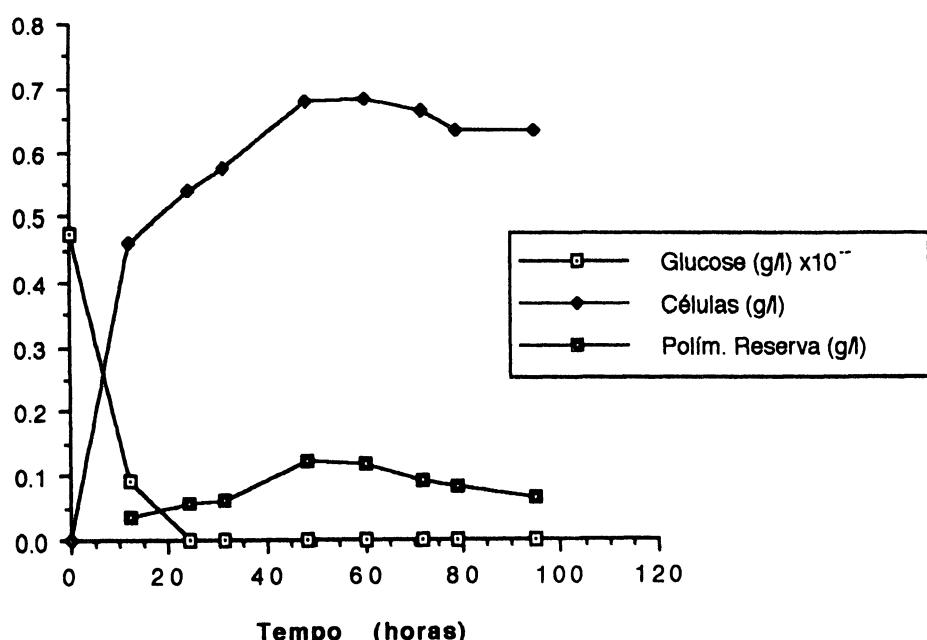
Valores expressos em g/l de glicogênio, extraídos do experimento EMg/16 (SA). 31 = EPS<sup>-</sup>; 87 = EPS<sup>+</sup>

Figura 26a - Perfil de produção de massa celular, EPS, polímero de reserva e consumo de glucose durante o cultivo de *Enterobacter* EPS<sup>+</sup> na condição EC 05 (SA)



*Enterobacter* 87 = EPS<sup>+</sup>

Figura 26b - Perfil de produção de massa celular, polímero de reserva e consumo de glucose durante o cultivo de *Enterobacter* EPS<sup>-</sup> na condição EC 05 (SA)



*Enterobacter* 31 = EPS<sup>-</sup>

**3.1.5.2 Efeito da relação de C:N na produção de massa celular, polímeros de reserva e EPS em *Enterobacter* EPS<sup>-</sup> e EPS<sup>+</sup>, crescidos em caseína hidrolizada como fonte de nitrogênio**

**Tabela 15 - Crescimento de *Enterobacter aerogenes* em caseína hidrolizada como fonte de nitrogênio**

<i>Enterobacter</i>	PSC <sub>máx</sub> (g/l)	PR <sub>máx</sub> (g/l)	PR <sub>máx</sub> (%PSC <sub>máx</sub> )	PSC <sub>fe</sub> (g/l)	$\pi_{EPS}$ (g/g)	EPS (g/l)	Y <sub>EPS</sub> (%)			
	EPS <sup>-</sup>	EPS <sup>+</sup>	EPS <sup>-</sup>	EPS <sup>+</sup>	EPS <sup>-</sup>	EPS <sup>+</sup>	EPS <sup>-</sup>	EPS <sup>+</sup>		
EC 20 (CH)	0,581	0,680	0,132	0,196	22,8	28,9	0,606	1,318	0,799	5,4
EC 10 (CH)	0,735	0,633	0,253	0,232	34,4	36,8	0,569	1,650	0,939	10,0
EC 05 (CH)	0,852	0,598	0,300	0,130	35,2	21,8	0,555	1,286	0,714	14,0
EC 03 (CH)	0,842	0,624	0,486	0,185	57,7	29,6	0,559	0,751	0,420	15,0
EN/2 (CH)	0,329	0,363	0,091	0,099	27,8	27,4	0,281	2,808	0,789	8,1
Mg/16 (CH)	0,541	0,579	0,154	0,120	28,5	20,8	0,520	2,063	1,073	11,3

PSC<sub>máx</sub> (g/l) - a máxima massa celular obtida no cultivo, que é coincidente com o máximo acúmulo do polímero de reserva (PR)

PR<sub>máx</sub> (g/l) - o máximo acúmulo absoluto do polímero de reserva obtido no cultivo

PR<sub>máx</sub> (%PSC<sub>máx</sub>) - o máximo acúmulo do polímero de reserva, representado como o percentual em relação à massa celular

PSC<sub>fe</sub> (g/l) - a média aritmética das massas celulares na fase estacionária

$\pi_{EPS}$  (g/g) - a relação entre a máxima produção absoluta de EPS pela média aritmética das massas celulares na fase estacionária (EPS/PSC<sub>fe</sub>)

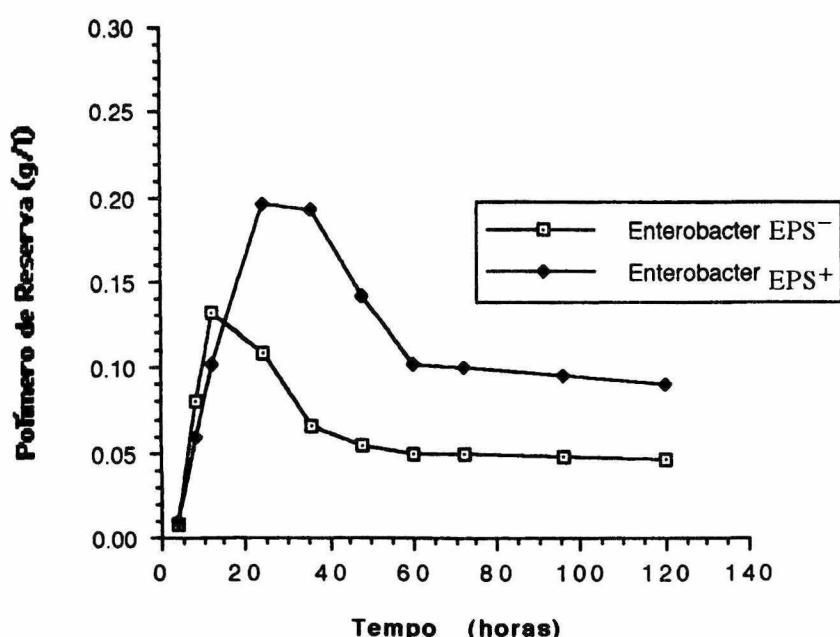
EPS (g/l) - a máxima produção absoluta do polissacarídeo extracelular

Y<sub>EPS</sub> (%) - o fator de conversão da glucose consumida em polissacarídeo extracelular, ao final do cultivo

Diferente de quando se utilizou sulfato de amônio como fonte de nitrogênio, com a caseína hidrolizada a cepa *Enterobacter* EPS<sup>+</sup> superou *Enterobacter* EPS<sup>-</sup>, na produção absoluta do polímero de reserva, nas duas condições onde se empregaram as razões molares C:N de 13,9 : 1 (EC 20 e EN/2). Ambas as condições apresentaram queda de pH abaixo de 5,00 e um pico de máximo acúmulo do polímero intracelular entre 12-24 horas, com posterior

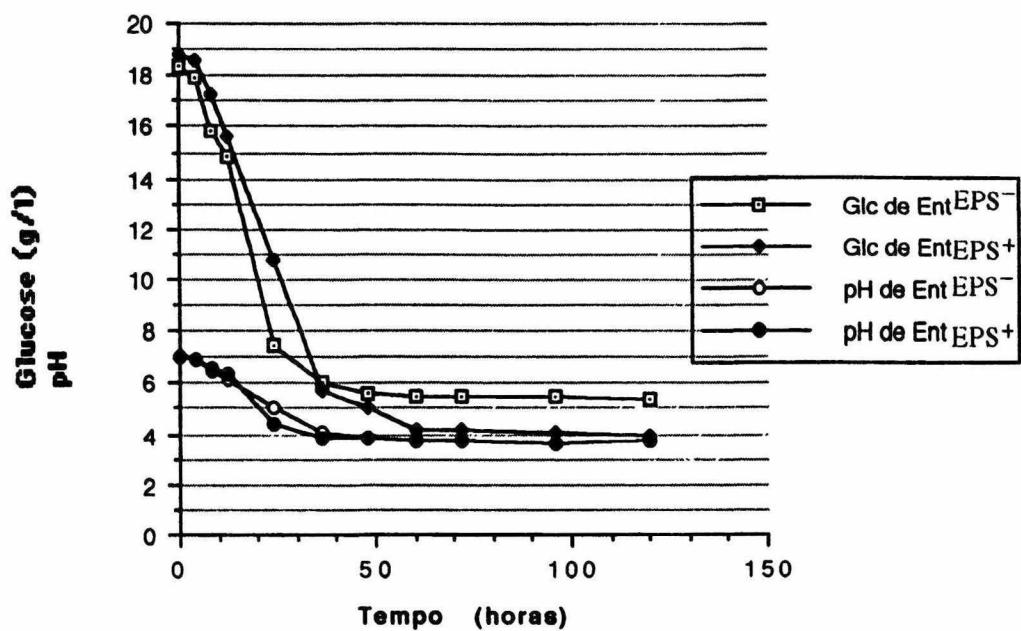
degradação, mesmo quando ainda havia glucose no meio de cultura (vide figuras 27a e b; e 28a e b). Comparando-se EC 20 e EN/2 em relação ao EC 10, não houve melhoria na produção absoluta (g/l) nem no rendimento ( $Y_{EPS}$ ) do exopolissacarídeo; mas apenas um aumento na produção relativa ( $\pi_{EPS}$ ) do exopolissacarídeo com EN/2, já que devido à restrição da fonte de nitrogênio, sua massa celular foi reduzida à metade (vide tabela 15).

Figura 27a - Curvas comparativas de produção/degradação do polímero de reserva em *Enterobacter* EPS<sup>-</sup> e EPS<sup>+</sup>, crescido na presença de caseína hidrolizada, na condição EC 20



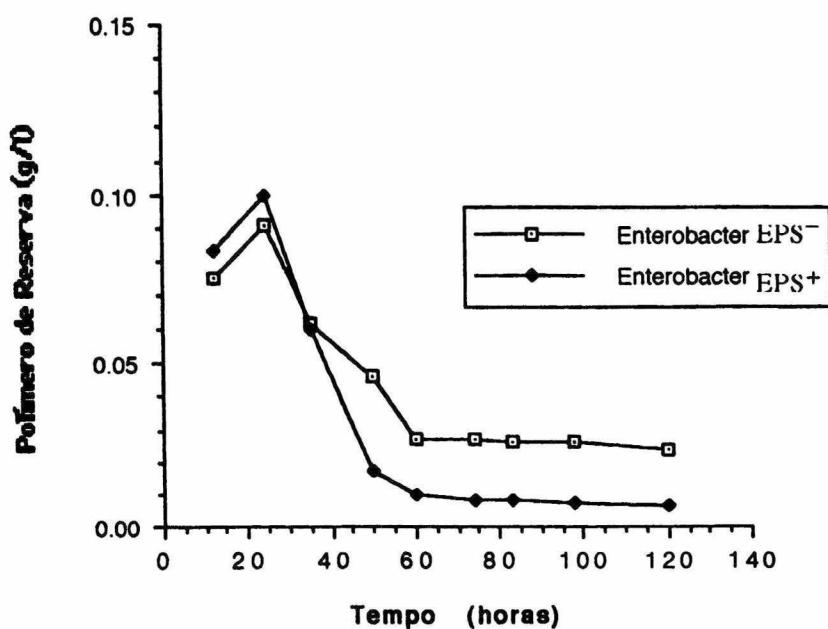
Valores expressos em g/l de glicogênio, extraídos do experimento EC 20 (CH). 31 = EPS<sup>-</sup>; 87 = EPS<sup>+</sup>

Figura 27b - Curvas comparativas do consumo da glucose e pH em *Enterobacter* EPS<sup>-</sup> e EPS<sup>+</sup>, crescido na presença de caseína hidrolizada, na condição EC 20



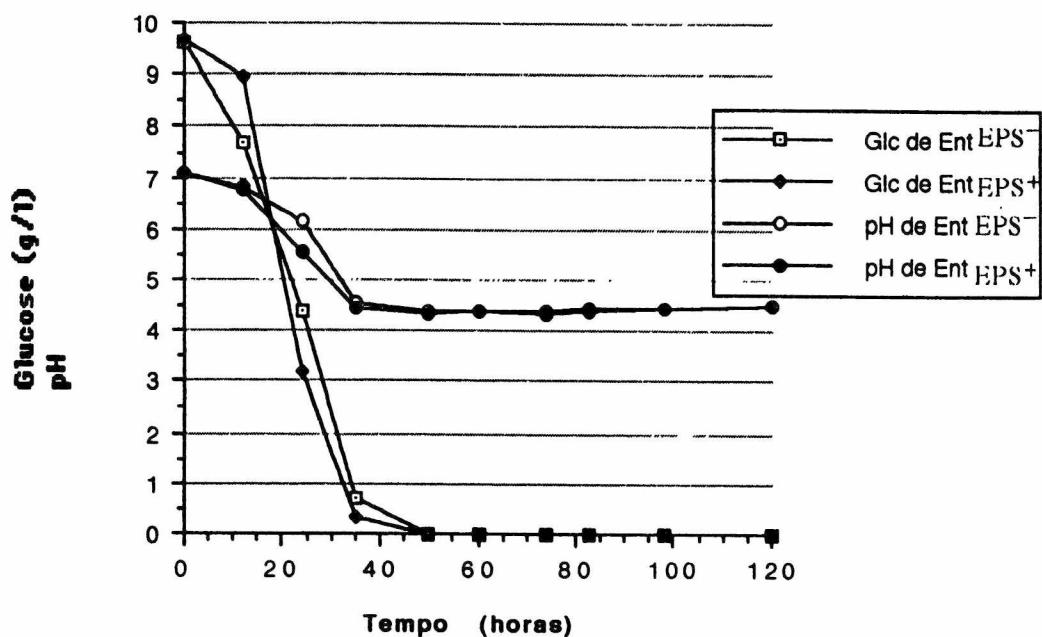
Valores extraídos do experimento EC 20 (CH). 31 = EPS<sup>-</sup>; 87 = EPS<sup>+</sup>

Figura 28a - Curvas comparativas de produção/degradação do polímero de reserva em *Enterobacter* EPS<sup>-</sup> e EPS<sup>+</sup>, crescido na presença de caseína hidrolizada, na condição EN/2



Valores expressos em g/l de glicogênio, extraídos do experimento EN/2 (CH). 31 = EPS<sup>-</sup>; 87 = EPS<sup>+</sup>

Figura 28b - Curvas comparativas de consumo de glucose e pH em *Enterobacter* EPS<sup>-</sup> e EPS<sup>+</sup>, crescido na presença de caseína hidrolizada, na condição EN/2



Valores extraídos do experimento EN/2 (CH). 31 = EPS<sup>-</sup>; 87 = EPS<sup>+</sup>

Com a condição EC 10 (CH) pode ser observado que as duas cepas de *Enterobacter* acumularam intracelularmente quantidades equivalentes do polímero de reserva, mas com diferentes padrões de produção/degradação; *Enterobacter* EPS<sup>+</sup> acumulou rapidamente seus 36,8% (%PSC), entrou num patamar, e após 64 horas iniciou sua rápida degradação, concomitante com o segundo "arranque" na produção do exopolissacarídeo (vide figura 30) Por sua vez, *Enterobacter* EPS<sup>-</sup> acumulou lentamente (34,4%), até aproximadamente 90 horas de cultivo, quando iniciou sua degradação (vide figura 29) Ambas as cepas consumiram a glucose extracelular dentro de 40 horas de cultivo.

Figura 29 - Perfil de produção de massa celular, polímero de reserva e consumo de glucose durante o cultivo de *Enterobacter* EPS<sup>-</sup> na condição EC 10 (CH)

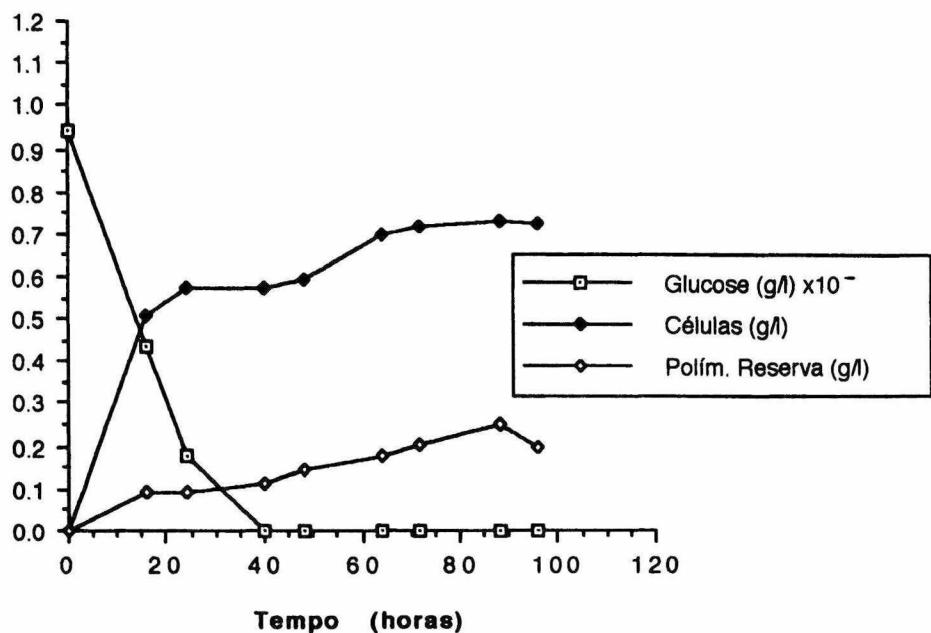
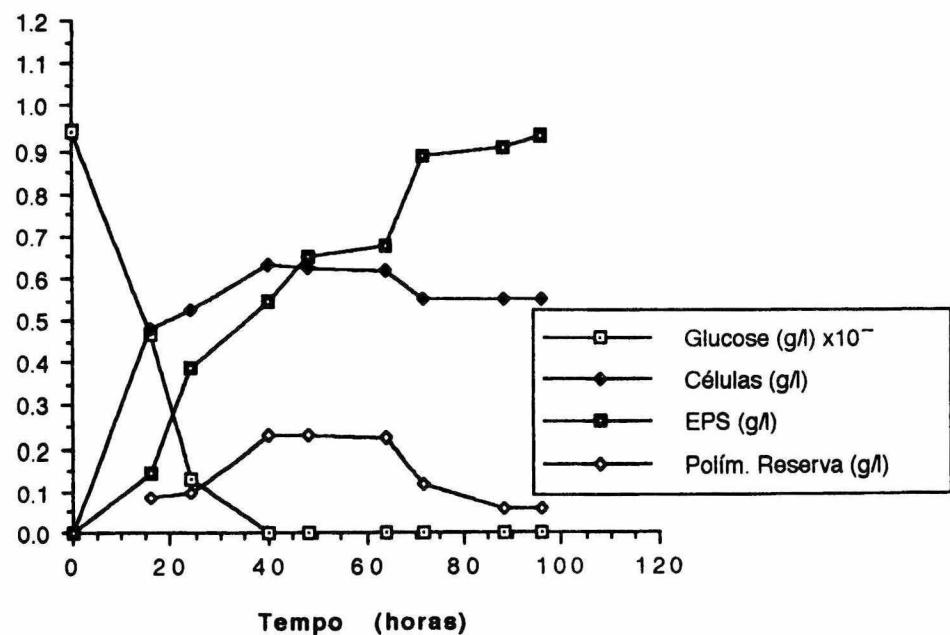


Figura 30 - Perfil de produção de massa celular, EPS, polímero de reserva e consumo de glucose durante o cultivo de *Enterobacter* EPS<sup>+</sup> na condição EC 10 (CH)

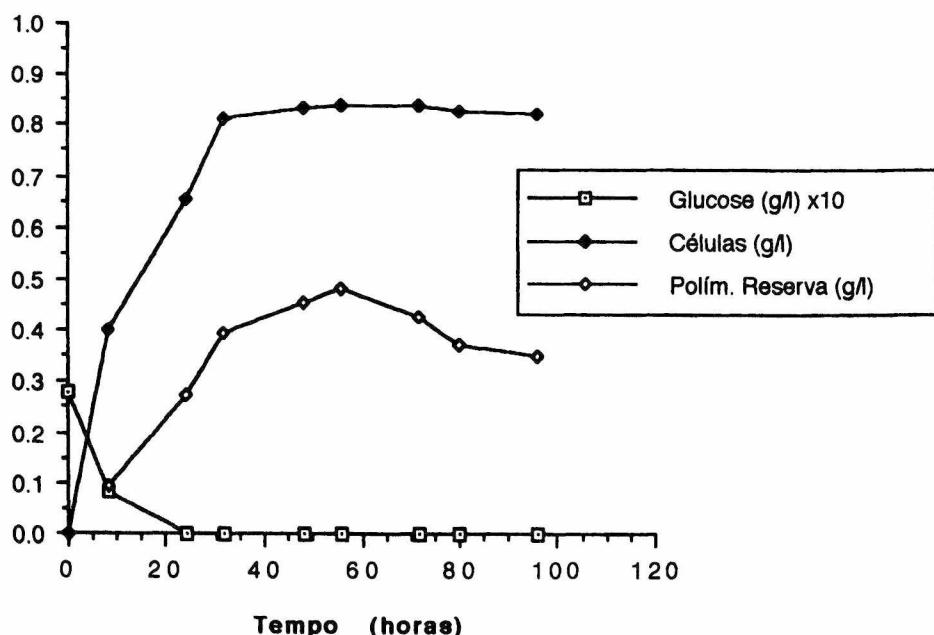


Levando-se em conta que os cultivos de *Enterobacter* EPS<sup>+</sup>, nas condições EC 10, EC 05 e EC 03, continham inicialmente 9,41, 5,08 e 2,80 g/l de glucose respectivamente, e que estes experimentos produziram quantidades de massa celular equivalentes, na fase estacionária, verifica-se que à medida que diminuiu a razão molar C : N, houve aumento de rendimentos na produção do exopolissacarídeo e da massa celular, mas decréscimo na produção relativa ( $\pi_{EPS}$ ) do primeiro.

A redução de concentração na fonte de nitrogênio e magnésio, em relação ao EC 10, para 1/2 e 1/16 respectivamente, aumentou a produção relativa ( $\pi_{EPS}$ ) do exopolissacarídeo em ambas as condições; contudo, não proporcionou melhoria em rendimento do exopolissacarídeo no EN/2, provavelmente devido à queda de pH para valores abaixo de 4,5 às 35 horas de cultivo, quando a produção do exopolissacarídeo foi interrompida. Uma vez mais, verificou-se o efeito de queda brusca de pH (vide figura 28b), para ambas as cepas, com razões molares de C : N  $\geq 13,9 : 1$ .

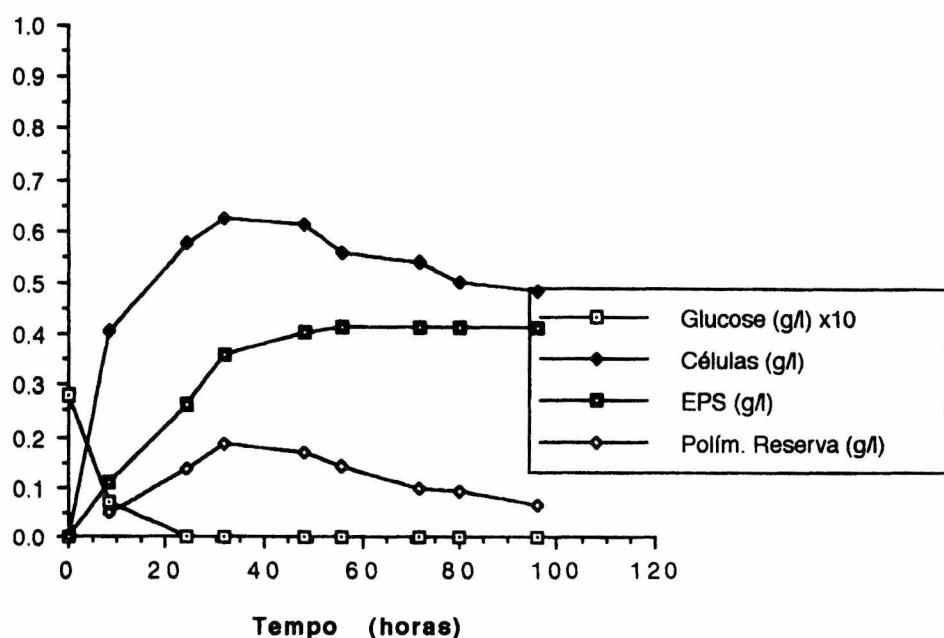
Contrariamente ao EC 03 (SA), *Enterobacter* EPS<sup>-</sup> e EPS<sup>+</sup> produziram no EC 03 (CH) grandes quantidades do polímero intracelular, superando em mais de 100% em relação ao primeiro. Foi inclusive a condição onde *Enterobacter* EPS<sup>-</sup> acumulou maior quantidade do polímero (0,486 g/l ou 57,7% (%PSC)) (vide figura 31). Entre todas as condições experimentadas, esta foi na qual *Enterobacter* EPS<sup>+</sup> obteve seu melhor rendimento de exopolissacarídeo ( $Y_{EPS}$ ), uma vez que produziu menos de 50% da quantidade absoluta do polímero de reserva produzido por *Enterobacter* EPS<sup>-</sup> na mesma condição (vide tabela 15 e figuras 31 e 32).

Figura 31 - Perfil de produção de massa celular, polímero de reserva e consumo de glucose durante o cultivo de *Enterobacter* EPS<sup>-</sup> na condição EC 03 (CH)



*Enterobacter* 31 = EPS<sup>-</sup>

Figura 32 - Perfil de produção de massa celular, EPS, polímero de reserva e consumo de glucose durante o cultivo de *Enterobacter* EPS<sup>+</sup> na condição EC 03 (CH)



*Enterobacter* 87 = EPS<sup>+</sup>

### 3.1.5.3 Efeito comparativo entre as duas fontes de nitrogênio na produção de massa celular, polímeros de reserva e EPS em *Enterobacter* EPS<sup>+</sup>

Tabela 16 - Crescimento de *Enterobacter* EPS<sup>+</sup> em cultivos comparativos variando-se a fonte de nitrogênio

Condição	$\pi_{EPS}$ (g/g)		PR <sub>máx</sub> (g/l)		PR <sub>máx</sub> (%PSC <sub>máx</sub> )		EPS (g/l)		Y <sub>EPS</sub> (%)	
	SA	CH	SA	CH	SA	CH	SA	CH	SA	CH
EC 20	0,819	1,318	0,085	0,196	12,0	28,9	0,531	0,799	3,3	5,4
EC 10	0,739	1,650	0,142	0,232	18,5	36,8	0,520	0,939	5,5	10,0
EC 05	0,939	1,286	0,068	0,130	11,6	21,8	0,554	0,714	11,4	14,0
EC 03	0,234	0,751	0,059	0,185	8,4	29,6	0,152	0,420	5,5	15,0
EN/2	0,856	2,808	0,156	0,099	29,7	27,4	0,344	0,789	3,7	8,1
EMg/16	1,148	2,063	0,273	0,120	33,6	20,8	0,829	1,073	8,0	11,3

$\pi_{EPS}$  (g/g) - a relação entre a máxima produção absoluta de EPS pela média aritmética das massas celulares na fase estacionária (EPS/PSC<sub>fe</sub>)

PR<sub>máx</sub> (g/l) - o máximo acúmulo absoluto do polímero de reserva obtido no cultivo

PR<sub>máx</sub> (%PSC<sub>máx</sub>) é o máximo acúmulo do polímero de reserva, representado como o percentual em relação à massa celular

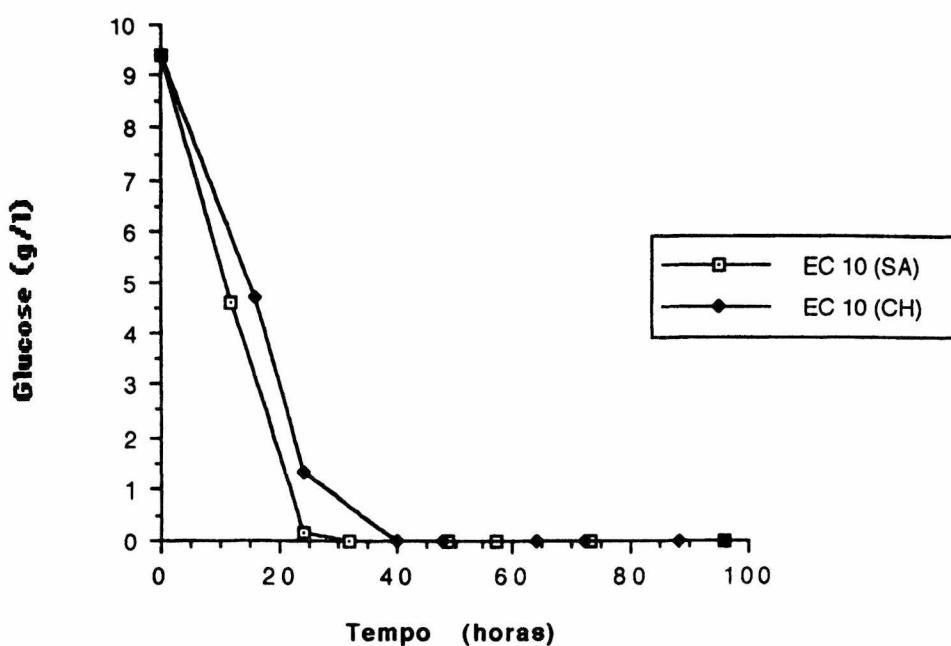
EPS (g/l) - a máxima produção absoluta do polissacarídeo extracelular

Y<sub>EPS</sub> (%) - o fator de conversão da glucose consumida em polissacarídeo extracelular, ao final do cultivo

Em condições nutricionais semelhantes, onde a variável foi a natureza da fonte de nitrogênio (inorgânica ou orgânica), observou-se para a cepa *Enterobacter* EPS<sup>+</sup>:

- a) Maior velocidade de consumo da glucose quando sulfato de amônio foi empregado, sugerindo que a glucose também foi requisitada para a síntese de elementos nitrogenados, além de suas funções estruturais e energéticas (vide figura 33)

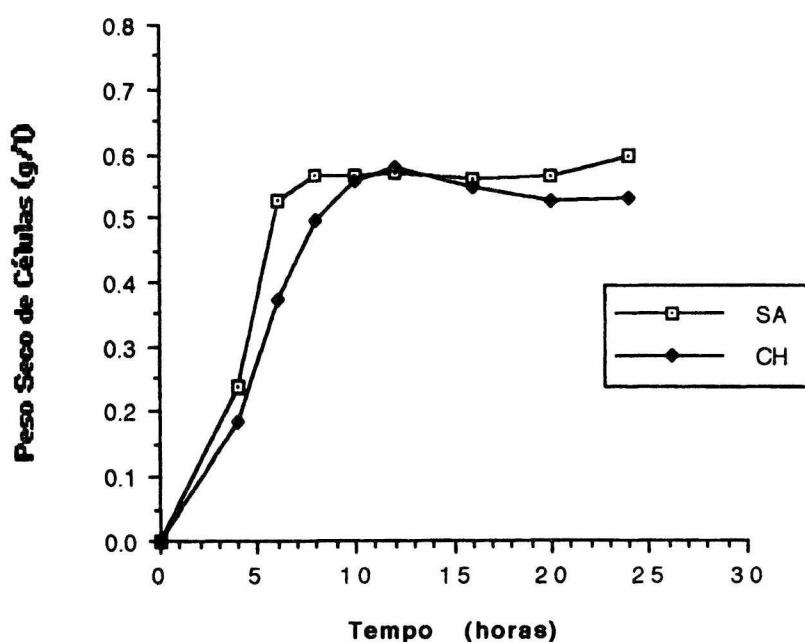
Figura 33 - Perfil de consumo da glucose (g/l) pela cepa *Enterobacter* EPS<sup>+</sup> crescida em presença das duas fontes de nitrogênio (SA ou CH)



Valores expressos em g/l de glucose residual , extraídos dos experimentos EC 10 (SA) e EC 10 (CH)

b) Maior velocidade de produção da massa celular quando sulfato de amônio foi empregado, sugerindo que este organismo encontra-se bem adaptado em consumir a fonte inorgânica de nitrogênio; além do fato que, para esta fonte de nitrogênio inorgânica, apenas um sistema de transporte está envolvido (NEIDHARDT, INGRAHAM et al., 1990). Não houve fase lag com nenhuma das fontes de nitrogênio (vide figura 34)

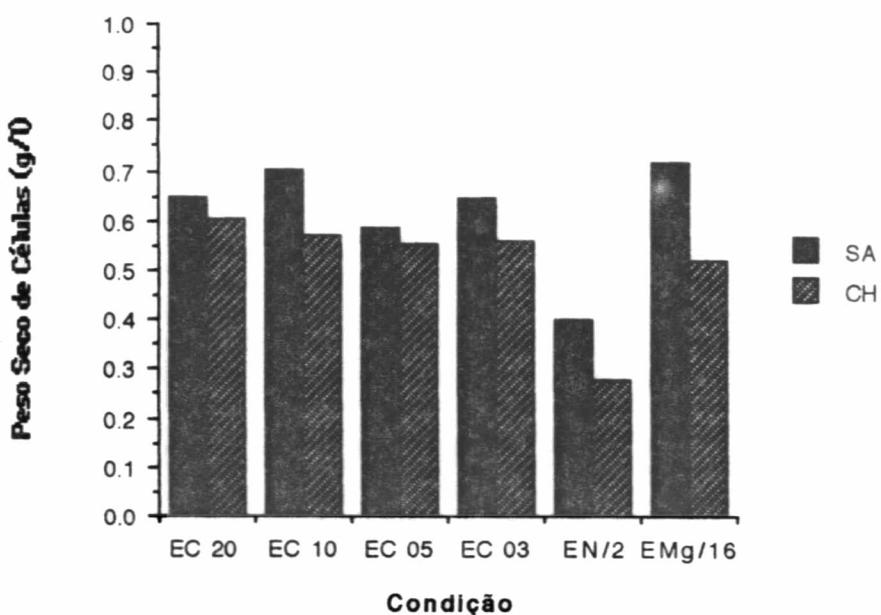
Figura 34 - Perfil de produção da massa celular (g/l) pela cepa *Enterobacter* EPS<sup>+</sup>, crescida no meio de D&M referencial, na presença das duas fontes de nitrogênio (SA ou CH)



Valores expressos em peso seco de células (g/l), extraídos de curvas de crescimento comparativas entre o emprego de sulfato de amônio e caseína hidrolizada como fontes de nitrogênio.

- c) Menor concentração celular média na fase estacionária, quando caseína hidrolizada foi utilizada, talvez pelo fato de não ter havido uma correspondência molar, em nitrogênio, entre 0,5 g/l de sulfato de amônio e 1,0 g/l de caseína hidrolizada, como havia sido previsto; ou devido à necessidade de  $\text{NH}_4^+$  no metabolismo do microrganismo; ou ainda devido a relação C:N ter sido diferente nas duas fontes de nitrogênio (vide tabelas 14, 15 e figura 35).

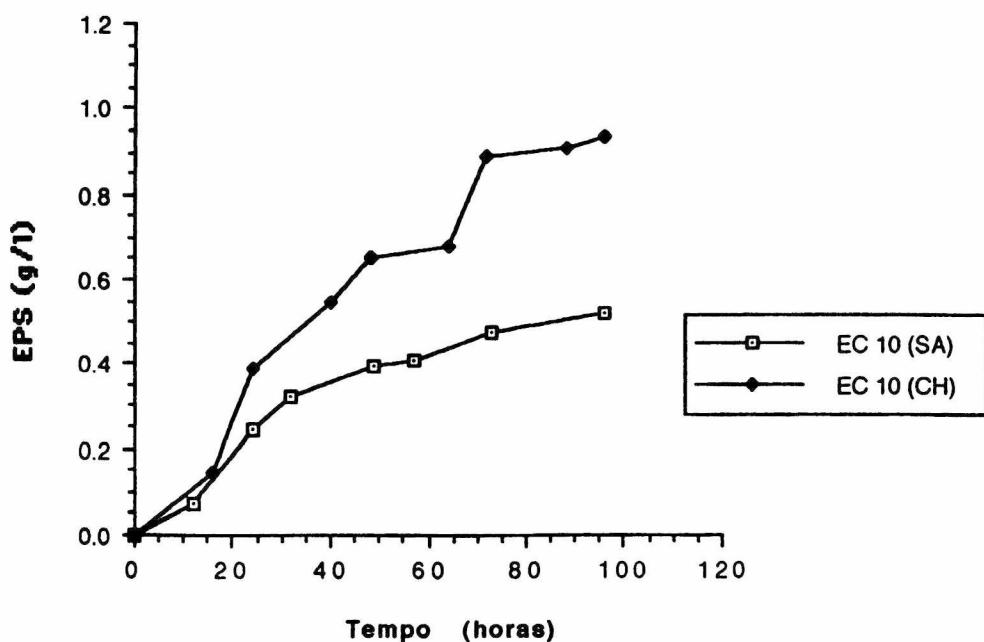
Figura 35 - Média da produção de massa celular, na fase estacionária, pela cepa *Enterobacter* EPS<sup>+</sup>, crescida na presença das duas fontes de nitrogênio (SA ou CH)



Os valores extraídos dos experimentos indicados, representam a média aritmética dos pesos seco de células (g/l), na fase estacionária

- d) Maior velocidade de produção absoluta do exopolissacarídeo, quando caseína hidrolizada foi utilizada (vide figura 36a)

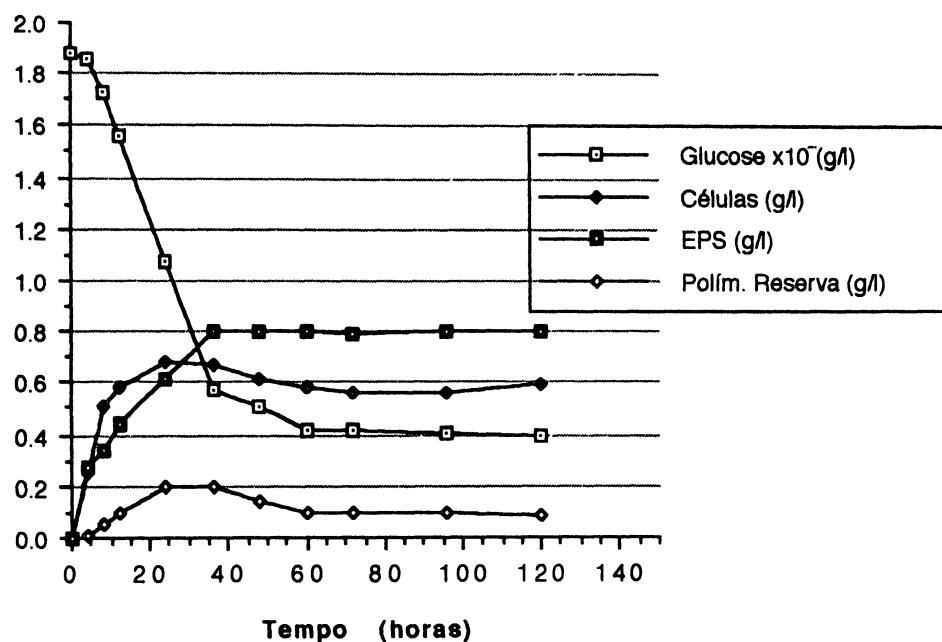
Figura 36a - Perfil da produção absoluta do exopolissacarídeo (g/l) pela cepa *Enterobacter* EPS<sup>+</sup> nas duas fontes de nitrogênio (SA ou CH)



Valores expressos em g/l de exopolissacarídeo produzido, extraídos dos experimentos EC 10 (SA) e EC 10 (CH)

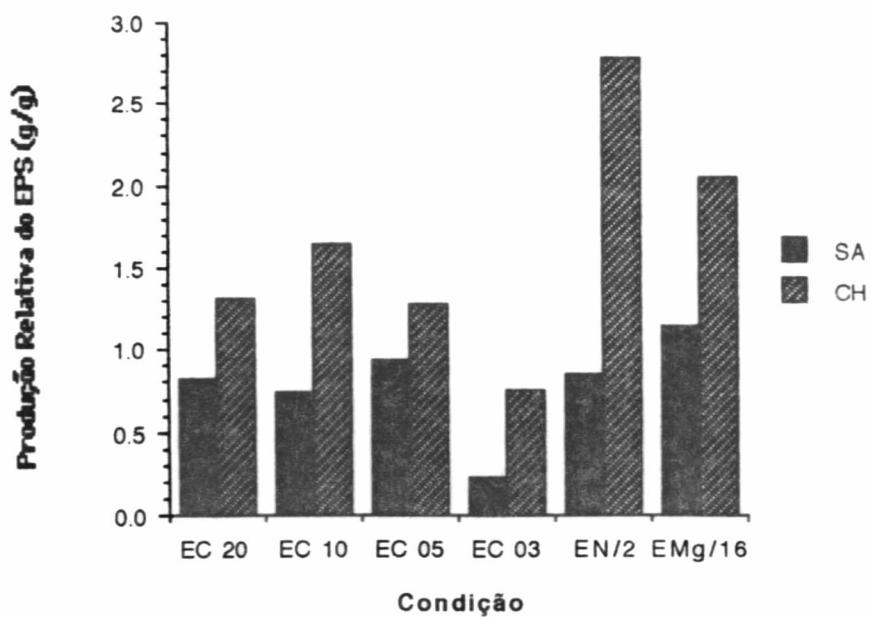
Uma vez que, nos cultivos com caseína hidrolizada, deve ter ocorrido uma menor demanda de glucose para a síntese de elementos nitrogenados, mais esqueletos carbônicos foram canalizados para a produção de EPS. Além disso, pode ter havido produção de EPS às custas de caseína hidrolizada. Nas quatro primeiras horas de cultivo do experimento EC 20 (CH) houve a produção de 0,273 g/l de EPS e 0,254 g/l de massa celular, enquanto que apenas 0,210 g/l de glucose haviam sido consumidas no mesmo período (vide figura 36b);

Figura 36b - Perfil de produção de massa celular, EPS, polímero de reserva e consumo de glucose durante o cultivo de *Enterobacter* EPS<sup>+</sup> na condição EC 20 (CH)



- e) Maior produção relativa ( $\pi_{EPS}$ ) do exopolissacarídeo quando caseína hidrolizada foi empregada (vide tabela 16 e figura 37)

Figura 37 - Produção relativa do exopolissacarídeo ( $\pi_{EPS}$ ) pela cepa *Enterobacter* EPS<sup>+</sup>, crescida na presença das duas fontes de nitrogênio (SA ou CH)

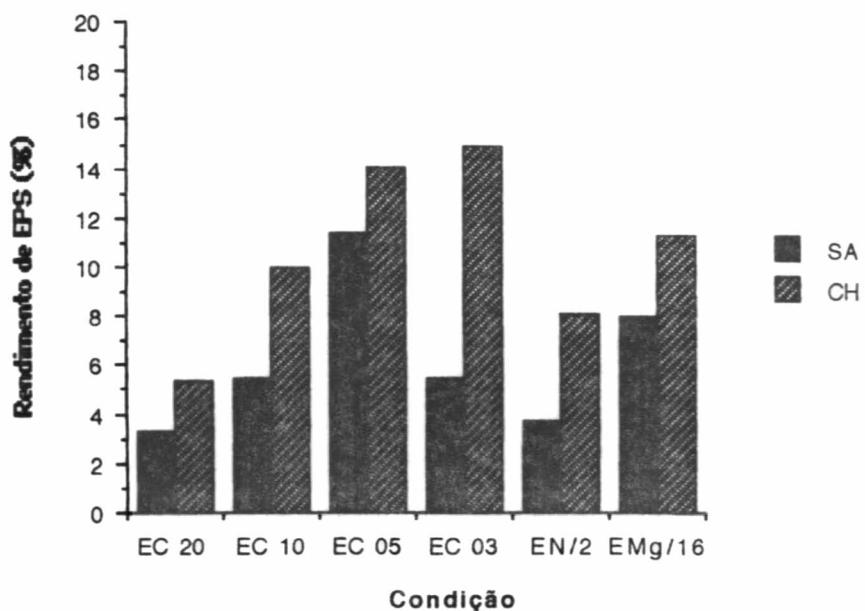


Valores expressos em grama de EPS por grama de células, na fase estacionária, e retirados dos experimentos indicados

$\pi_{EPS}$  (g/g) - a relação entre a máxima produção absoluta de EPS pela média aritmética das massas celulares na fase estacionária (EPS/PSC<sub>fe</sub>)

- f) Maior rendimento de exopolissacarídeo ( $Y_{EPS}$ ) quando caseína hidrolizada foi empregada (vide tabela 16 e figura 38).

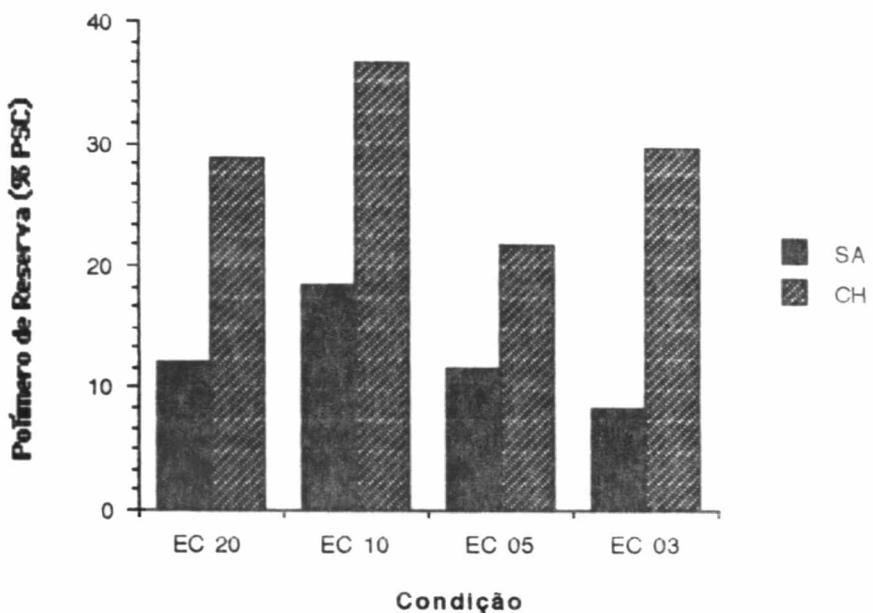
Figura 38 - Rendimento de exopolissacarídeo ( $Y_{EPS}$ ) pela cepa *Enterobacter* EPS<sup>+</sup>, crescida na presença das duas fontes de nitrogênio (SA ou CH)



Valores expressos como a percentagem e retirados dos experimentos indicados  
 $Y_{EPS}$  (%) - o fator de conversão da glucose consumida em polissacarídeo extracelular, ao final do cultivo

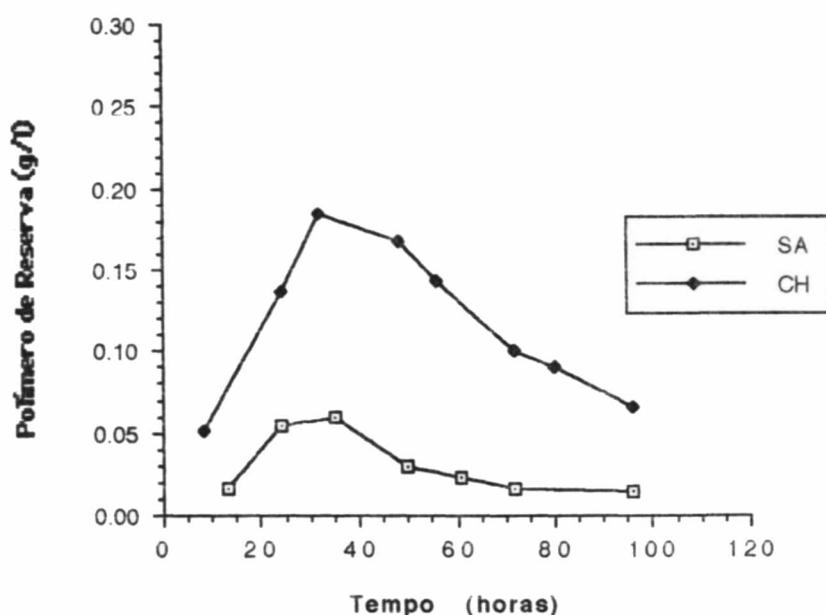
- g) Maior produção do polímero intracelular (tanto absoluta quanto relativa à massa celular), em todos os cultivos com variação na concentração da fonte de carbono (EC 20, 10, 05 e 03), quando a fonte de nitrogênio foi caseína hidrolizada (vide tabela 16 e figuras 39a e b)

Figura 39a - Máximo acúmulo do polímero de reserva ( $PR_{máx}$ ) relativo à massa celular (%PSC), pela cepa *Enterobacter* EPS<sup>+</sup>, crescida na presença das duas fontes de nitrogênio (SA ou CH)



Valores expressos como a percentagem, retirados dos experimentos indicados  
 $PR_{máx}$  (%PSC<sub>máx</sub>) - o máximo acúmulo do polímero de reserva, representado como o percentual em relação à massa celular

Figura 39b - Curvas comparativas de produção/degradação do polímero de reserva pela cepa *Enterobacter* EPS<sup>+</sup> nas duas fontes de nitrogênio (SA ou CH)



Valores expressos em g/l de glicogênio, e extraídos dos experimentos EC 03 (SA) e EC 03 (CH)

**3.1.5.4 Efeito da relação de C:N na produção de massa celular, polímeros de reserva e EPS em *Alcaligenes* EPS<sup>+</sup> em sulfato de amônio como fonte de nitrogênio**

**Tabela 17 - Crescimento de *Alcaligenes* sp em sulfato de amônio como fonte de nitrogênio:**

	PSC <sub>máx</sub> (g/l)	PR <sub>máx</sub> (g/l)	PR <sub>máx</sub> (%PSC <sub>máx</sub> )	PSC <sub>fe</sub> (g/l)	π <sub>EPS</sub> (g/g)	EPS (g/l)	Y <sub>EPS</sub> (%)			
<i>Alcaligenes</i>	EPS <sup>+</sup>	EPS <sup>-</sup>	EPS <sup>+</sup>	EPS <sup>-</sup>	EPS <sup>+</sup>	EPS <sup>-</sup>	EPS <sup>+</sup>	EPS <sup>+</sup>	EPS <sup>+</sup>	EPS <sup>+</sup>
EC 20 (SA)	0,852	---	0,169	---	19,8	---	0,725	2,519	1,826	12,1
EC 10 (SA)	0,886	---	0,134	---	15,1	---	0,884	2,314	2,046	21,5
EC 05 (SA)	0,772	---	0,157	---	24,5	---	0,650	1,532	0,996	19,9
EC 03 (SA)	0,616	---	0,066	---	10,8	---	0,549	0,699	0,384	13,2
EN/2 (SA)	0,440	---	0,070	---	15,9	---	0,381	3,475	1,324	15,9
Mg/16 (SA)	0,290	---	0,011	---	3,8	---	0,264	2,197	0,580	8,5

PSC<sub>máx</sub> (g/l) - a máxima massa celular obtida no cultivo, que é coincidente com o máximo acúmulo do polímero de reserva (PR)

PR<sub>máx</sub> (g/l) - o máximo acúmulo absoluto do polímero de reserva obtido no cultivo

PR<sub>máx</sub> (%PSC<sub>máx</sub>) - o máximo acúmulo do polímero de reserva, representado como o percentual em relação à massa celular

PSC<sub>fe</sub> (g/l) - a média aritmética das massas celulares na fase estacionária

π<sub>EPS</sub> (g/g) - a relação entre a máxima produção absoluta de EPS pela média aritmética das massas celulares na fase estacionária (EPS/PSC<sub>fe</sub>)

EPS (g/l) - a máxima produção absoluta do polissacarídeo extracelular

Y<sub>EPS</sub> (%) - o fator de conversão da glucose consumida em polissacarídeo extracelular, ao final do cultivo

Para este organismo (*Alcaligenes* EPS<sup>+</sup>), quando crescido em meio com sulfato de amônio como fonte de nitrogênio, a restrição da fonte de magnésio conduziu a uma redução quase que total na produção do polímero intracelular (PHB). Em relação ao EC 10 (SA), a redução de concentração das fontes de nitrogênio (EN/2) e magnésio (EMg/16) não proporcionou um aumento na produção absoluta (g/l) nem no rendimento (Y<sub>EPS</sub>) do exopolissacarídeo, mas apenas um aumento da produção relativa (π<sub>EPS</sub>), resultante da marcada

diminuição da massa celular em *Alcaligenes* EPS<sup>+</sup> (vide tabela 17). Contrário ao EC 10, ambos os cultivos (EN/2 e EMg/16) não consumiram a fonte de carbono exógena, mesmo após 120 horas de cultivo (vide figuras 40a, b e c)

Dentre os experimentos com a fonte de carbono (EC), a condição EC 10, foi a que demonstrou o melhor rendimento em exopolissacarídeo (21,5%), superando EC 20 na produção absoluta (g/l), apesar de possuir apenas a metade da concentração inicial de glucose. Em EC 20 (SA). *Alcaligenes* EPS<sup>+</sup> deixou 27% da glucose inicial após 120 horas, quando o experimento foi interrompido.

Em geral, a produção do polímero de reserva (PHB) não ultrapassou 25% (%PSC), representando não mais de 170 mg por litro de meio de cultura, comparando-se a mais de 2 gramas de exopolissacarídeo na mesma unidade de volume. Nos experimentos onde toda a glucose foi consumida (EC 10, 05 e 03), o máximo de acúmulo e o início da degradação do polímero intracelular (PHB) estão relacionados ao total consumo da fonte de carbono exógena (vide figura 40a).

Figura 40a - Perfil de produção de massa celular, EPS, polímero de reserva e consumo de glucose durante o cultivo de *Alcaligenes* EPS<sup>+</sup> na condição EC 10 (SA)

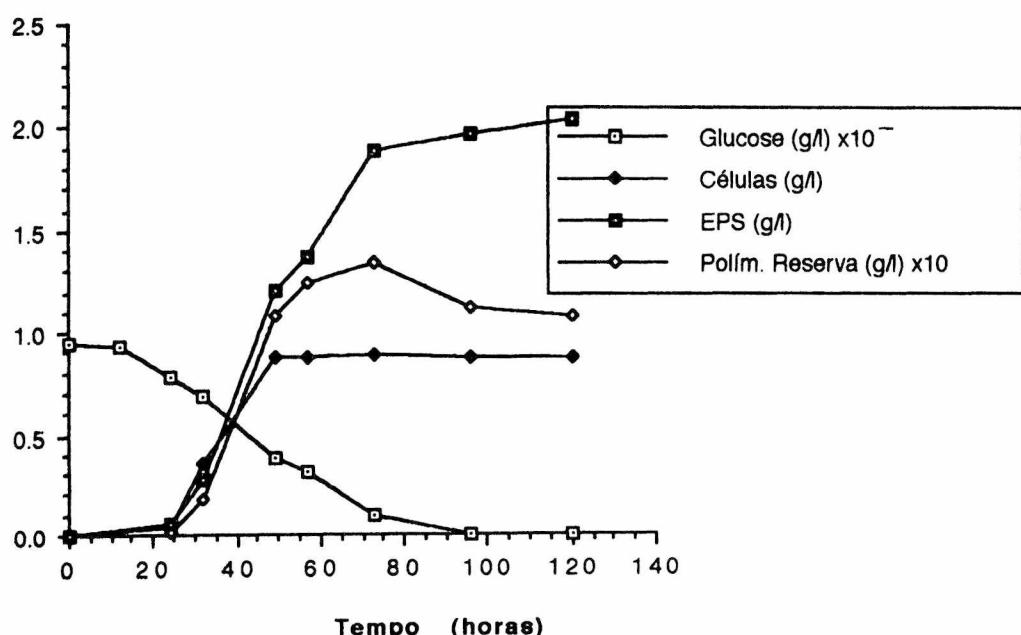


Figura 40b - Perfil de produção de massa celular, EPS, polímero de reserva e consumo de glucose durante o cultivo de *Alcaligenes* EPS<sup>+</sup> na condição EN/2 (SA)

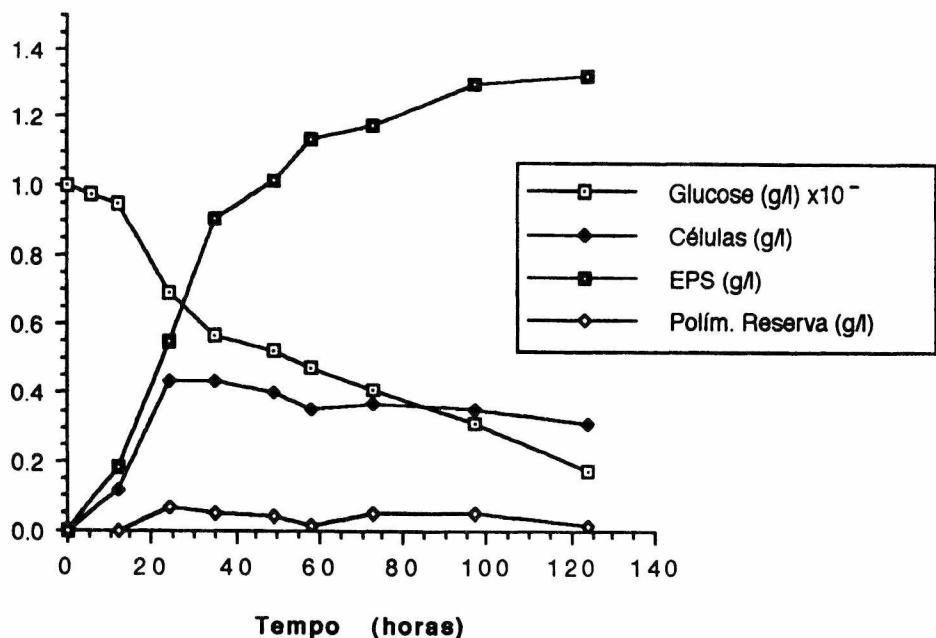
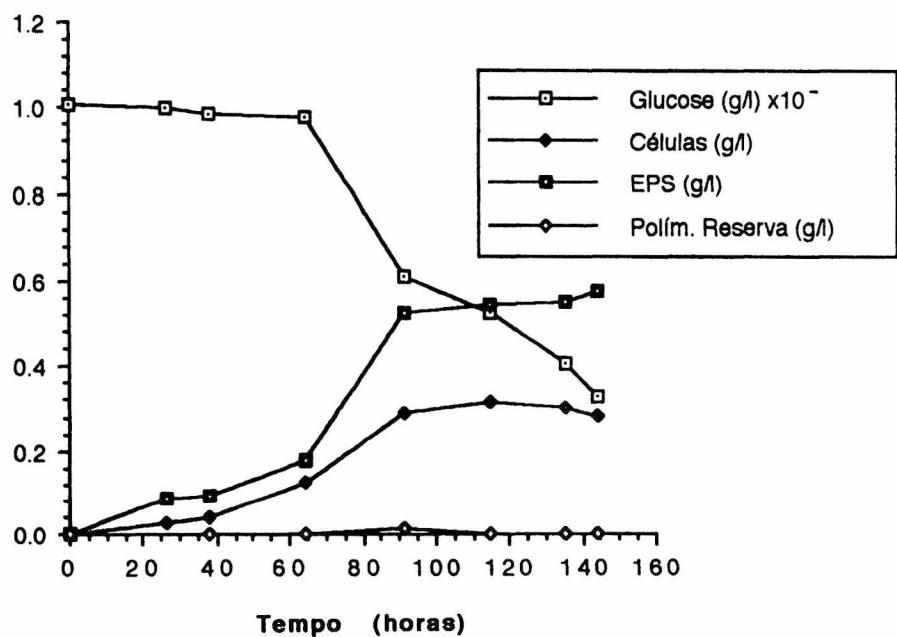


Figura 40c - Perfil de produção de massa celular, EPS, polímero de reserva e consumo de glucose durante o cultivo de *Alcaligenes* EPS<sup>+</sup> na condição Mg/16 (SA)



3.1.5.5 Efeito da relação de C:N na produção de massa celular, polímero de reserva e EPS em *Alcaligenes* EPS<sup>+</sup> e EPS<sup>-</sup> em **caseína hidrolizada** como fonte de nitrogênio

Tabela 18 - Crescimento de *Alcaligenes* sp em **caseína hidrolizada** como fonte de nitrogênio:

<i>Alcaligenes</i>	PSC <sub>máx</sub> (g/l)		PR <sub>máx</sub> (g/l)		PR <sub>máx</sub> (%PSC <sub>máx</sub> )		PSC <sub>fe</sub> (g/l)	$\pi_{EPS}$ (g/g)	EPS (g/l)	$Y_{EPS}$ (%)
	EPS <sup>+</sup>	EPS <sup>-</sup>	EPS <sup>+</sup>	EPS <sup>-</sup>	EPS <sup>+</sup>	EPS <sup>-</sup>	EPS <sup>+</sup>	EPS <sup>+</sup>	EPS <sup>+</sup>	EPS <sup>+</sup>
EC 20 (CH)	0,598	0,562	0,064	n.d.	11,4	n.d.	0,559	5,467	3,056	22,8
EC 10 (CH)	0,446	0,537	0,098	0,070	22,0	13,1	0,428	4,610	1,973	21,2
EC 05 (CH)	0,546	0,599	0,121	0,078	22,2	13,1	0,490	2,384	1,168	23,1
EC 03 (CH)	0,590	0,530	0,102	0,070	17,3	13,2	0,547	0,883	0,483	16,6
EN/2 (CH)	0,229	0,258	0,038	0,035	16,6	13,5	0,225	5,760	1,296	19,4
Mg/16 (CH)	0,284	0,587	0,016	n.d.	6,1	n.d.	0,259	6,297	1,631	41,2

PSC<sub>máx</sub> (g/l) é a máxima massa celular obtida no cultivo, que é coincidente com o máximo acúmulo do polímero de reserva (PR)

PR<sub>máx</sub> (g/l) - o máximo acúmulo absoluto do polímero de reserva obtido no cultivo

PR<sub>máx</sub> (%PSC<sub>máx</sub>) - o máximo acúmulo do polímero de reserva, representado como o percentual em relação à massa celular

PSC<sub>fe</sub> (g/l) - a média aritmética das massas celulares na fase estacionária

$\pi_{EPS}$  (g/g) - a relação entre a máxima produção absoluta de EPS pela média aritmética das massas celulares na fase estacionária (EPS/PSC<sub>fe</sub>)

EPS (g/l) - a máxima produção absoluta do polissacarídeo extracelular

$Y_{EPS}$  (%) - o fator de conversão da glucose consumida em polissacarídeo extracelular, ao final do cultivo

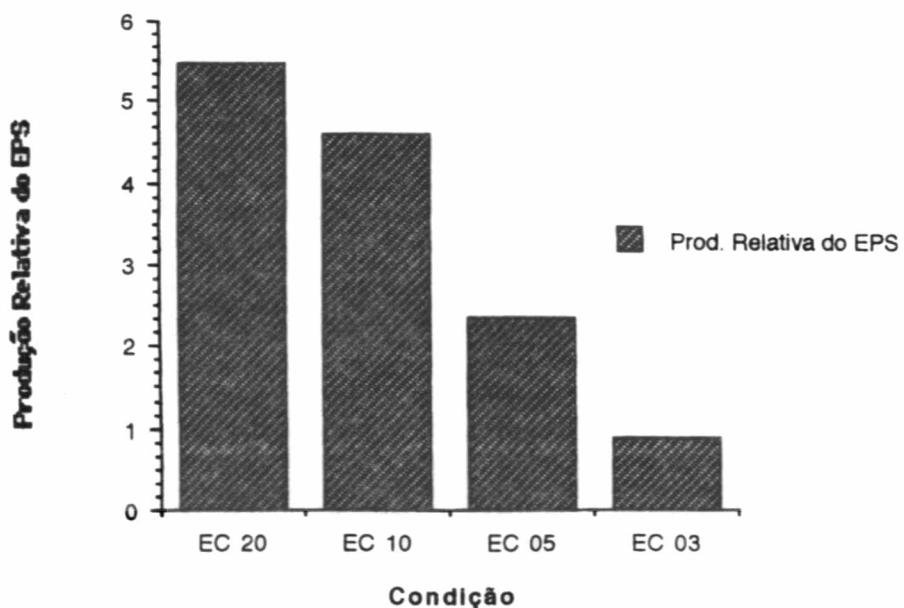
n.d. - não determinado

Semelhante aos experimentos com sulfato de amônio, as condições EC 20, EN/2 e EMg/16 com caseína hidrolizada, não consumiram toda sua glucose exógena, ficando 30, 27 e 57% da glucose inicial, respectivamente. A redução das concentrações de nitrogênio (1/2) e magnésio (1/16), em relação ao EC 10, provocou uma diminuição de quase 50% na produção de massa celular, diminuindo também a produção absoluta do exopolissacarídeo e do polímero

de reserva; já a produção relativa do exopolissacarídeo aumentou 25 e 36% para EN/2 e EMg/16, respectivamente (vide tabela 18)

O aumento da relação C:N, nos experimentos EC, proporcionou um notável aumento na produção relativa ( $\pi_{EPS}$ ) do exopolissacarídeo, que pode ser visto no figura 41;

Figura 41 - Produção relativa do exopolissacarídeo ( $\pi_{EPS}$ ) pela cepa *Alcaligenes* EPS<sup>+</sup>, crescida na presença de caseína hidrolizada (CH) como fonte de nitrogênio

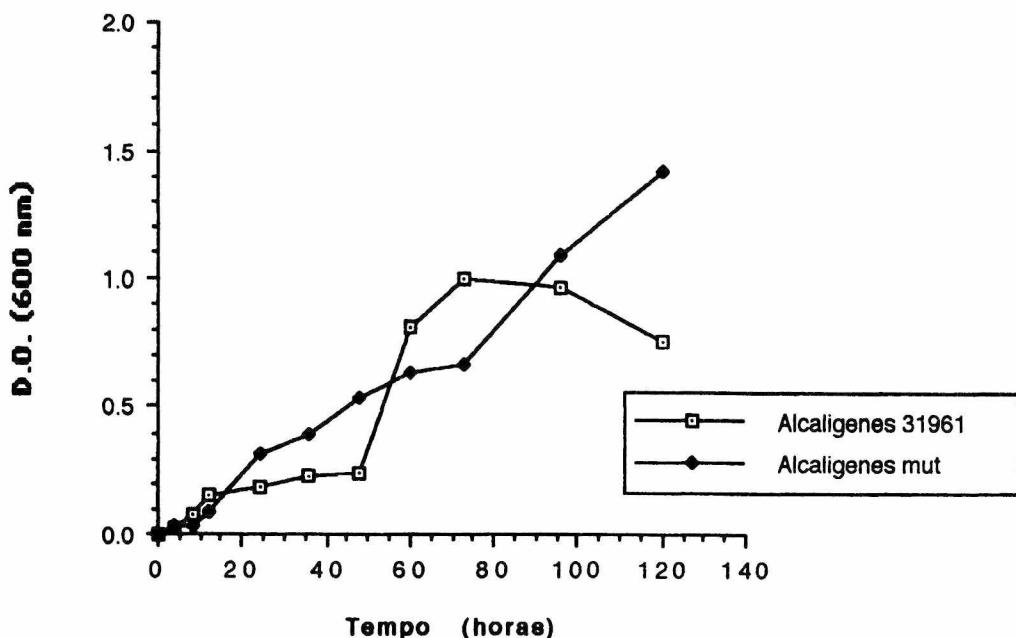


Valores expressos em gramas de EPS por grama de células, na fase estacionária, e retirados dos experimentos indicados

$\pi_{EPS}$  (g/g) - a relação entre a máxima produção absoluta de EPS pela média aritmética das massas celulares na fase estacionária (EPS/PSC<sub>fe</sub>)

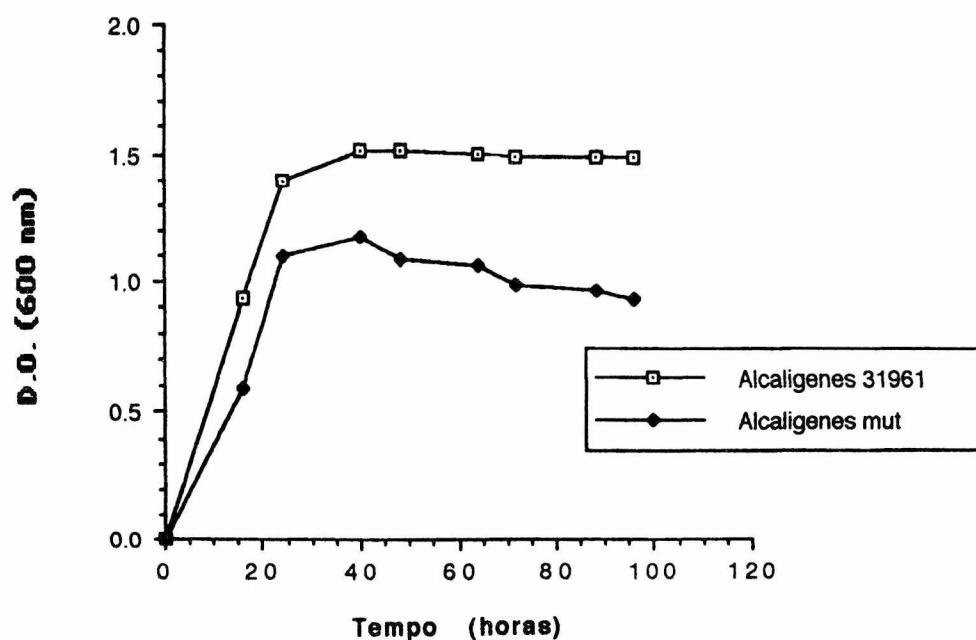
A restrição da fonte de magnésio, em EMg/16 com caseína hidrolizada, provocou um perfil de crescimento anômalo nas cepas *Alcaligenes* EPS<sup>+</sup> e *Alcaligenes* EPS<sup>-</sup>, onde a fase de crescimento se estendeu além de 50 horas de cultivo e a fase estacionária não foi alcançada (vide figura 42a e b). Esta foi, contudo, a condição onde a cepa *Alcaligenes* EPS<sup>+</sup> apresentou seus maiores rendimento ( $Y_{EPS}$ ) e produção relativa ( $\pi_{EPS}$ ) de exopolissacarídeo (vide tabela 18)

Figura 42a - Curvas de crescimento (**anômalo**) das cepas de *Alcaligenes*, crescidas na condição EMg/16 (CH)



*Alcaligenes* 31961 = EPS<sup>+</sup>; *Alcaligenes* mut = EPS<sup>-</sup>

Figura 42b - Curvas de crescimento (**normal**) das cepas de *Alcaligenes*, crescidas na condição EC 10 (CH)



*Alcaligenes* 31961 = EPS<sup>+</sup>; *Alcaligenes* mut = EPS<sup>-</sup>

### 3.1.5.6 Efeito comparativo entre as duas fontes de nitrogênio na produção de massa celular, polímero de reserva e EPS em *Alcaligenes* EPS<sup>+</sup>

Tabela 19- Crescimento de *Alcaligenes* EPS<sup>+</sup> em cultivos comparativos variando-se a fonte de nitrogênio

Condição	$\pi_{EPS}$ (g/g)		PR <sub>máx</sub> (g/l)		PR <sub>máx</sub> (%PSC <sub>máx</sub> )		EPS (g/l)		Y <sub>EPS</sub> (%)	
	SA	CH	SA	CH	SA	CH	SA	CH	SA	CH
EC 20	2,519	5,467	0,169	0,064	19,8	11,4	1,826	3,056	12,1	22,8
EC 10	2,314	4,610	0,134	0,098	15,1	22,0	2,046	1,973	21,5	21,2
EC 05	1,532	2,384	0,157	0,121	24,5	22,2	0,996	1,168	19,9	23,1
EC 03	0,699	0,883	0,066	0,102	10,8	17,3	0,384	0,483	13,2	16,6
EN/2	3,475	5,760	0,070	0,038	15,9	16,6	1,324	1,296	15,9	19,4
EMg/16	2,197	6,297	0,011	0,016	3,8	6,1	0,580	1,631	8,5	41,2

$\pi_{EPS}$  (g/g) - a relação entre a máxima produção absoluta de EPS pela média aritmética das massas celulares na fase estacionária (EPS/PSC<sub>fe</sub>)

PR<sub>máx</sub> (g/l) é o máximo acúmulo absoluto do polímero de reserva obtido no cultivo

PR<sub>máx</sub> (%PSC<sub>máx</sub>) é o máximo acúmulo do polímero de reserva, representado como o percentual em relação à massa celular

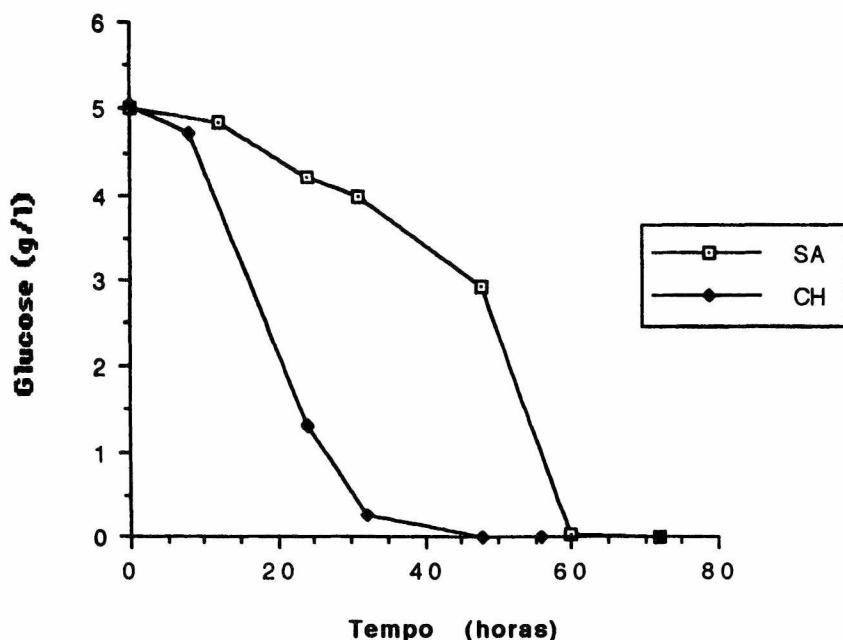
EPS (g/l) é a máxima produção absoluta do polissacarídeo extracelular

Y<sub>EPS</sub> (%) é o fator de conversão da glucose consumida em polissacarídeo extracelular, ao final do cultivo

Em condições nutricionais semelhantes, onde a variável foi a natureza da fonte de nitrogênio (inorgânico ou orgânico), observou-se genericamente para a cepa *Alcaligenes* EPS<sup>+</sup>:

- a) Maior velocidade de consumo da glucose quando caseína hidrolizada foi empregada, indicando este organismo encontra-se mais adaptado ao crescimento com a fonte de nitrogênio orgânica (vide figura 43). *Alcaligenes* EPS<sup>+</sup> deixou 27% e 30% da glucose inicial, quando cultivado nas condições EC 20 (SA) ou EC 20 (CH), respectivamente.

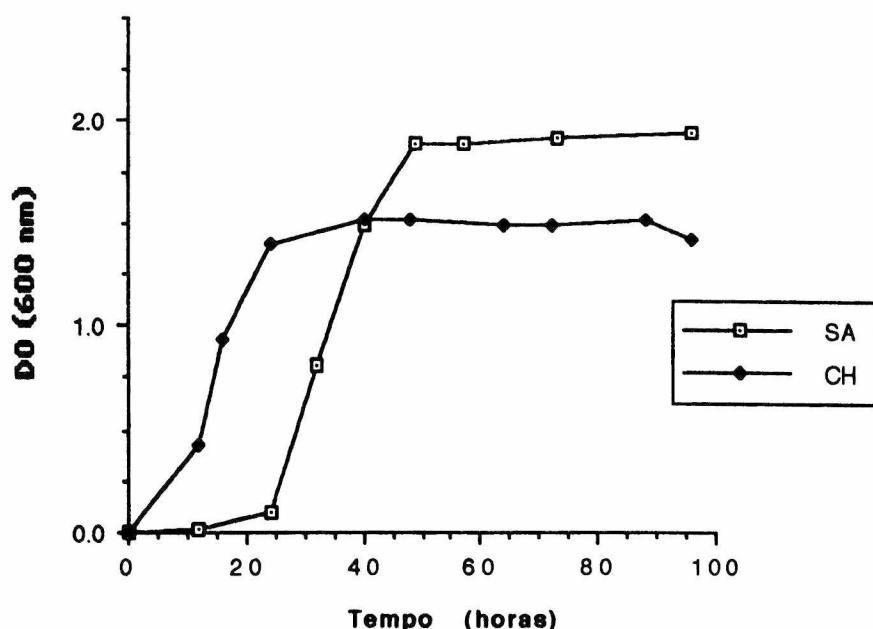
Figura 43 - Perfil de consumo da glucose (g/l) pela cepa *Alcaligenes* EPS<sup>+</sup> crescida na presença das duas fontes de nitrogênio (SA ou CH)



Valores expressos em g/l de glucose residual, extraídos dos experimentos EC 05 (SA) e EC 05 (CH)

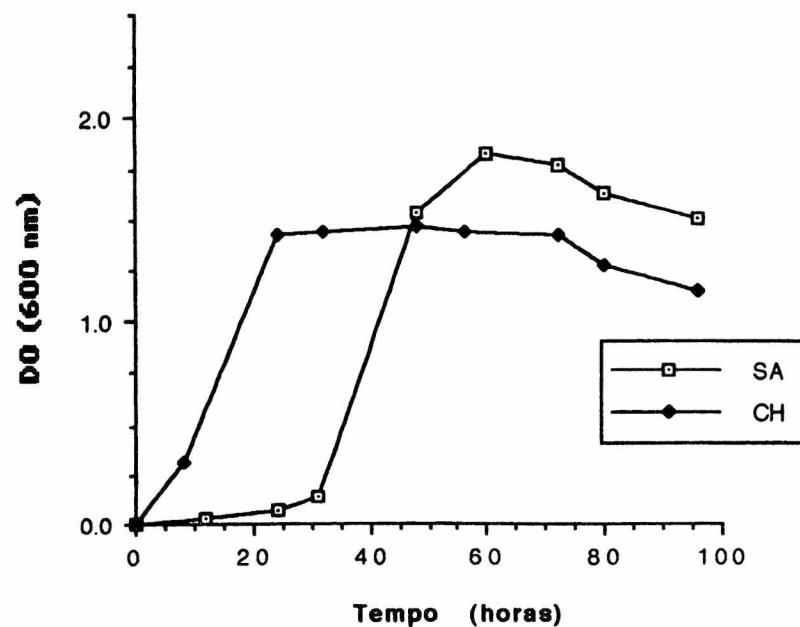
- b) Menor velocidade de adaptação ao meio quando sulfato de amônio foi empregado, havendo uma fase lag de 12-24 horas na maioria das condições testadas; contudo, com sulfato de amônio foi alcançada maior concentração celular na fase estacionária (vide figuras 44a e b)

Figura 44a - Perfil de crescimento ( $DO_{600\text{nm}}$ ) da cepa *Alcaligenes* EPS<sup>+</sup>, crescida na presença das duas fontes de nitrogênio (SA ou CH)



Valores das leituras da  $DO_{600\text{nm}}$ , extraídos dos experimentos EC 10 (SA) e EC 10

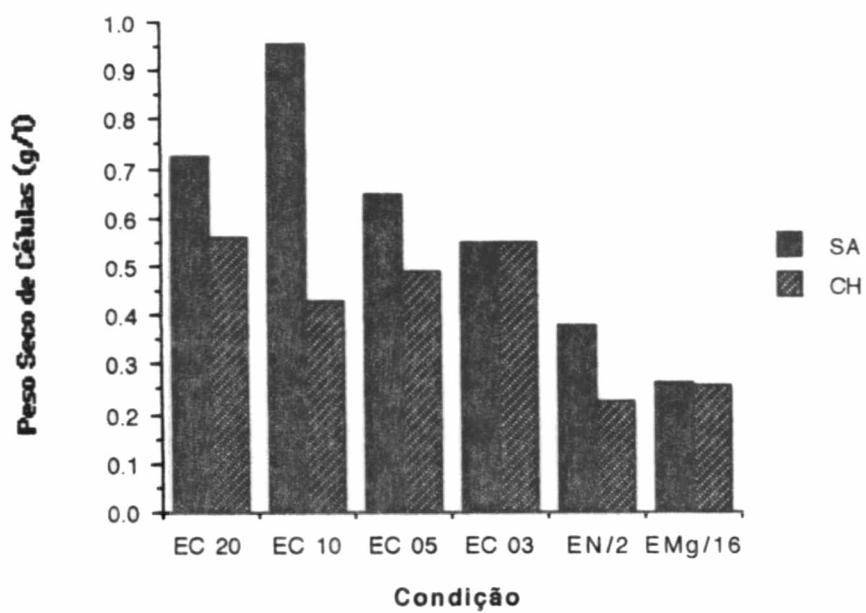
Figura 44b - Perfil de crescimento ( $DO_{600\text{nm}}$ ) da cepa *Alcaligenes* EPS<sup>+</sup>, crescida na presença das duas fontes de nitrogênio (SA ou CH)



Valores das leituras da  $DO_{600\text{nm}}$  extraídos dos experimentos EC 05 (SA) e EC 05 (CH)

c) Semelhante ou menor concentração celular, na fase estacionária, quando caseína hidrolizada foi utilizada, talvez devido ao consumo de caseína em favor da produção de EPS nos estágios iniciais do cultivo; ou, pelo fato de não ter havido uma correspondência molar entre 0,5 g/l de sulfato de amônio e 1,0 g/l de caseína hidrolizada, como havia sido previsto (vide tabela 19 e figura 45)

Figura 45 - Média da produção de massa celular, na fase estacionária, pela cepa *Alcaligenes* EPS<sup>+</sup>, crescida na presença das duas fontes de nitrogênio (SA ou CH)

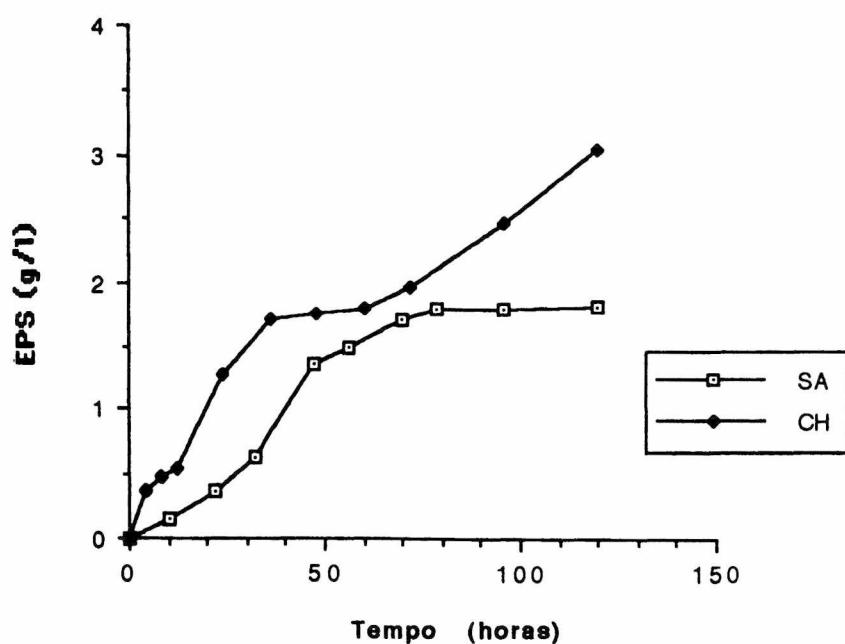


Os valores extraídos dos experimentos indicados, representam a média aritmética dos pesos seco de células (g/l), na fase estacionária

d) Maior taxa de produção de EPS, quando caseína hidrolizada foi utilizada (vide figura 46a).

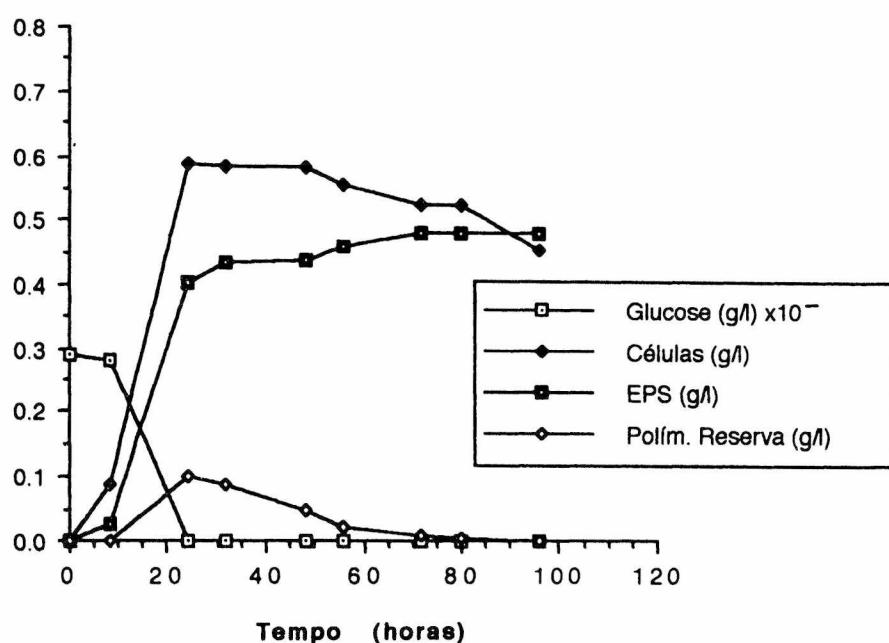
Uma vez que, com caseína hidrolizada, deve ter ocorrido uma menor demanda de glucose para a síntese de compostos nitrogenados, mais esqueletos carbônicos foram canalizados para a produção de EPS. Além disso, pode ter havido produção de EPS às custas de caseína hidrolizada, pois na condição EC 03 (CH), nas primeiras oito horas de cultivo, foram consumidos 100 mg de glucose, e produzidos 86 mg de células e 28 mg de EPS no mesmo período (vide figura 46b).

Figura 46a - Perfil da produção absoluta do exopolissacarídeo (g/l) pela cepa *Alcaligenes EPS<sup>+</sup>*, crescida na presença das duas fontes de nitrogênio (SA ou CH)



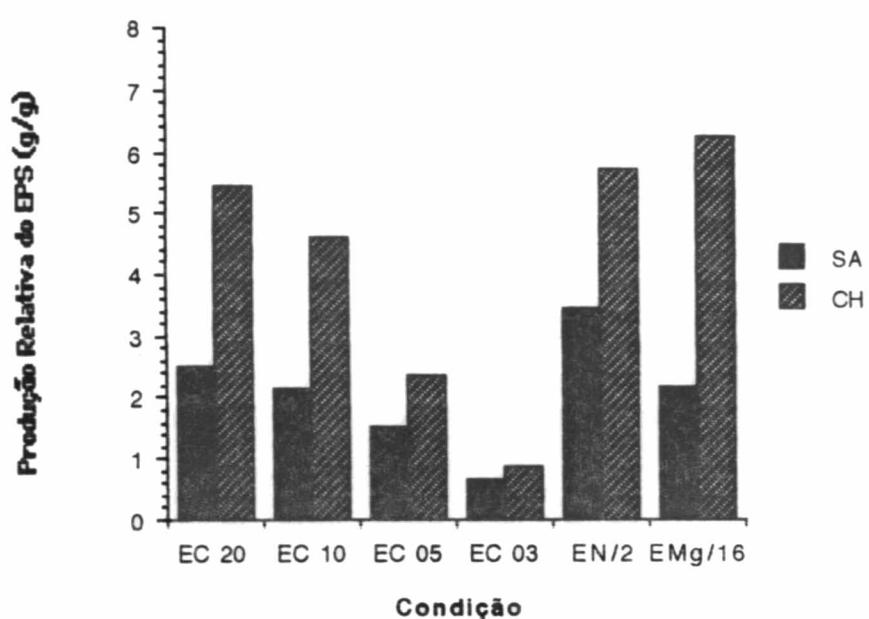
Valores expressos em g/l de exopolissacarídeo produzido, extraídos dos experimentos EC 20 (SA) e EC 20 (CH)

Figura 46b - Perfil de produção de massa celular, EPS, polímero de reserva e consumo de glucose durante o cultivo de *Alcaligenes* EPS<sup>+</sup> na condição EC 03 (CH)



- e) Maior produção relativa ( $\pi_{EPS}$ ) do exopolissacarídeo quando caseína hidrolizada foi empregada (vide tabela 19 e figura 47)

Figura 47 - Produção relativa do exopolissacarídeo ( $\pi_{EPS}$ ) pela cepa *Alcaligenes* EPS<sup>+</sup>, crescida na presença das duas fontes de nitrogênio (SA ou CH)

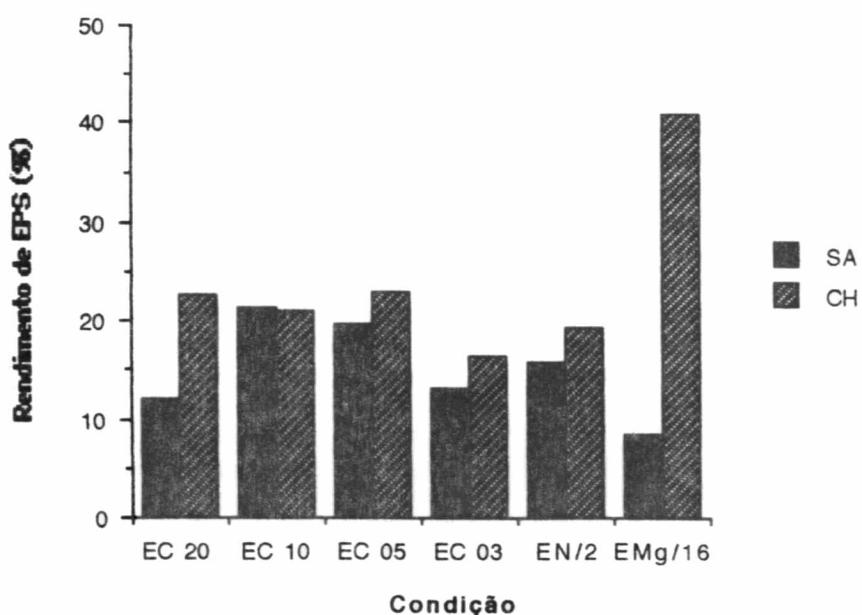


Valores expressos em grama de EPS por grama de células, na fase estacionária, e retirados dos experimentos indicados

$\pi_{EPS}$  (g/g) - a relação entre a máxima produção absoluta de EPS pela média aritmética das massas celulares na fase estacionária (EPS/PSC<sub>fe</sub>)

f) Semelhante ou maior rendimento de EPS ( $Y_{EPS}$ ) quando caseína hidrolizada foi empregada (vide tabela 19 e figura 48).

Figura 48 - Rendimento de exopolissacarídeo ( $Y_{EPS}$ ) pela cepa *Alcaligenes* EPS<sup>+</sup>, crescida na presença das duas fontes de nitrogênio (SA ou CH)



Valores expressos como a percentagem e retirados dos experimentos indicados  
 $Y_{EPS}$  (%) - o fator de conversão da glucose consumida em polissacarídeo extracelular, ao final do cultivo

Em nossos experimentos empregando cepas isogênicas EPS<sup>+</sup> e EPS<sup>-</sup> de *Enterobacter aerogenes* tipo 8 (SOUZA & SUTHERLAND, 1994) e *Alcaligenes* sp ATCC 31961 com uma faixa de diferentes concentrações de glucose e sais de amônio ou caseína hidrolizada como fonte de nitrogênio, o nível de polímero de reserva foi em geral mais alto quando o mutante *Enterobacter* EPS<sup>-</sup> foi usado, sugerindo que o substrato foi canalizado para a produção de EPS às custas do polímero de reserva na cepa EPS<sup>+</sup>. Embora não exista nenhuma evidência direta de que ocorra a transformação de glicogênio em EPS, após o esgotamento da glucose extracelular, sob algumas condições que causaram declínio no

conteúdo de glicogênio, foram observados valores aumentados para a produção do polímero extracelular. Num estudo de *Escherichia coli* limitada por nitrogênio, CHEN & SEGAL (1968) observaram que após o esgotamento da fonte de nitrogênio, houve um rápido aumento no conteúdo de glicogênio das células para 14% embora quase 50% da glucose permanecesse no meio. Durante a fase estacionária, foi observado simultânea incorporação de glucose e degradação de glicogênio. Isto é surpreendente em vista dos achados por ROMEO, KUMAR et al. (1988) de que os genes para a biossíntese e degradação estão localizados juntos em um mesmo grupo ("cluster") e que tal organização poderia facilitar a regulação destes sistemas.

Pelo fato de *Alcaligenes* ATCC 31961 ser uma bactéria explorada comercialmente, na produção de EPS (COLEGROVE, 1983; KANG, VEEDER et al., 1983; SANDFORD, COTTRELL et al., 1984), as informações se restringem a dados gerais, não havendo relatos sobre bactérias tal como *Alcaligenes* sp que produzem EPS e PHB. Os níveis de polímero de reserva acumulado pela cepa empregada são comparativamente baixos em relação à quantidade de EPS produzido, não sendo tão relevante o desvio de pequena parte da fonte de carbono e energia na produção do polímero intracelular. Porém, a restrição da fonte de magnésio é capaz de conduzir a diminuição do acúmulo de PHB, com considerável aumento no rendimento do EPS.

Sob quase todas as condições testadas, incluindo meio com teores reduzido em magnésio, as bactérias EPS<sup>+</sup> utilizaram o substrato de glucose mais rapidamente do que as cepas EPS<sup>-</sup> correspondentes. Estes resultados estão de acordo com as observações de LINTON (1990) para as cepas produtoras de EPS de *Agrobacterium radiobacter* e *Erwinia herbicola*. Claramente, existe considerável conversão de substrato em polímero de reserva às custas de EPS quando microrganismos capazes de sintetizar EPS e glicogênio ou PHB são contemplados para a produção comercial de EPS microbiano, e é sorte que o principal polissacarídeo microbiano produzido atualmente, a goma xantana, seja derivada de bactéria que aparentemente não apresente quantidades significantes de qualquer forma de polímero de reserva. LINTON (1990) tem mostrado que a síntese de EPS é um processo muito eficiente e existe pouco campo

para maior melhoramento no rendimento. Mas, se a espécie microbiana produtora de um EPS também forma polímero de reserva, isto rapidamente desvia o substrato num produto indesejável. Como o doador glicosil na síntese de glicogênio em procariotos é ADP-glucose (PEISS, 1984; RIBEREAU-GAYON, SABRAW et al., 1971), oposto a UDP-glucose para a produção de EPS na cepa de *Enterobacter aerogenes* (SUTHERLAND & NORVAL, 1969), a utilização do substrato para a síntese de EPS e polímero de reserva está presumidamente controlada ao nível de  $\alpha$ -D-glucose-1-fosfato, antes da glucose ser convertida à açúcar nucleotídeo.

### 3.1.6 Verificação do efeito da concentração do tampão fosfato sobre o crescimento da cepa *Enterobacter* EPS<sup>+</sup>

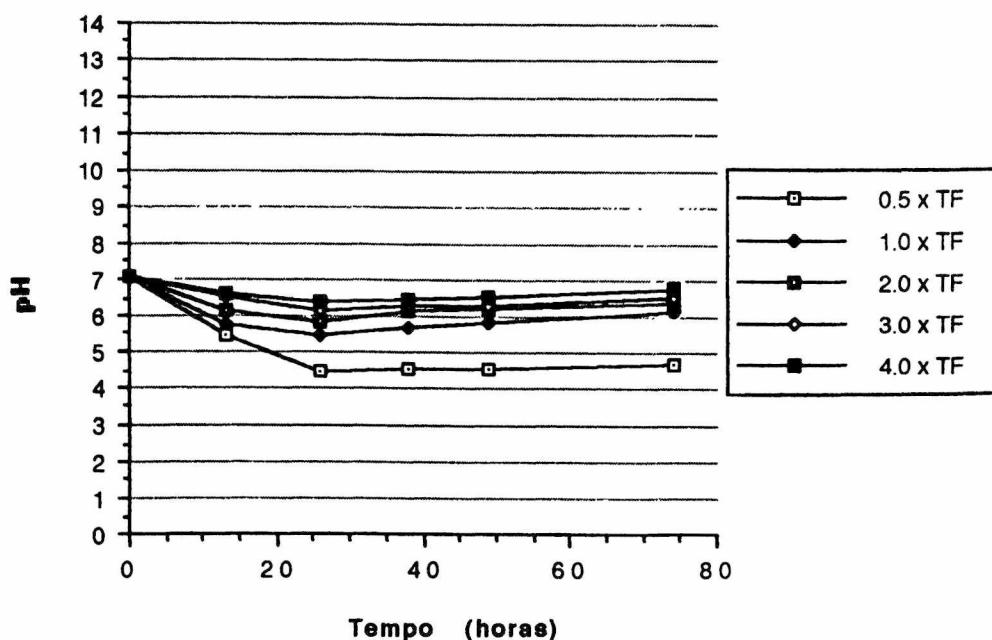
Devido aos problemas referentes à queda brusca de pH nos cultivos do gênero *Enterobacter*, em altas concentrações de glucose (20,0 g/l), cogitou-se a possibilidade de aumentar a concentração (a força iônica) do tampão fosfato (TF), como uma maneira de controlar o pH. Todavia, houve a necessidade de primeiramente avaliar o crescimento do gênero *Enterobacter* em concentrações de fosfato, outras do que a fornecida pelo meio referencial de D&M.

Como já havia sido observado em outros experimentos, para razões molares (C : N) menores ou iguais a 7,3 : 1, a força do tampão fosfato do meio referencial (10,0 g/l dos sais de fosfato), assegurou bom tamponamento do pH, em valores mínimos superiores a 5,00, garantindo assim, que toda a glucose fosse consumida durante crescimento.

Nos meios onde foi empregada a metade da concentração referencial do tampão fosfato (5,0 g/l), verificou-se que não foi possível a manutenção do pH em valores acima de 5,00, ficando o crescimento depreciado em relação ao controle. (vide figura 49 e 50)

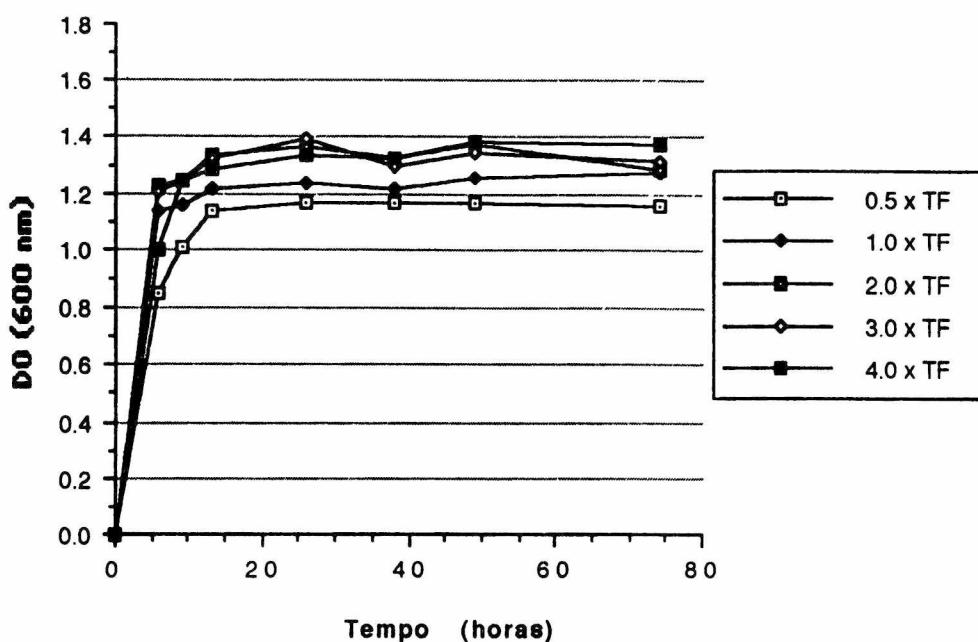
Nos meios onde foram utilizados 15,0, 20,0, 25,0, 30,0 e 40,0 g/l de tampão fosfato, houve crescimento ( $DO_{600nm}$ ) semelhante ou ligeiramente superior ao controle; não sendo portanto detectado, através do acompanhamento da  $DO_{600nm}$  e do pH, nestas concentrações, um efeito inibitório dos sais de fosfato sobre o crescimento da cepa utilizada. (vide figura 50)

Figura 49 - Perfil de pH da cepa *Enterobacter* EPS<sup>+</sup>, crescida na presença de diferentes concentrações do Tampão Fosfato (TF)



Valores das leituras de pH, extraídos das curvas de crescimento

Figura 50 - Perfil de crescimento ( $DO_{600\text{nm}}$ ) da cepa *Enterobacter* EPS<sup>+</sup>, crescida na presença de diferentes concentrações do Tampão Fosfato (TF)



Valores das leituras da  $DO_{600\text{nm}}$ , extraídos das curvas de crescimento

Sendo esta cepa de *Enterobacter*, produtora de EPS, verificou-se que, durante o crescimento, em concentrações do tampão acima de 20,0 g/l, a aparência dos cultivos tornava-se tanto mais opaca quanto maior era a concentração do mesmo. Uma vez que, ao final das 74 horas, o remanescente do cultivo foi centrifugado e o sobrenadante precipitado com acetona, depositaram-se no fundo dos frascos EPS com características de pó ("powdery"), de difícil recuperação, e não em forma de cordas, como era rotineiro. Houve também redução na quantidade de EPS recuperado em relação ao controle; não ficando esclarecido se foi devido à perda do material nas etapas de precipitação/processamento ou efetiva diminuição na produção. No intervalo de 26 horas, a glucose foi totalmente consumida dos meios contendo entre 5,0 a 30,0 g/l de tampão fosfato; e, apenas o meio contendo 40,0 g/l do tampão teve a sua fonte de carbono esgotada num prazo maior, de 74 horas.

### 3.1.7 Cultivo comparativo das cepas de *Enterobacter aerogenes* em duas forças iônicas diferentes do tampão fosfato.

Quando se empregaram as cepas *Enterobacter* EPS<sup>-</sup> e EPS<sup>+</sup>, com 20,0 g/l de glucose e 0,5 g/l de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e concentração do tampão **referencial** (10,0 g/l), foi observado que, a partir de valores de pH inferiores a 5,0 o perfil de consumo da glucose acompanhou o da queda de pH; e que para valores em torno de 4, praticamente não houve consumo da fonte exógena de carbono.

Em 1953, DUGUID & WILKINSON cultivaram em placa de Petri uma cepa de *Enterobacter aerogenes* EPS<sup>+</sup> (A3), empregando diferentes concentrações de lactose e sulfato de amônio como fonte de carbono e nitrogênio, respectivamente, tendo como tampão uma mistura de sais de fosfato (3 partes de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  e 1 parte de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 10 mg/ml, pH inicial = 7,3) e  $\text{MgSO}_4$ . As culturas pobramente tamponadas (0,15 mg/ml da mistura dos sais de fosfato - que era nutricionalmente suficientemente para o máximo crescimento), tornaram-se muito mais ácidas, com pH final de 4,1-4,2. A limitação do crescimento pela acidez não resultou num aumento de produção do EPS, nem em meio pobre em amônia. Aparentemente, um excesso da fonte de energia não é utilizada. Foi portanto concluído que uma reação ácida é inibitória para a síntese de EPS, mesmo num valor de pH que não seja baixo suficiente para prevenir inteiramente o crescimento protoplasmático.

Figura 51 - Curvas de consumo de glucose e pH, empregando-se a cepa *Enterobacter* EPS<sup>-</sup>, com 20,0 g/l de glucose e concentração do tampão referencial

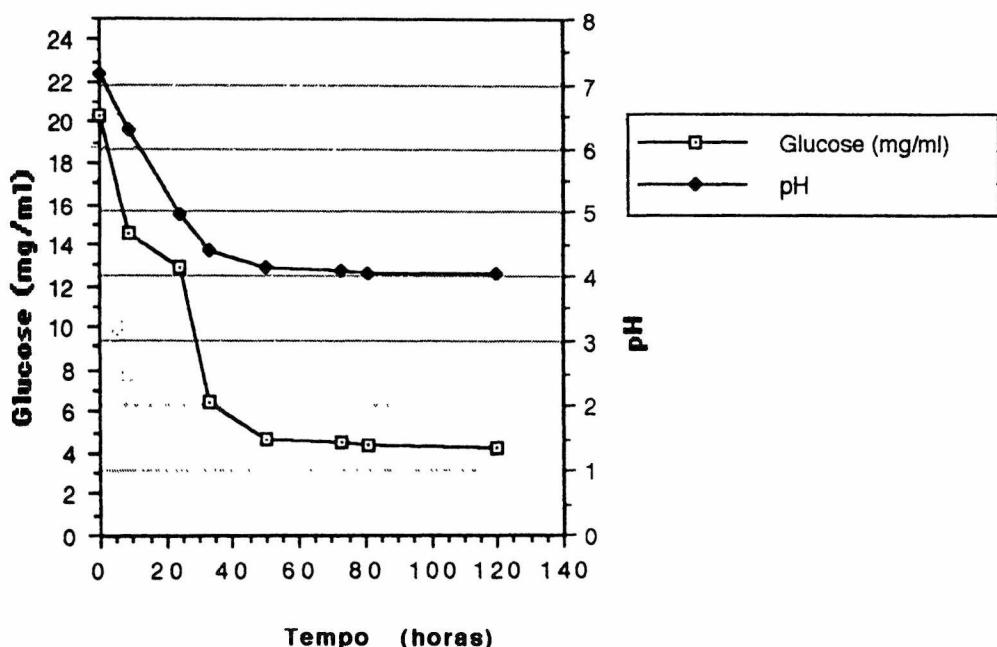
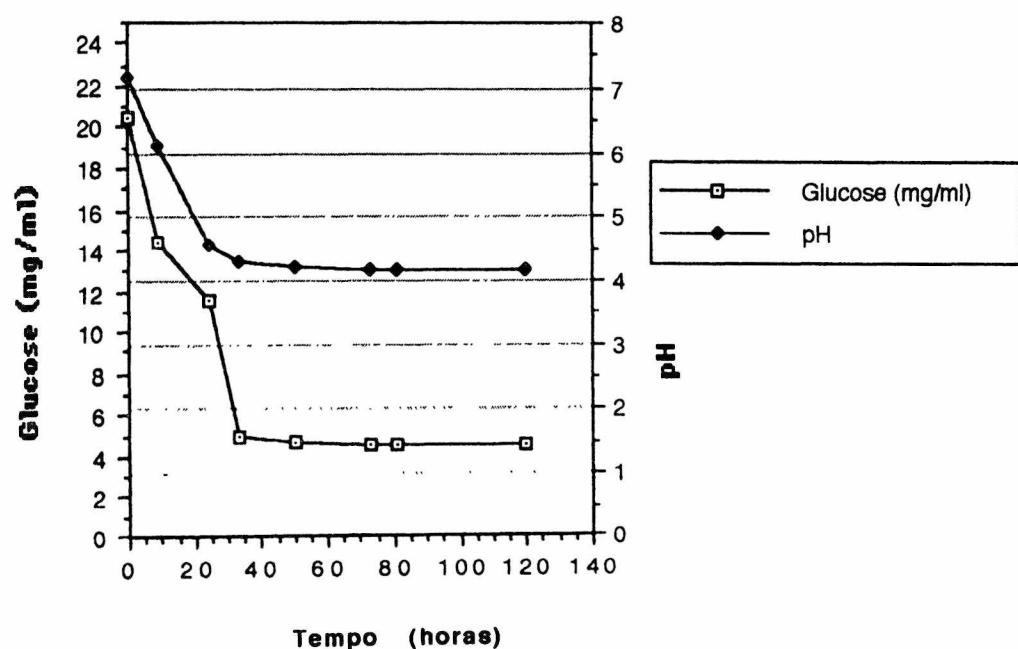
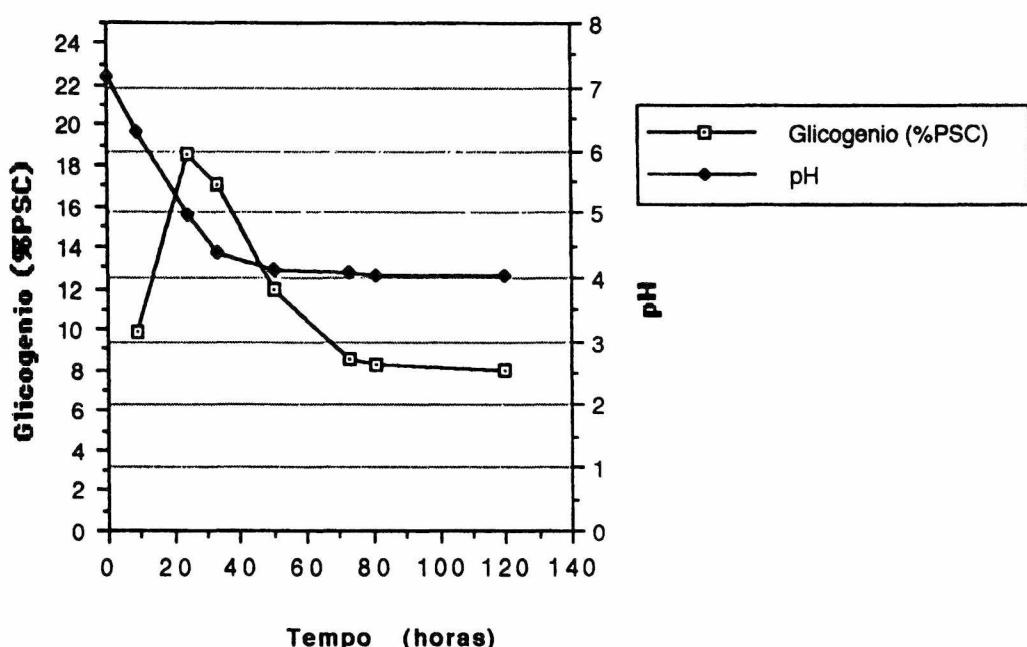


Figura 52 - Curvas de consumo de glucose e efeito do pH, empregando-se a cepa *Enterobacter* EPS<sup>+</sup>, com 20,0 g/l de glucose e concentração do tampão referencial



Para a cepa *Enterobacter* EPS<sup>-</sup>, o acúmulo do polímero intracelular interrompeu-se às 24 horas de cultivo, concomitante com a queda do pH para valores inferiores a 5, seguido do início de sua rápida degradação, mesmo havendo glucose no meio de cultura. Já a cepa *Enterobacter* EPS<sup>+</sup>, teve seu polímero também inicialmente degradado, seguido de um pequeno período de ressíntese e posterior degradação. Este mesmo comportamento foi observado quando se empregou a força do tampão duplicada (vide figura 56)

Figura 53 - Curvas de produção/degradação do polímero intracelular e pH, empregando-se a cepa *Enterobacter* EPS<sup>-</sup>, com 20,0 g/l de glucose e concentração do tampão referencial



Duplicando-se a força do tampão, foi possível manter os valores de pH acima de 4,80, havendo neste caso, o total consumo da fonte de carbono exógena. Isto, contudo, não alterou significativamente o perfil de produção/degradação do polímero intracelular para a cepa de *Enterobacter* EPS<sup>-</sup>, não produtora de EPS; todavia, para a cepa produtora (*Enterobacter* EPS<sup>+</sup>) houve uma redução de 40% no máximo acúmulo do polímero intracelular, e mais de 80% de redução na produção do exopolissacarídeo.

Figura 54 - Curvas de consumo de glucose e pH, empregando-se a cepa *Enterobacter* EPS<sup>-</sup>, com 20,0 g/l de glucose e concentração do tampão duplicada

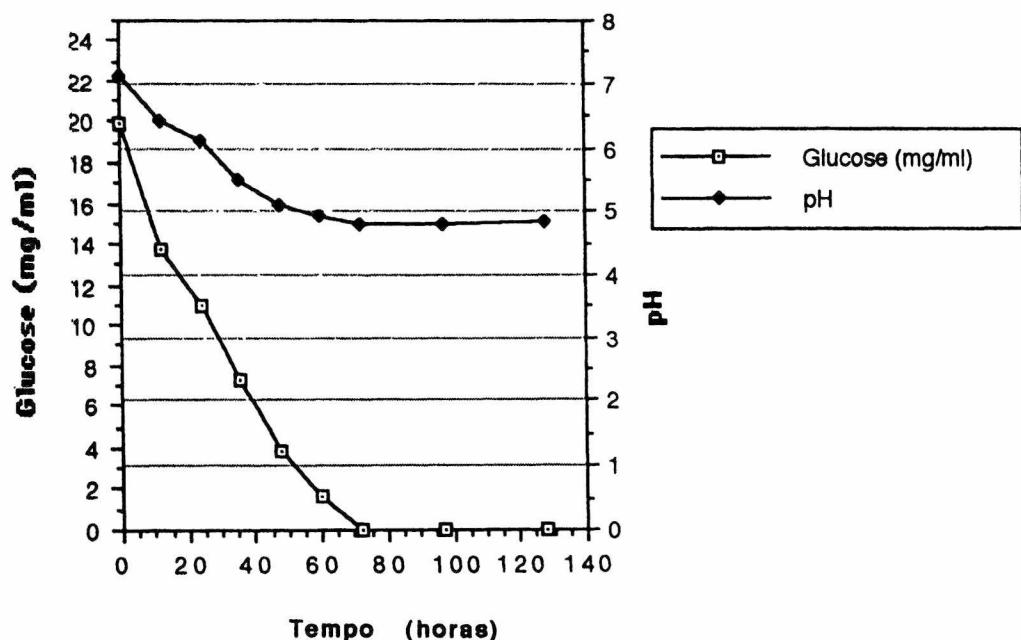


Figura 55 - Curvas comparativas de produção/degradação do polímero intracelular, empregando-se a cepa *Enterobacter* EPS<sup>-</sup>, nas **duas concentração** do tampão fosfato

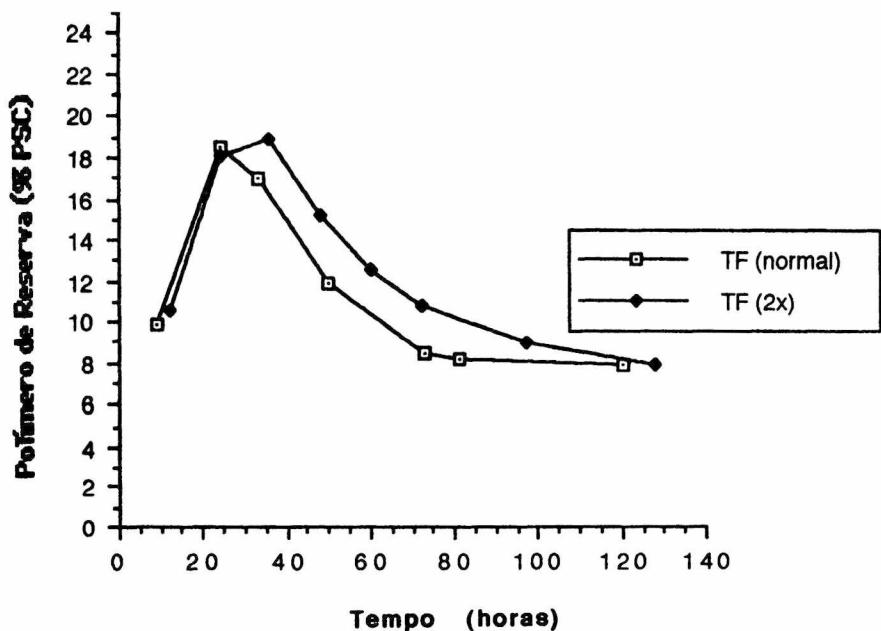
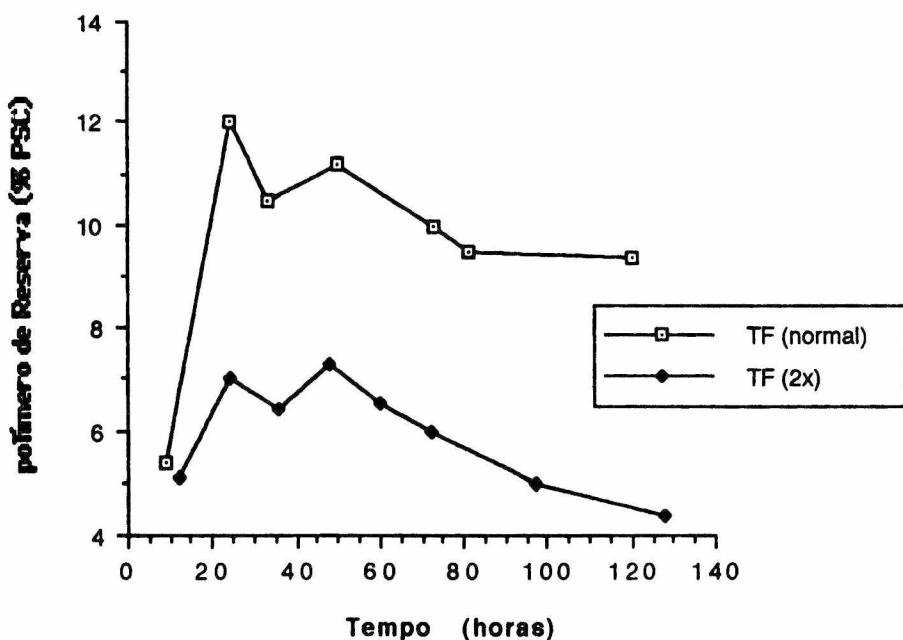


Figura 56 - Curvas comparativas de produção/degradação do polímero intracelular, empregando-se a cepa *Enterobacter* EPS<sup>+</sup>, nas duas concentrações do tampão fosfato



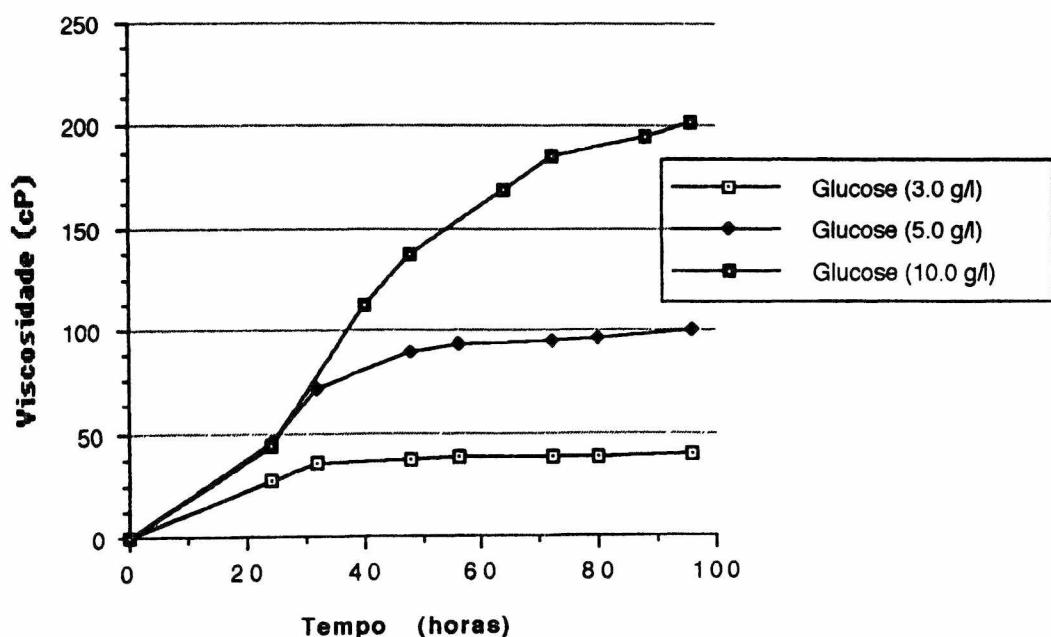
Apesar da tentativa de favorecer a total incorporação da glucose extracelular, empregando-se a concentração duplicada do tampão, houve sensível diminuição da massa celular, para ambas as cepas, e da produção absoluta do exopolissacarídeo, por *Enterobacter* EPS<sup>+</sup> (de 0,531 g/l para 0,090 g/l); sendo por isso descartada esta estratégia..

### 3.1.8 Determinação da viscosidade dos meios de cultura durante a produção dos EPS em *Enterobacter* e *Alcaligenes*

O aumento na concentração de glucose, nos cultivos de *Alcaligenes* EPS<sup>+</sup>, provocou um aumento proporcional de viscosidade que pode ser verificado na figura 57. Comparativamente, o exopolissacarídeo produzido por *Enterobacter* EPS<sup>+</sup> causou menor viscosidade no meio de cultura (vide figura 58), que foi consequência direta da quantidade sintetizada, bem como das características reológicas inerentes ao polissacarídeo, uma vez que

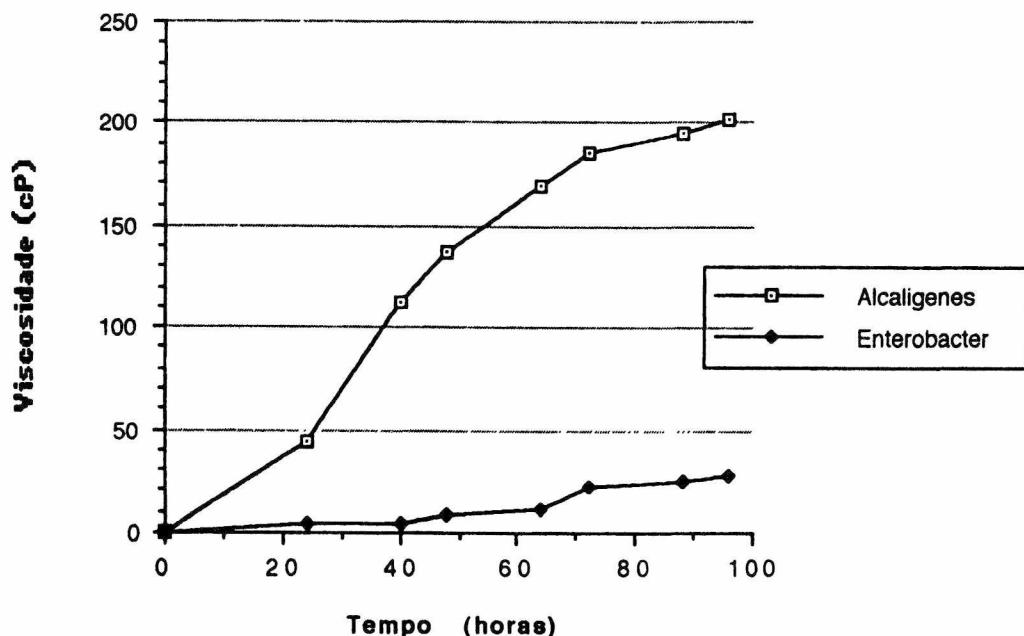
0,5 g% deste polímero não produz a mesma viscosidade que 0,1 g% de PS-*Alcaligenes* produz.

Figura 57 - Perfil de aumento da viscosidade dos meios de culturas de *Alcaligenes* EPS+, crescida na presença de diferentes concentrações de glucose; ("Shear rate" =  $10\text{ s}^{-1}$ )



Valores obtidos a partir dos meios de cultura dos experimentos EC 10, EC 05 e EC 03 (CH)

Figura 58 - Perfil do aumento comparativo entre as viscosidades dos meios de culturas de *Enterobacter* EPS<sup>+</sup> e *Alcaligenes* EPS<sup>+</sup>, crescidos na presença de 10,0 g/l de glucose; ("Shear rate" = 10 s<sup>-1</sup>)



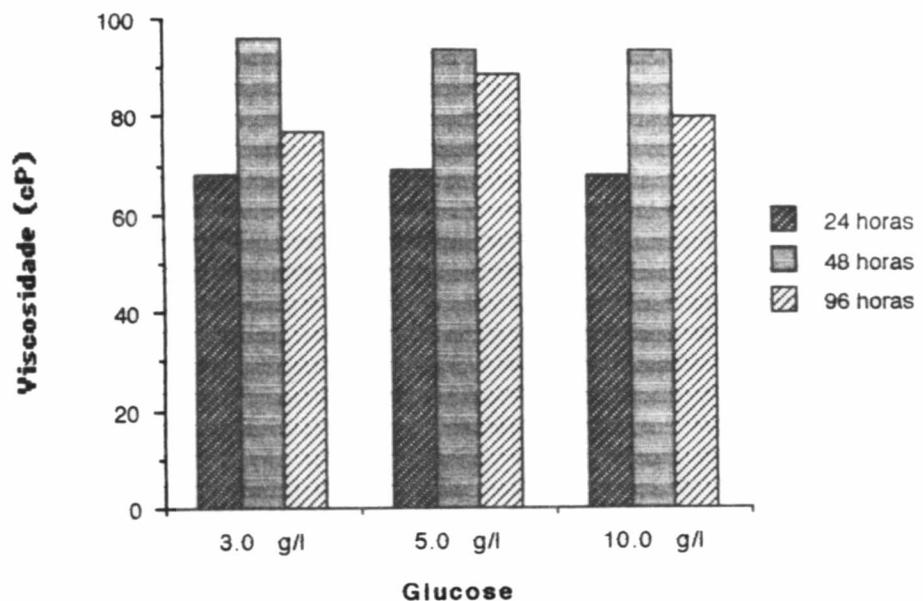
Valores obtidos a partir dos meios de cultura dos experimentos EC 10

### 3.1.9 Determinação da viscosidade das soluções preparadas a partir dos exopolissacarídeos isolados

A mesma concentração do exopolissacarídeo de *Alcaligenes* EPS<sup>+</sup> (0,1 g%), coletado em diferentes períodos de cultivo, produziu diferentes viscosidades, provavelmente devido ao fato de que, nas primeiras horas de cultivo (fase de crescimento) haja a produção de moléculas de EPS com menor número de unidades repetitivas que às 48 horas, uma vez que existe maior demanda de estruturas carbônicas no primeiro período. Ao se interromper o cultivo (às 96 horas), verifica-se novamente a queda da viscosidade em relação às 48 horas, porém com valores superiores ao período de 24 horas (vide figura 59). Estes resultados estão de acordo com TAIT, SUTHERLAND et al. (1986), onde a viscosidade da goma xantana isolada de "batch cultures" em diferentes estágios do ciclo de crescimento variou consideravelmente;

valores máximos foram observados no polissacarídeo isolado entre a fase exponencial e fase estacionária. As soluções do exopolissacarídeo sintetizado por *Enterobacter* EPS<sup>+</sup> (0,5 g%) nos mesmos intervalos de tempo, produziram menores viscosidades, apesar da concentração empregada nas medidas ter sido cinco vezes maior (dados não mostrados).

Figura 59 - Viscosidade das soluções do exopolissacarídeo isolado, produzido em diferentes tempos de cultivo por *Alcaligenes* EPS<sup>+</sup>; ("Shear rate" = 10 s<sup>-1</sup>)



EPS obtidos a partir dos experimentos EC 03, EC 05 e EC 10 (CH); Concentração do EPS = 0,1 g%

## 3.2 PROCESSO FERMENTATIVO DAS CEPAS DE *ACETOBACTER*

### 3.2.1 Aspectos gerais e de cultivo dos microrganismos

As cepas empregadas são bactérias Gram-negativas em forma de bastonete ou elipsoidal (**vide** figuras 60 e 61), com um tipo celular e padrão de associação (células individualizadas, aos pares e cadeias) lembrando as características e variabilidades descritas para o gênero *Acetobacter*, e algumas espécies *aceti* (LEY, SWINGS et al., 1984). Elas também apresentam outras características atribuídas à espécie *aceti* e sub-espécie *xylinum*, tal como redução ou perda da capacidade de sintetizar celulose (SWISSA, ALONI et al., 1980), e polimorfismo celular ou variabilidade de coloração em virtude do envelhecimento celular ou composição do meio de cultura. A contaminação com leveduras não perturba o crescimento celular bacteriano ou a formação da película celulósica extracelular, provavelmente por causa da capacidade da bactéria em oxidar o etanol gerado pela levedura. Em virtude da produção de ácido acético, uma queda de pH para 2,1 resulta na inibição do crescimento da levedura e superoxidação do ácido acético a CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O.

O crescimento das cepas testadas de *Acetobacter xylinum*, a 28 °C em meio líquido sem agitação, conduziu depois de 72 horas à formação de uma película compacta e flutuante, quando a formulação do meio era favorável à biossíntese de celulose. A visão da rede da membrana celulósica pela microscopia eletrônica de varredura (SEM) de grande ampliação (**vide** figura 61), permite observar as microfibrilas celulósicas e algumas células aprisionadas, que permaneceram mesmo depois de exaustivas lavagens com água.

Figura 60 - Microscopia ótica do biofilme fresco de *Acetobacter xylinum* corado com "Coomassie R"; Ampliação final de 2.800 vezes

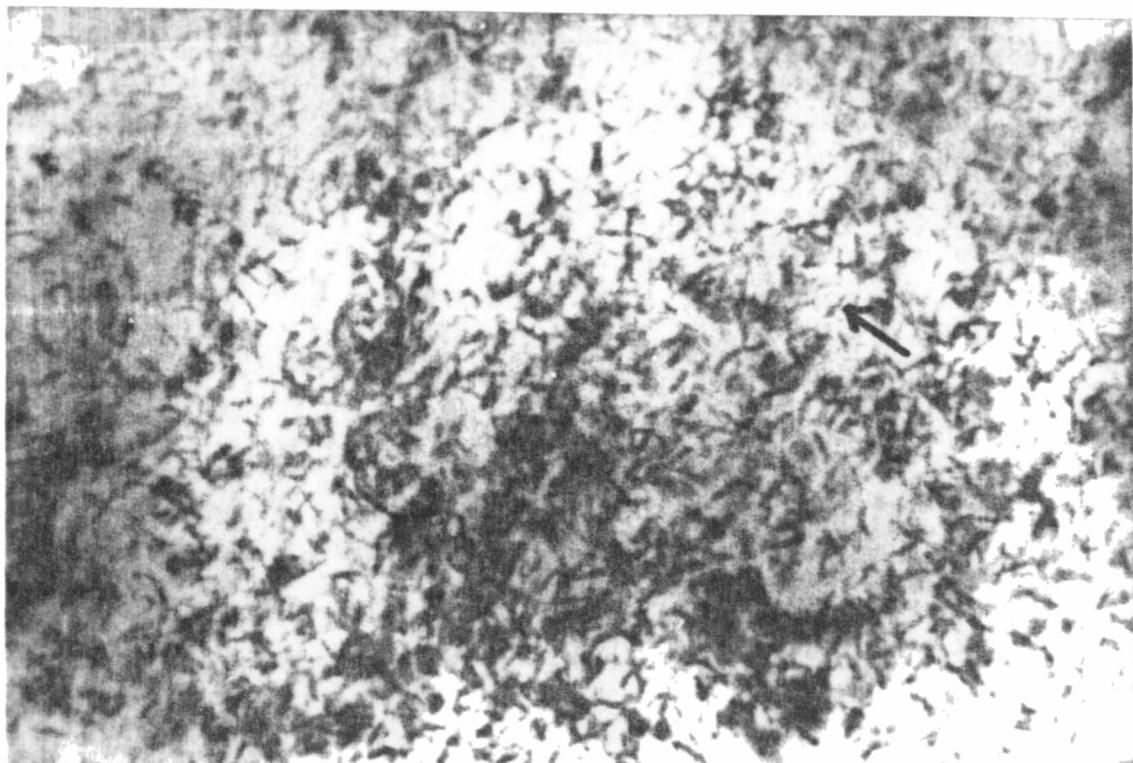
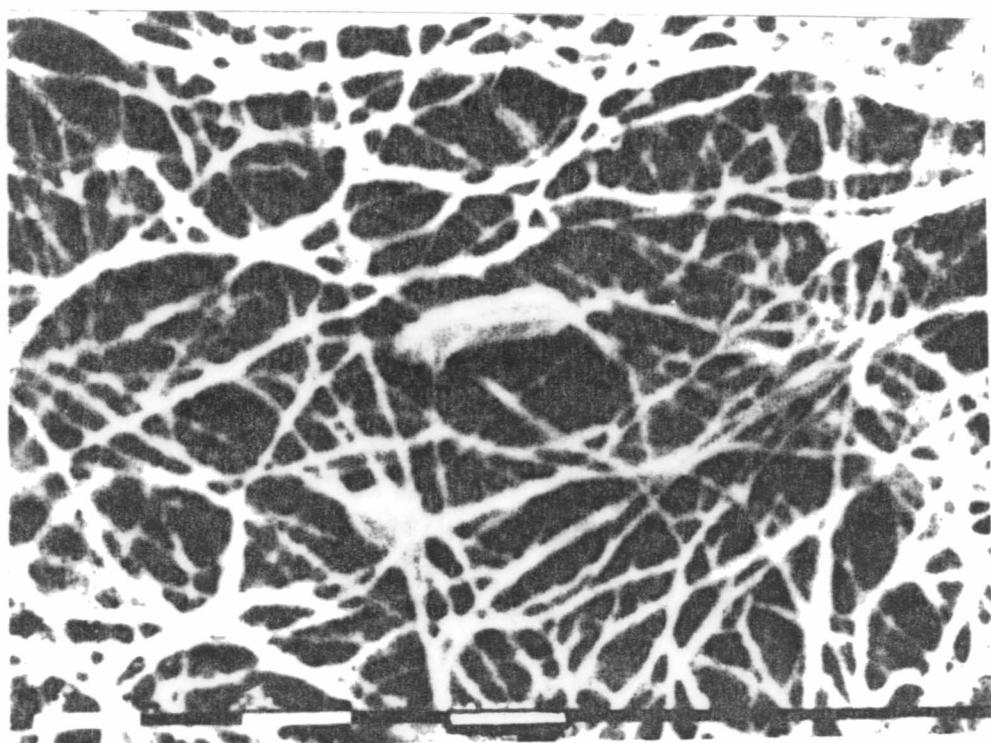


Figura 61 - Micrografia eletrônica de varredura (SEM) de uma célula de *Acetobacter xylinum* (cepa "JF") aprisionada no biofilme; Ampliação final de 20.000 vezes



A cadeia celulósica sintetizada, que aprisiona parte das células bacterianas mesmo depois de minuciosa lavagem com água, é facilmente corada com corantes, tais como "Ponceau S" (proteínas) e safranina (o contracorante para microrganismos Gram-negativos), ou Vermelho Congo

### 3.2.2 Aumento da produção do biofilme de *Acetobacter* por infusões vegetais

#### 3.2.2.1 Produção do biofilme de *Acetobacter* na presença de infusões vegetais, em temperatura ambiente

A produção de celulose comparativa de *A. xylinum*, em temperatura ambiente, tendo como referencial um meio isento de fontes vegetais, e aqueles suplementados com quantidades reduzidas de extratos de diferentes famílias de plantas (*Sterculiaceae*, *Sapindaceae*, *Theaceae*, *Aquifoliaceae*, *Rubiaceae*) resultou em visível aumento das respectivas membranas celulósicas, em todos os casos. Entre todos os ensaios realizados, a melhor estimulação foi obtida com infusões de chá (*Camellia sinensis*) em cultivos longos (> 7 dias), e com guaraná (*Paulinia cupana*) em tempos mais curtos (< 5 dias). O efeito pode ser observado nas películas isoladas e exaustivamente lavadas (**vide** figura 62). Os respectivos dados gravimétricos, depois da liofilização, estão apresentadas na tabela 20, e são uma base de comparação mais confiável enquanto biofilmes anidros.

Estas infusões de plantas continham matéria residual variável mediante evaporação do solvente. A análise para carboidratos, no caso da infusão do chá, indicou < 30 mg%, sendo a maioria deste conteúdo formado por polissacarídeo, uma fonte de carbono não competitiva com os 5,0 g% de açúcares livres do meio de cultura. Proteína foi precipitada com ácido

tricloroacético a 10% e escassamente detectada no material (LOWRY, ROSEN BROUGH et al. 1961), que havia sido tornado de livre da interferência de compostos fenólicos de baixo peso molecular pela lavagem do material com acetona, éter e metanol. A contribuição de compostos nitrogenados, além de proteínas (exceto para aqueles mencionados adiante) não foram avaliados. Por outro lado, todas as plantas testadas continham uma quantidade variável de bases relacionadas com a xantina, como detectado nos respectivos extratos clorofórmicos (e.g., aproximadamente 2 mg em cada 100 ml de infusão de chá). Uma vez que estes tipos de substâncias apresentam atividade biológica (e.g., inibição da enzima que realiza a degradação do "segundo mensageiro" no metabolismo do glicogênio (STRYER, 1988), sugere um papel regulatório para elas na síntese de celulose por *A. xylinum*, que também é mediado por nucleotídeos cíclicos (ROSS, WEINHOUSE et al., 1987; ROSS, MAYER et al., 1991).

**Tabela 20 - Efeito de infusões vegetais nativas na produção de membranas celulósicas por *Acetobacter xylinum*, em temperatura ambiente**

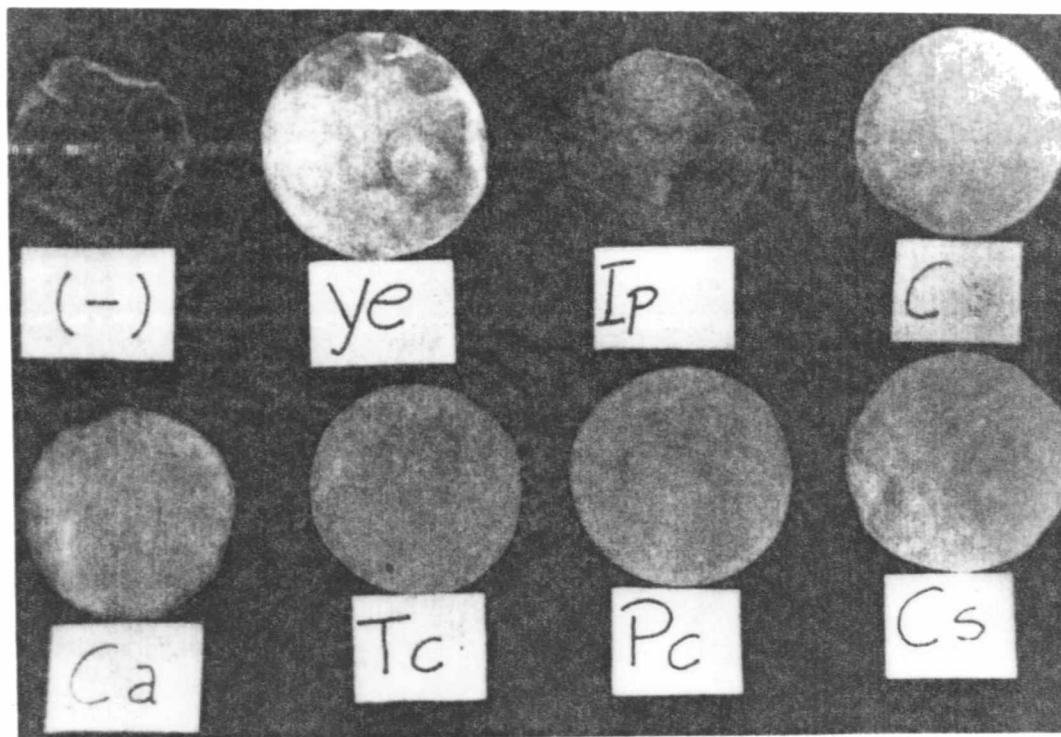
Adições ou modificações ao meio básico <sup>a</sup>	Peso úmido (g%) <sup>b</sup>	Peso seco (mg%) <sup>b</sup>
Nada (controle)	1,2	7,9
ye (extrato de levedura)	20,6	217,5
Cs (chá)	35,3	310,4
Pc (guaraná)	32,7	295,5
Ca (café)	14,0	104,2
Tc (cacao)	11,6	78,5
Cn (semente de cola)	8,6	71,9
Ip (mate)	7,5	75,2

<sup>a</sup> A composição do meio básico é como segue: 5 g% de sacarose (invertida); 0,01 g% de extrato de levedura; 0,5 ml% de etanol

<sup>b</sup> Por 100 ml de líquido e meio de cultura não agitado.

<sup>c</sup> Inóculo reduzido; frascos maiores (400 ml de meio); crescimento em temperatura ambiente por 15 dias.

Figura 62 - Aspecto comparativo das membranas processadas de *Acetobacter xylinum*



Os biofilmes provenientes da interface líquido/ar de culturas separadas e não agitadas, da cepa *A. xylinum* ("BF"), foram removidas após 15 dias em temperatura ambiente, exaustivamente lavadas com água para remover células frouxamente aderidas e material do meio residual, drenadas do excesso de água, e fotografadas. (-) controle - meio básico sem adição de infuso vegetal. As suplementações como segue: ye = extrato de levedura (0,12 g%); Ip = *Ilex paraguayensis* (mate); C = *Kola nitida* (semente de cola); Ca = *Coffea arabica* (café); Tc = *Theobroma cacao* (cacao); Pc = *Paulinia cupana* (guaraná); Cs = *Camellia sinensis* (chá)

### 3.2.2.2. Produção do biofilme de *Acetobacter* na presença de infusões de chá tratadas, em condições controladas

Os dados gravimétricos para as películas celulósicas resultantes, empregando estas infusões de chá modificadas, são mostradas na tabela 21. Foi evidente que o aumento de pH favoreceu a extração pelo clorofórmio de compostos semelhantes à alcalóides, sendo proporcionalmente desfavorável para a síntese de celulose, já que a infusão continha baixo teor do composto. Ao contrário, a extração clorofórmica em pH baixo ( $\text{pH} < 3,0$ ) permitiu que se formasse, na infusão resultante, uma película de massa equivalente à metade daquela da infusão não tratada.

Tabela 21 - Efeito de infusões vegetais nativas e parcialmente descafeinadas na produção de membranas celulósicas por *Acetobacter xylinum*, tendo sacarose como fonte de carbono

Adições ou modificações ao meio básico <sup>a</sup>	Peso úmido (g%) <sup>b</sup>	Peso seco (mg%) <sup>b</sup>
a) Infusão de chá (não tratada)	—	44,8
b) pH nativo; extraído com CHCl <sub>3</sub>	—	9,1
c) HCl (pH <3); extraído com CHCl <sub>3</sub>	—	23,7
d) NaOH (pH >11); extraído com CHCl <sub>3</sub>	—	4,5

<sup>a</sup> A composição do meio básico é como segue: 5 g% de sacarose (invertida); água de levedura (substituindo o extrato de levedura na mesma base seca, 0,01 g%); 0,5 ml% de etanol

<sup>b</sup> Por 100 ml de líquido e meio de cultura não agitado.

<sup>d</sup> Inóculo normal, tamanho do frasco e incubadora (vide M&M); coleta das membranas em 84 horas.

Outro experimento foi realizado para a extração clorofórmica em pH natural, como no experimento b (tabela 21), porém, utilizando a glucose como fonte de carbono. (vide tabela 22). Foi observado que a infusão do chá resultou na produção de 30,7 mg de peso seco, enquanto que a infusão com extração clorofórmica resultou em apenas 35% da produção. A reincorporação da matéria residual clorofórmica, ao meio de cultura, depois da evaporação do solvente orgânico, resultou na completa recuperação da síntese de celulose. A utilização do controle (não tratado) e infusões pré tratadas como suplemento de meio de cultura, dão evidência de que a maioria do(s) composto(s) estimulatório(s) são extratíveis com clorofórmio sob condição neutra ou básica. Solventes mais polares (e.g., metanol) também são capazes de remover o(s) composto(s) ativo(s) do resíduo da infusão, mas resultou em maiores massas do material extraído, tornando-se difícil de interpretar os dados. O resíduo do extrato clorofórmico (sob condições alcalinas), bem como a cafeína pura, deram reações positivas para o teste modificado da murexida (HORWITZ, 1975)

Tabela 22 - Efeito de infusões vegetais nativas e parcialmente descafeinadas na produção de membranas celulósicas por *Acetobacter xylinum*, tendo glucose como fonte de carbono

Adições ou modificações ao meio básico <sup>a</sup>	Peso úmido (g% <sup>b</sup> )	Peso seco (mg% <sup>b</sup> )
Infusão de chá (não tratada)	3,3	30,7
Extraído com CHCl <sub>3</sub>	0,7	10,7
Extraído com CHCl <sub>3</sub> ; reconstituído	3,2	29,6

<sup>a</sup> A composição do meio básico é como segue: 5 g% de glucose ; água de levedura (substituindo o extrato de levedura na mesma base seca, 0,01 g%); 0,5 ml% de etanol

<sup>b</sup> Por 100 ml de líquido e meio de cultura não agitado.

<sup>d</sup> Inóculo normal, tamanho do frasco e incubadora (vide M&M); coleta das membranas em 72 horas.

### 3.2.2.3. Determinação da natureza do(s) estimulador(es) no extrato clorofórmico

O espectro de ultra violeta (UV) das mesmas amostras apresentaram o mesmo  $\lambda_{\text{máx}}$  (aproximadamente 270 nm) para padrões de cafeína e extrato organossolúvel. A confirmação da estrutura para este regulador positivo na biossíntese de celulose por *A. xylinum* foi seguida por GLC numa coluna SE-30 ( $R_t$  para os padrões de cafeína, teobromina e teofilina iguais a 12,7, 12,9, e 14,3 minutos): a infusão de *Camellia* forneceu um único componente com um  $R_t$  de 12,2 minutos. Um resultado semelhante foi obtido para *Paulinia* (com a área do pico maior para o mesmo tempo de retenção); *Coffea* e *Theobroma* apresentaram além do pico principal de eluição mais rápida, outros componentes menores, dois deles coincidentes com padrões de teobromina e teofilina. A definitiva identificação da purina principal foi conseguida por GLC-MS: sua natureza trimetilxantínica foi confirmada por um tempo de retenção coincidente com aquele do padrão de cafeína (12,7 minutos) e um perfil de fragmentação (e.i.) quase idêntico ao relatado na literatura (GRASSELLI, 1973): 194>109>67>55>82. Apesar do efeito inquestionável e pró-celulogênico dominante da cafeína (trimetilxantina) nas infusões das plantas empregadas aqui, as dimetilxantinas análogas menores (teofilina e teobromina) podem estar tendo um efeito positivo suplementar, pelo menos nos casos do guaraná e do cacao, como

visto dos seus perfis cromatográficos múltiplos. Aliás, a maior eficiência de estimulação foi observada para *Paulinia cupana*, empregando tempos de cultivos curtos. Isto está de acordo com seu conteúdo mais alto em cafeína (4,49%) junto com cinco outras xantinas e uma pequena quantidade de guanina livre (MICHl & HABERLER, 1954), este incidentalmente era base pirimidínica envolvida na construção do nucleotídeo cíclico ativador da celulose sintase, o (GMPc)<sub>2</sub> (ROSS, WEINHOUSE et al., 1987). O que permanece para ser explorado, é o maior rendimento de membrana celulósica com tempos de cultivos mais longos empregando-se infusões de *Camellia*, apesar de seu menor conteúdo de cafeína. Outros componentes menores e polares destas infusões de plantas talvez possam desempenhar um papel sinérgico com as xantinas.

Um conteúdo de cálcio e magnésio, nas faixas de 30-68 e 90-270 µg%, foram encontrados nas infusões presentemente empregadas. Os fosfatos também foram um importante componente no meio de cultura, e isto está de acordo com um relato prévio para um meio definido mínimo (FORNG, ANDERSON et al. 1989). De fato, observou-se em *Acetobacter xylinum* as contribuições destas substâncias, como adições isoladas ou combinadas, para a formação de película celulósica, e mantendo 0,005-0,01 g% de extrato de levedura como um suplemento.

### 3.2.2.4. Confirmação do efeito estimulador das metil-xantinas na produção de celulose com as drogas puras

Nossos achados para ativação do complexo celulogênico de *A. xylinum* foram finalmente confirmados por experimentação com as xantinas puras. Seus efeitos positivos, separadamente ou em combinação estão na tabela 23.

Tabela 23 - Efeito das drogas xantínicas puras na produção de membranas celulósicas por *Acetobacter xylinum* <sup>a</sup>

Adição ao meio básico <sup>b</sup>	mg% <sup>b</sup>	Peso drenado (g%) <sup>c</sup>	Peso liofilizado (mg%) <sup>c</sup>
Nada	—	2,0	30,0
Cafeína	0,6	8,1	151,3
"	0,3	6,6	106,4
"	0,15	5,1	90,7
"	0,075	4,1	68,6
Teofilina	0,6	5,3	117,3
"	0,3	4,3	97,8
"	0,15	3,8	60,2
"	0,075	3,5	58,0
Cafeína+Teofilina	0,15+0,15	4,8	118,9

<sup>a</sup> Tabela de dados registrados com a cepa "BF"; efeitos confirmados em outras cepas.

<sup>b</sup> Meio basal = 5 g% de sacarose (invertida); 5 mg% de extrato de levedura; 0,5 ml% de etanol

<sup>c</sup> Por 100 ml de meio de cultura não agitado

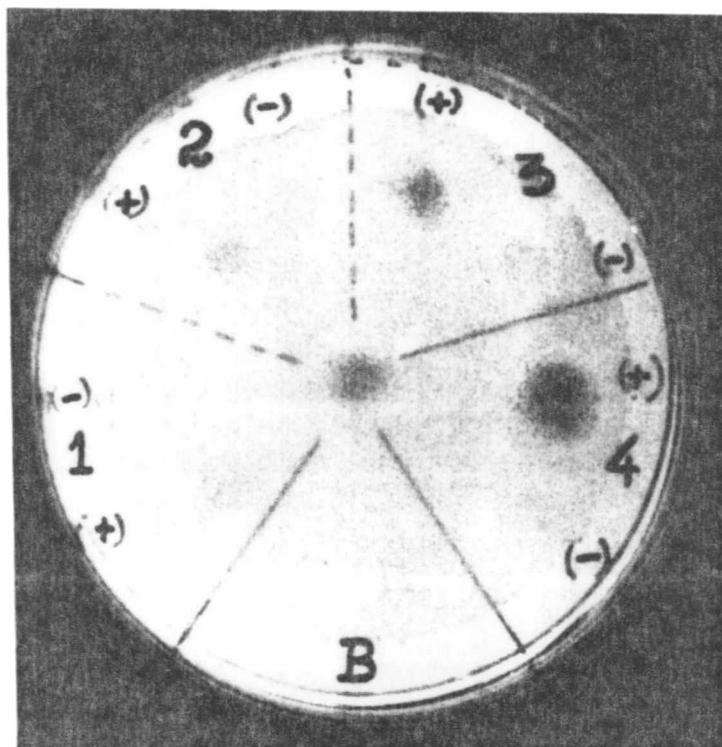
A cafeína tem sido descrita como um inibidor não competitivo da fosfodiesterase de coração de cachorro (NAIR, 1966). Uma atividade semelhante foi descrita para teofilina e outras metilxantinas (CORBASCIO, 1971). O efeito líquido destas drogas foi, portanto, o aumento da meia-vida fisiológica do(s) "mensageiro(s) secundário(s)". Nossos resultados apontam fortemente para esta situação em *A. xylinum*, as metilxantinas mais provavelmente bloqueam a ação da(s) diguanilcíclico-fosfodiesterase(s) específica(s), evitando ou adiando a inativação da celulose sintase.

### 3.2.3. Determinação da natureza do biofilme de *Acetobacter*

Os biofilmes foram rapidamente despolimerizados por enzimas celulolíticas de *Trichoderma* (Celluclast<sup>®</sup>) ou suco gástrico do caramujo *Megalobulimus paranaguensis*

(FONTANA, GEBARA et al. 1988). O passo final da quebra da celulose em celodextrinas, cellobiose, e então glucose pode ser facilmente visto no biofilme digerido revelado com um coquetel de glucose-oxidase mais peroxidase/aminoantipirina (teste em placa de Petri na figura 63).

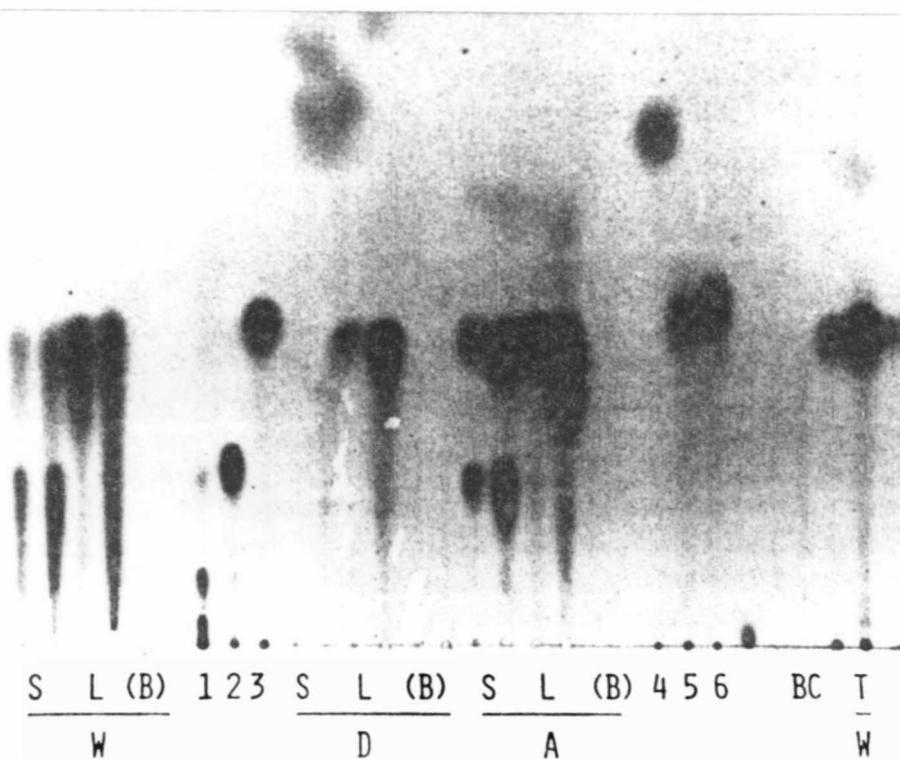
Figura 63 - Teste cromogênico em placa para a natureza celulósica do biofilme de *Acetobacter*



1, 2 e 3 = diferentes preparações de enzimas de suco gástrico de caramujo, diluídas três vezes (nativa, precipitada com sulfato de amônio saturado, e filtrada através de BioGel P-2, respectivamente); 4 = Celluclast<sup>®</sup>; (-) = enzima inativada pelo calor; e (+) = teste com a enzima ativa. B = zona onde não foi aplicada nenhuma enzima. Padrão de D-glucose, 20 µg foi aplicada no centro da placa; outros detalhes no texto.

Apesar de sua concentração de celulase mais baixa, o tratamento com o complexo de hidrolases do suco gástrico de caramujo também resulta em hidrólise visível, em virtude de seu conteúdo mais alto de celobiase. Além disso, a natureza celulósica quase pura do biofilme foi sugerida a partir da cromatografia em camada delgada (TLC) dos açúcares livres liberados pela ação da celulase fúngica (figura 64, grupo A).

Figura 64 - Cromatografia em camada delgada dos açúcares liberados do biofilme de *Acetobacter*, após a ação de enzimas celulolíticas (Celluclast®)



**W, D, A** = substratos (biofilmes lavados) água ("water"), detergente (SDS 1%), e alcali (NaOH 2M); **S, L** - tempos de incubação curto ("short" - 3 horas) e longo (60 horas). **(B)** = "branco" da enzima; e **T** = hidrólise com ác. trifluoracético. Padrões: 1 = celodextrinas; 2 = cellobiose; 3 = D-glucose; 4 = L-ramnose; 5 = L-arabinose; e 6 = D-manose. Placa: Sílica-Gel 60, Merck; Solvente = isopropanol:acetato de etila:água (85:5:10 v/v). Spray: Orcinol/metanol/ác. sulfúrico.

A comparação de tempos de incubação curtos (S) com longos (L), faixa S/A e faixa L/A respectivamente, indica que as manchas dos oligômeros iniciais são cellobiose + celodextrinas, uma vez que elas podem ser convertidas a glucose. O mesmo perfil é visto com a membrana nativa (somente lavada com água; faixa S e L/W), mas aqui a resolução do açúcar livre é atrapalhada pela contaminação do hidrolizado com outros componentes celulares. Sob as mesmas condições de incubação para o filme lavado com detergente (faixa L/D), a liberação direta de glucose é preferencial, possivelmente devido ao melhor desempenho da componente  $\beta$ -glucosidase do complexo celulolítico. Da mesma forma, a glucose aparece como o produto depois de forte hidrólise do biofilme nativo e lavado com água, usando-se o ácido trifluoracético (faixa T/W).

Foi observado que a hidrólise a 95 °C com TFA concentrado (diluído 1:2, em virtude da umidade da amostra), não leva à completa dissolução da película, mesmo depois de 6 horas de incubação. A contribuição do peso da biomassa bacteriana (base seca) na quantidade de amostra analisada, provavelmente não pode explicar a retenção parcial da integridade da membrana.

Tanto as membranas nativas quanto as tratadas com detergente ou álcali retêm fortemente CalcoFluor, um teste relatado como sendo seletivo para algumas  $\beta$ -D-glucanas (HAIGLER, BROWN-JR et al., 1980). As respectivas fluorescências sob a luz ultra violeta (354 nm) foram proporcionais à espessura da camada celulósica e, até à quantidade de celulose sintetizada em cada membrana. A figura 60 mostra um biofilme corado com "Coomassie Brilliant Blue": a biomassa bacteriana fica mais corada devido ao seu conteúdo proteico (uma célula isolada está marcada com a seta). Este perfil de coloração fica menos visível em biofilmes lavados com SDS ("Sodium Dodecyl Sulphate") a 1% ou NaOH 1M. Se o biofilme nativo for lavado com álcali mais forte, i.e., NaOH a 17,5 g%, como é recomendado para o fracionamento de  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -celulose (TAPPI, 1961), ele sofre um dramático encolhimento (aproximadamente 60% de redução em tamanho), enquanto que a lavagem com o detergente (SDS) resulta em membranas mais limpas e transparentes, sem encolhimento.

A detecção de glicanas poliméricas ou componentes traço no biofilme nativo foi realizada na fração solubilizada em álcali e submetida à hidrólise ácida com TFA. Os açúcares livres foram convertidos em derivados alditol-acetato e analizados por GLC. Um perfil de monossacarídeos de glucose>arabinose>ramnose>manose foi obtido, e excetuando-se a arabinose, as hexoses, e a desoxi-hexose são, os componentes do "acetan", uma heteroglicana acídica que tem sido relatada estar presente em algumas cepas tipo selvagem e mutantes de *Acetobacter xylinum* (IANNINO, COUSO et al., 1988). O ácido urônico do "acetan", se também presente no hidrolizado, não foi detectado como um derivado alditol acetato. A glucose como um componente principal, pode ser explicado por ser o "centro" celulósico do "acetan" e em hipótese menos provável seria a contaminação da  $\gamma$ -celulose, que é mais facilmente

hidrolizável, obtida no extrato alcalino. Nenhuma explicação foi encontrada para a presença de arabinose, uma vez que a única pentose relatada como componente da membrana de *Acetobacter* é xilose (RUBEN AND BOKELMAN, 1987), e apenas traços da última podem ser detectados por GLC. É importante mencionar que uma estrutura de parede celular diferenciada foi postulada para *Acetobacter* tentando explicar sua extraordinária resistência celular à lise (COLVIN & LEPPARD, 1977) e que esta bactéria também realiza a biossíntese de glucana ramificada com ligação  $\beta$ -1,2 (COLVIN, SOWDEN et al., 1979).

### 3.2.4 Características da celulose de *Acetobacter*

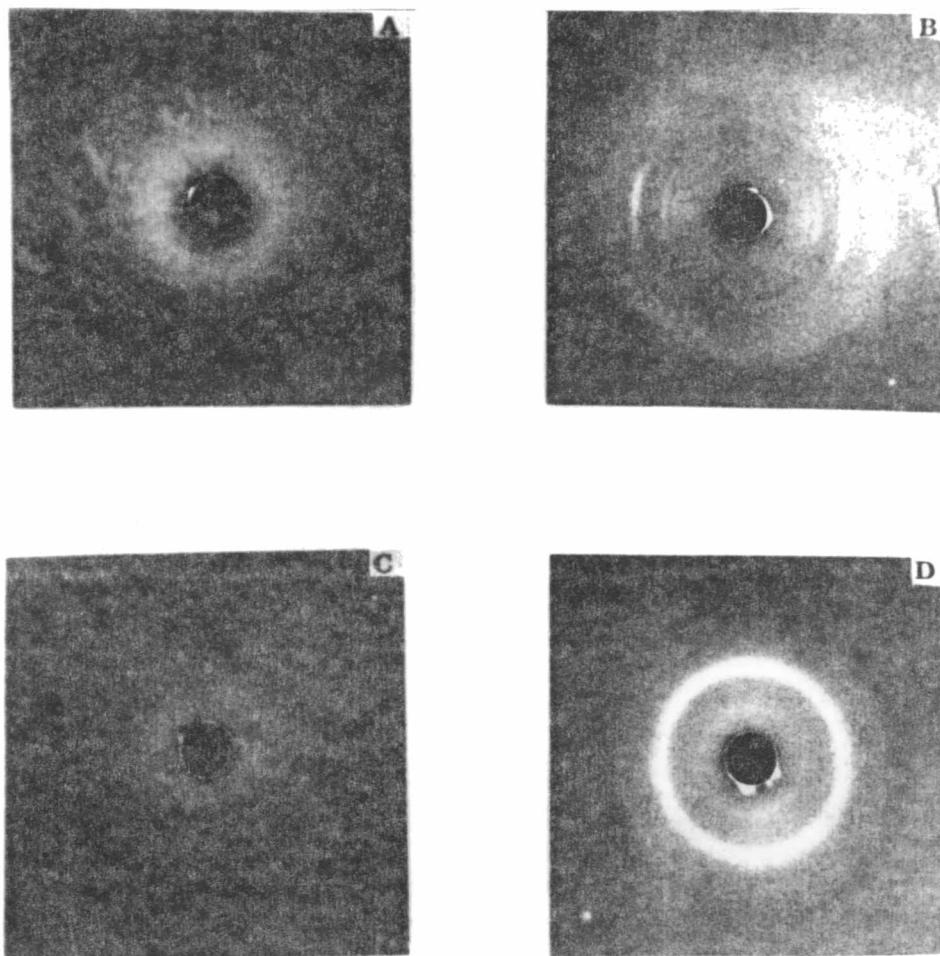
A rede celulósica, apresenta uma incrível capacidade de reter água, pois 200 gramas do biofilme de *Acetobacter* bem drenado ( $\approx$  0,40 cm de espessura) depois de seco resulta em apenas 1,35 gramas ( $\approx$  5  $\mu$ m de espessura em média). A secagem obviamente causa dramáticas mudanças na porosidade das multicamadas celulósicas, bem como na interação física entre as cadeias individuais do polissacarídeo.

A inspeção microscópica de um filme re-hidratado, pressionado entre duas lamínulas calibradas, mostra que o filme experimenta um inchamento muito limitado, não excedendo o dobro em espessura, comparado com a redução de gramas observada no passo de desidratação original.

O filme dessecado apresenta fragilidade ao rasgo e suporta moderadamente a tensão de força, enquanto que a última característica aumenta dramaticamente em mantas celulósicas frescas ou re-umedecidas.

A cristalinidade e orientação das microfibrilas também são afetadas pela manipulação e tratamentos físicos/químicos, como pode ser visto pelas medidas de difração de raio-X (figura 65A-D).

Figura 65 - Diagrama de raio-X do biofilme de *Acetobacter* sob diferentes tratamentos



(A) Biofilme exaustivamente lavado com água (espécime úmido). (B) Biofilme úmido, esticado 10% (espécime seco). (C) BioFill® (produto comercial; 8,5% de umidade). (D) Biofilme úmido previamente tratado com NaOH a 17,5%, 10% esticado (espécime seco). (Um diagrama de referência foi registrado para celulose de algodão (foto não mostrada)).

O biofilme exaustivamente lavado com água (A, mantido úmido) revela um halo difuso no diagrama de raio-X, uma típica condição para celulose amorfa. Sob um estiramento de 10% e secagem, ele adquire uma orientação preferencial para as regiões cristalinas (B), enquanto que o produto comercial mostra nenhuma orientação preferencial e algum grau de cristalinidade (C), esta última propriedade aumentando depois do tratamento alcalino e secagem do biofilme úmido original (D, amostra estirada 10%).

### 3.2.5. Aplicação médica do biofilme celulósico de *Acetobacter* (BioFill®)

A semelhança da película, resultante do adequado processamento do biofilme celulósico, com a pele humana, inspirou sua aplicação médica como um substituto temporário da pele (Fontana, Souza et al. 1990).

O BioFill® (nome comercial adotado pela empresa de mesmo nome para a película de *Acetobacter xylinum*, cogitada para fins médicos) está experimentando um uso exponencial para vários tratamentos de injúrias da pele, tal como enxerto de pele na cirurgia de carcinoma basal, queimaduras severas do corpo, descamação facial, sobre suturas, dermoabrasões, lesões da pele e queimaduras de segundo grau, úlceras crônicas, epidermólise infecciosa, e nas regiões doadora e receptora em enxertos de pele (PAOLA & SOUZA, 1987; CABRAL, GATTAZ et al., 1987; REBELLO, ALMEIDA et al., 1987; PEIXOTO & SANTOS, 1988; PITANGUY, SALGADO et al., 1988; HILARIO & VASQUEZ, 1988). Estes autores documentam as seguintes vantagens para BioFill® como um substituto temporário da pele e gaze biológico, em mais de 400 tratamentos: alívio imediato da dor, íntima adesão ao leito da ferida, diminuição do desconforto pós-operatório, barreira eficiente à instalação/crescimento de micróbios patogênicos, facilidade de inspeção da pele/ferida (transparência), rápida cicatrização, retenção melhorada do exudato (água, eletrólitos e proteínas), destacamento espontâneo após a reepitelização, custo e tempo de tratamento reduzidos. Uma falha tem sido indicada: a limitada elasticidade quando a aplicação de BioFill® é feita em áreas de grande mobilidade (e.g., região perioral).

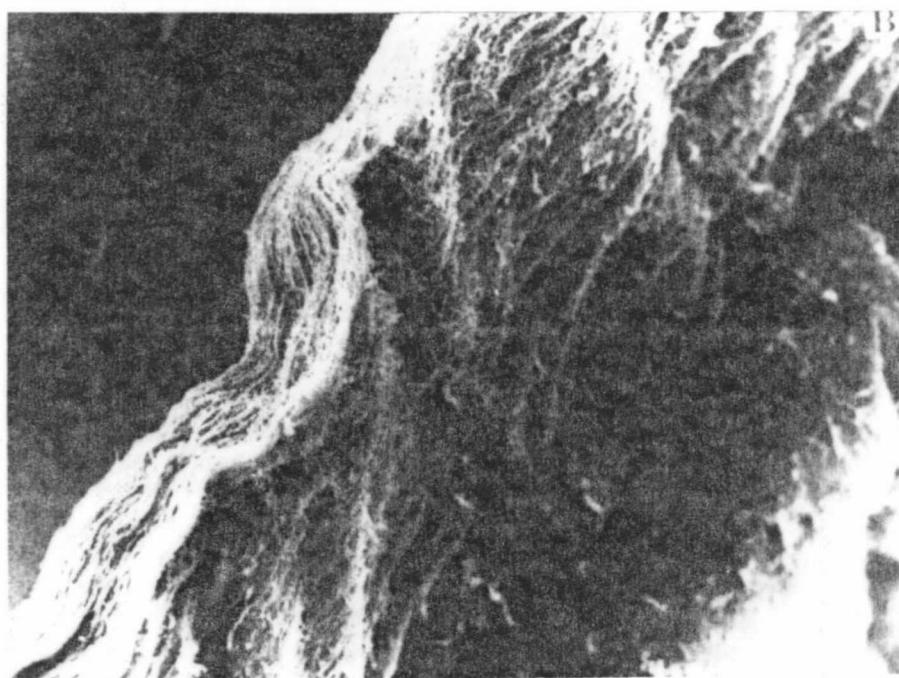
A microscopia eletrônica de varredura, das membranas tratadas com tetraóxido de ósmio, são mostradas na figura 66 na visão frontal para o BioFill® novo (A), e a membrana depois de seu descolamento espontâneo dum ferimento de pele em tratamento (B). Na última, camadas distintas da película de celulose são visíveis, trazendo junto alguns fragmentos da crosta epidermal.

Figura 66A - Micrografia eletrônica de varredura do BioFill® novo, impregnado com tetraóxido de ósmio



Visão frontal; ampliação final de 1.200 vezes

Figura 66B - Micrografia eletrônica de varredura do BioFill® usado + fragmentos da crosta epidermal, impregnado com tetraóxido de ósmio



Ampliação de 2.000 vezes

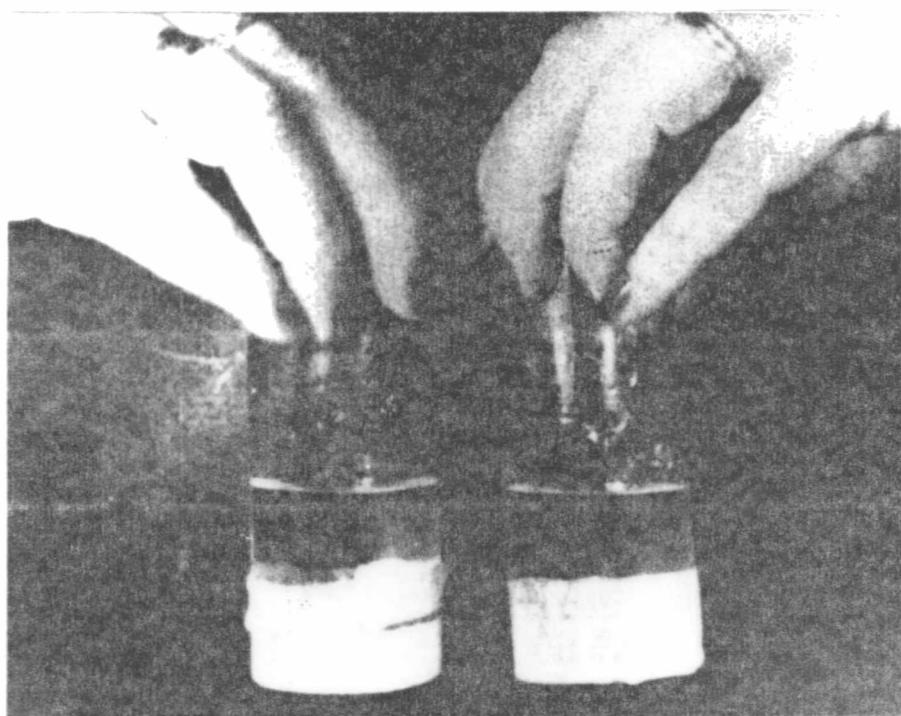
A facilidade de aplicação do BioFill®, como uma ferramenta terapêutica em ferimentos da pele, está exemplificado na figura 67.

Figura 67 - Aplicação do BioFill® à pele humana queimada



A íntima aderência ao leito cruento da ferida é claramente visível na zona central da peça. A película adere firmemente sobre superfícies de vidro, assim que o excesso de água é evaporado, e ela não permite que a água na forma líquida atravesse (figura 68), mas permite a transferência da água na forma de vapor e de outros gases; uma característica importante para aplicações médicas em curso.

Figura 68 - Aderência do BioFill® e propriedades de filtração



A coluna do cilindro de água é de 40 ml

## CONCLUSÕES

As concentrações iniciais das fonte de carbono, nitrogênio e magnésio que restringiram o crescimento, de *Enterobacter* e *Alcaligenes*, foram: concentrações de glucose  $\leq$  a 2,5 g/l em presença de 1,0 g/l de sulfato de amônio, concentrações de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \leq$  a 0,25 g/l em presença de 10,0 g/l de glucose, e concentrações de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} \leq 0,00625$  g/l em presença de 10,0 g/l de glucose e 0,5 g/l de sulfato de amônio;

Nas cepas EPS<sup>+</sup> (*Alcaligenes* 31961 e *Enterobacter* 87) a fonte de carbono foi preferencialmente usada para a síntese do exopolissacarídeo;

A cepa *Enterobacter* 31 (EPS<sup>-</sup>) acumulou em geral mais, e até o dobro do polímero intracelular (glicogênio) que a correspondente cepa EPS<sup>+</sup>;

A cepa *Alcaligenes* mut (EPS<sup>-</sup>) acumulou, em geral, a metade do polímero intracelular (PHB) que a correspondente cepa EPS<sup>+</sup>;

Com *Alcaligenes* EPS<sup>+</sup> e *Enterobacter* EPS<sup>+</sup>, tanto a restrição da fonte de nitrogênio (EN/2) quanto a de magnésio (EMg/16), provocaram aumentos na produção relativa dos exopolissacarídeos, que foram superiores com a fonte de nitrogênio orgânica;

Nos experimentos de carbono (EC), as maiores razões molares C:N também proporcionaram uma maior produção relativa do exopolissacarídeo para *Alcaligenes* EPS<sup>+</sup>, e excetuando-se as condições com problemas de pH, o mesmo ocorrendo para *Enterobacter* EPS<sup>+</sup>;

Os meios semi-sintéticos (com caseína hidrolizada como fonte de nitrogênio), foram os que proporcionaram os maiores rendimentos em exopolissacarídeo, e 67% dos maiores acúmulos dos polímeros intracelulares em ambos os gêneros;

As melhores condições para a produção de exopolissacarídeo para *Enterobacter* EPS<sup>+</sup> foram: EC 05 (CH), com uma produção de 0,714 g/l de EPS e rendimento de 14%, e EMg/16 (CH), com uma produção de 1,073 g/l de EPS e rendimento de 11,3%. Dos cultivos com caseína, estas foram as condições onde houve menor acúmulo do polímero intracelular;

As melhores condições para a produção de exopolissacarídeo para *Alcaligenes* EPS<sup>+</sup> foram: EC 20 (CH) com uma produção de 3,056 g/l de EPS e rendimento de 22,8%, e EMg/16 (CH) com uma produção de 1,631 g/l de EPS e rendimento de 41,2%. Dos cultivos com caseína, estas também foram as condições onde houve menor acúmulo do polímero intracelular;

Nos cultivos de *Alcaligenes* EPS<sup>+</sup>, o aumento na concentração de glucose provocou um aumento proporcional de viscosidade. Comparativamente, o exopolissacarídeo produzido por *Enterobacter* EPS<sup>+</sup> causou menor viscosidade no meio de cultura, que foi consequência direta da quantidade sintetizada, bem como das características reológicas inerentes ao polissacarídeo;

A mesma concentração dos exopolissacarídeos isolados, coletados em diferentes períodos de cultivo, produziram diferentes viscosidades;

A histórica declaração de "tea fungus" adotada para *Acetobacter xylinum* foi satisfatoriamente esclarecida. Ativadores para o complexo celulogênico bacteriano e provindo de *Camellia sinensis*, bem como de outras plantas, foram identificadas como cafeína e

compostos relacionados (teofilina, teobromina). O(s) alvo(s) sugerido(s) para estas xantinas metiladas foram a inibição da(s) fosfodiesterase(s), que degrada(m) o nucleotídeo raro, diguanil cíclico, favorecendo a biossíntese de celulose;

A película de celulose, uma associação muito íntima de microfibrilas de celulose quase pura e partes da biomassa bacteriana apirogênica, devido as suas peculiares propriedades físicas, químicas e biológicas, é uma ferramenta melhorada e eficaz para o tratamento de várias injúrias da pele;

#### 4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ALBERSHEIN, P.; NEVINS, D.J.; ENGLISH, P.D., et al. A method for the analysis of sugars in plant cell-wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. *Carbohydr. Res.*, Amsterdam, v. 5, p. 340-345, 1967.
- 2 ALONI, Y.; BENZIMAN, M. Intermediates of cellulose synthesis in *Acetobacter*. In: BROWN JR, R.M., **Cellulose and Other Natural Polymer Systems**. New York: Plenum Publishing Corp., 1982. p. 341-361.
- 3 ALONI, Y.; COHEN, Y.; BENZIMAN, M., et al. Solubilization of UDP-glucose:1,4- $\beta$ -D-glucan 4- $\beta$ -D-glucosyl transferase (cellulose synthase) from *Acetobacter xylinum*. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 258, p. 4419-4423, 1983.
- 4 ALONI, Y.; DELMER, D.P.; BENZIMAN, M. Achievement of high rates of *in vitro* synthesis of 1,4- $\beta$ -glucan: activation by cooperative interaction of the *Acetobacter xylinum* enzyme system with GTP, polyethylene glycol, and a protein factor. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 77, p. 6448-6452, 1982.
- 5 AMEMURA, A.; HARADA, T. Structural studies of extracellular acidic polysaccharides secreted by three non-nodulating Rhizobia. *Carbohydr. Res.*, Amsterdam, v. 112, p. 85-93, 1983.
- 6 AMIKAM, D.; BENZIMAN, M. Cyclic diguanylic acid and cellulose synthesis in *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.*, Washington, v. 171, p. 6649-6655, 1989.
- 7 ANDERSON, A.J.; DAWES, E.A. Occurrence, metabolism, metabolic role and industrial uses of polyhydroxy-alkanoates. *Microbiol. Rev.*, Washington, v. 54, p. 450-472, 1990.
- 8 ANDERSON, A.N.; PAROLIS, H.; PAROLIS, L.A.S. Structural investigation of the capsular polysaccharide from *Escherichia coli* O9:K37 (A84a). *Carbohydr. Res.*, Amsterdam, v. 163, p. 81-90, 1987.

- 9 ANON. Gellan gum in micro-encapsulation. **Commercial Development Bulletin**, Kelco Div. of Merck & Co., Inc., San Diego, v. CD-31, 1983.
- 10 ANON. K9A50 for use in aqueous gel systems. **Commercial Development Bulletin**, Kelco Div. of Merck & Co., Inc., San Diego, v. CD-30, 1983.
- 11 ANON. Gelrite - gellan gum for microbiological applications. **Commercial Development Bulletin**, Kelco Div. of Merck & Co., Inc., San Diego, v. CD-34, 1985a.
- 12 ANON. Gelrite - gellan gum thermal-reversible gelling agent as a agar replacer. **Commercial Development Bulletin**, Kelco Div. of Merck & Co., Inc., San Diego, v. CD-35, 1985b.
- 13 ANTOINE, A.D.; TEPPER, B.S. Characterization of glycogens from *Mycobacteria*. **Arch. Biochem. Biophys.**, Duluth, v. 134, p. 207-213, 1969.
- 14 BAKER, S.A. Application of infrared spectra to cellulose. In: WHISTLER, R.L., **Methods Carbohydr. Chem.** New York: Academic Press, 1963. p. 104-108.
- 15 BAKER, S.A.; BOURNE, E.J.; WHIFFEN, D.H. Use of infrared analysis in the determination of carbohydrate structure. In: GLICK, D., **Methods Biochem. Anal.** New York: Interscience Publishers, Inc., 1956. p. 238.
- 16 BALLARD, D.G.H.; HOLMES, P.A.; SENIOR, P.J. Formation of polymers of  $\beta$ -hydroxybutyric acid in bacterial cells and a comparison of the morphology of growth with the formation of poly-ethylene in the solid state. In: FONTANILLE, M. & GUYOTE, A., **Recent Advances in Mechanistic and Synthetic Aspects of Polymerization**. Lancaster: Kluwer Publishing Co., 1987. p. 293-314.
- 17 BAPTIST, J.N. Process for preparing poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid. **US Patent Application**, US, v. p. 3044942, 1962.
- 18 BAPTIST, J.N.; WEBER, F.X. Plasticized poly-beta-hydroxybutyric acid and process. **US Patent Application**, US, v. p. 3182036, 1965.

- 19 BAR-OR, Y.; SHILO, M. Characterization of macromolecular flocculants produced by *Phomidium* species strain J-1 and by *Anabaenopsis circularis* PCC6720. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v. 53, p. 2226-2230, 1987.
- 20 BAYER, E.M. Areas of adhesion between wall and membrane of *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.*, Reading, v. 53, p. 395-404, 1968.
- 21 BAYER, M.E.; CARLEMALM, E.; KELLENBERGER, E. Capsule of *Escherichia coli* K29: ultra-structural preservation and immuno electron microscopy. *J. Bacteriol.*, Washington, v. 162, p. 985-991, 1985.
- 22 AYER, M.E.; THUROW, H. Polysaccharide capsule of *Escherichia coli* : microscope study of its size, struture, and its synthesis. *J. Bacteriol.*, Washington, v. 130, p. 911-936, 1977.
- 23 BEBAULT, G.M.; DUTTON, G.G.S.; FUNNELL, N.A., et al. Structural investigation of *Klebsiella* serotype K32 polysaccharide. *Carbohydr. Res.*, Amsterdam, v. 63, p. 183-192, 1978.
- 24 BENZIMAN, M.; BURGER-RACHAMINOV, H. Synthesis of cellulose from pyruvate by succinate-grown cells of *Acetobacter xylinum*. *J. Bacteriol.*, Washington, v. 84, p. 625-630, 1962.
- 25 BENZIMAN, M.; MAZOVER, A. Nicotinamide adenine dinucleotide- and nicotinamide adenine dinucleotide-phosphate specific glucose-6-phosphate dehydrogenases of *Acetobacter xylinum* and their role in the regulation of pentose cycle. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 248, p. 1603-1608, 1973.
- 26 BENZIMAN, M.; RIVETZ, B. Factors affecting hexose phosphorylation in *Acetobacter xylinum*. *J. Bacteriol.*, Washington, v. 111, p. 325-333, 1972.
- 27 BOEREE, N.R.; DOVE, J.; COOPER, J.J., et al. Development of a degradable composite for orthopaedic use - mechanical evaluation of an hydroxyapatite/polyhydroxybutyrate composite material. *Biomaterials*, Guildford, v. 14, n. 10, p. 797-796, 1993.
- 28 BRANDAL, H.; GROSS, R.A.; LENS, R.W., et al. Plastics from bacteria and for bacteria: poly( $\beta$ -hydroxy-alkanoates) as natural, biocompatible, and biodegradable

- polyesters. In: FIECHTER, A., **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.** Berlin: Springer-Verlag, 1990. p. 77-93.
- 29 BRANDAL, H.; GROSS, R.A.; LENZ, R.W., et al. *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly( $\beta$ -hydroxyalkanoatos) for potencial applications as biodegradables polyesters. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 54, p. 1977-1982, 1988.
- 30 BRANDAL, H.; KNEE-JR, E.J.; FULLER, R.C., et al. Ability of the phototrophic bacterium *Rodospirillum rubrum* to produce various poly( $\beta$ -hydroxyalkanoates): potencial sources for biodegradable polyesters. **Int. J. Biol. Macromol.**, Guildford, v. 11, p. 49-55, 1989.
- 31 BRANDAL, H.; PÜCHNER, P. The degradation of shampoo bottles in a lake. In: DAWES, E.A., **Novel Biodegradable Microbial Polymers**. Dordrecht: Kluwer academic Publishers, 1990. p. 421-422.
- 32 BRAY, G.A. A simple efficiente liquid scintillator for counting aqueous solutions in a liquid scintillation. **Anal. Biochem.**, Duluth, v. 1, p. 279-285, 1960.
- 33 BRIESE, B.H.; JENDROSSEK, D.; SCHLEGEL, H.G. Degradation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by aerobic sewage sluge. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v. 117, n. 1, p. 107-112, 1994.
- 34 BRIVONESE, A.C.; SUTHERLAND, I.W. Polymer production by a mucoid strais of *Azotobacter vinelandii* in batch culture. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, Heidelberg, v. 30, p. 97-102, 1989.
- 35 BROCK, T.D. **The Biology of Microorganisms**. Englewood Cliffs: Prentice-Hall, 1979. p. 606.
- 36 BROWN, A.J. **J.Chem. Soc.**, London, v. 49, p. 432-439, 1886.
- 37 BROWN JR, R.M.; WILLISON, J.H.M.; RICHARDSON, C.L. Cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum* : visualization of the site of synthesis and direct measurementof the *in vivo* process. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 73, p. 4565-4569, 1976.

- 38 YRON, D. Industrial production of copolymers from *alcaligenes eutrophus*. In: DAWES, E.A., **Novel Biodegradable Microbial Polymers**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1990. p. 113-117.
- 39 BYRON, D. Microbial Cellulose. In: BYRON, D., **Biomaterials - Novel Materials from Biological Sources**. London: Macmillan Publishers, 1991. p. 265-283.
- 40 CABRAL, L.M.; GATTAZ, M.D.; FACTORE, L.A.P., et al. Curativo biológico no tratamento do grande queimado. **Rev. Bras. Cir.**, Rio de Janeiro, v. 77, n. 6, p. 1-7, 1987.
- 41 CAINS, P.; MILES, M.J.; MORRIS, V.J. X-ray fibre diffraction studies of members of the gellan gum family of polysaccharides. **Carbohydr. Polym.**, Essex, v. 14, p. 367-371, 1991.
- 42 CANNALE-PAROLA, E.; WOLFE, R.S. Synthesis of cellulose by *Sarcina ventriculi*. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 82, p. 403-405, 1964.
- 43 CANNON, R.E.; ANDERSON, S.M. Biogenesis of bacterial cellulose. **Crit. Rev. Microbiol.**, Boca Raton, v. 17, p. 435-447, 1991.
- 44 CARROL, V.; CHILVRES, G.C.; FRANKLIN, D., et al. Rheology and microstructure of solutions of the microbial polysaccharide from *Pseudomonas elodea*. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 114, p. 181-191, 1983.
- 45 CHEN, G.S.; SEGAL, I.H. *Escherichia coli* polyglucose phosphorylases. **Arch. Biochem. Biophys.**, Duluth, v. 127, p. 164-174, 1968a.
- 46 CHEN, G.S.; SEGAL, I.H. Purification and properties of glycogen phosphorylase from *Escherichia coli*. **Arch. Biochem. Biophys.**, Duluth, v. 127, p. 175-186, 1968b.
- 47 CHILVRES, G.R.; MORRIS, V.J. Coacervation of gelatin-gellan gum mixtures and their use in microencapsulation. **Carbohydr. Polym.**, Essex, v. 07, p. 111-120, 1987.
- 48 CHOWDHURY, T.A.; LINBERG, B.; LINDQUIST, U., et al. Structural studies of an extracellular polysaccharide (S-198) elaborated by *Alcaligenes* ATCC 31853. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 161, p. 127-132, 1987b.

- 49 HOWDHURY, T.A.; LINDBERG, B.; LINQUIST, U., et al. Structural studies of an extracellular polysaccharide, S-657, elaborated by *Xanthomonas* ATCC 53159. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 164, p. 117-122, 1987a.
- 50 COLEGROVE, G.T. Agricultural applications of microbial polysaccharides. **Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.**, Washington, v. 22, p. 456-460, 1983.
- 51 COLVIN, J.R.; LEPPARD, G.G. The biosynthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum* and *Acetobacter acetigenus*. **Can. J. Microbiol.**, Ottawa, v. 23, p. 701-709, 1977.
- 52 COLVIN, J.R.; SOWDEN, L.C.; DAOUST, V., et al. Additional properties of a soluble polymer of glucose from cultures of *Acetobacter xylinum*. **Can. J. Biochem.**, v. 57, p. 1284-1288, 1979.
- 53 CONN'S, H.J. **Biological Stains**. 9th. Baltimore: Waverly Press, Inc., 1977. p. 182, 257.
- 54 COOK, K.; COLVIN, J.R. Evidence for a bacterial influence of cellulose production on growth of *Acetobacter xylinum* in liquid medium. **Curr. Microbiol.**, New York, v. 3, p. 203-205, 1980.
- 55 CORBASCIO, A.N. **Clin. Pharmacol. & Ther.**, St. Louis, v. 12, p. 559-561, 1971.
- 56 CORNIBERT, J.; MARCHSSAULT, R.H. Physical properties of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate. IV. Conformational analysis and crystalline structure. **J. Mol. Biol.**, London, v. 71, p. 735-756, 1972.
- 57 CURNISH, A.; GREENWOOD, J.A.; JONES, C.W. Binding protein glucose transport by *Agrobacterium radiobacter* in glucose-limited continuous culture. **J. Gen. Microbiol.**, Reading, v. 134, p. 3099-3110, 1988a.
- 58 CURNISH, A.; GREENWOOD, J.A.; JONES, C.W. The relationship between glucose transport and the production of succinoglucan exopolysaccharide by *Agrobacterium radiobacter*. **J. Gen. Microbiol.**, Reading, v. 134, p. 3111-3122, 1988b.
- 59 COSTERTON, J.W.; IRVIN, R.T.; CHENG, K-J. The bacterial glycocalyx in nature and disease. **Annu. Rev. Microbiol.**, Palo Alto, v. 35, p. 299-324, 1981.

- 60 CRUICKSHANK, R.; DUGUID, J.P.; SWAIN, R.A.H. **Medical Microbiology**. 11 th. London: E. & S. Livingstone, 1965, p. 740.
- 61 DARVILL, R.G.; HALL, M.A.; FISH, J.P., et al. The intracellular reserve polysaccharide of *Clostridium pasteurianum*. **Can. J. Microbiol.**, Ottawa, v. 23, p. 947-953, 1977.
- 62 DAVIDSON, I.W.; SUTHERLAND, I.W.; LAWSON, C.J. Location of *O*-acetyl group of bacterial alginate. **J. Gen. Microbiol.**, Reading, v. 98, p. 603-606, 1977.
- 63 DAWES, E.A. Growth and survival of bacteria. In: POINDEXTER, J.S. & LEADBETTER, E.R., **Bacteria in Nature**. New York: Plenum Press, 1989. p. 67-187.
- 64 DAWES, E.A. Novel microbial polymers: an introductory overview. In: DAWES, E.A., **Novel Biodegradable Microbial Polymers**. Dordrechet: Kluwer Academic Publishers, 1990. p. 3-16.
- 65 DAWES, E.A. Storage polymers in prokaryotes. In: MOHAN, S., DOW, C. & COLES, J.A., **47th Symposium of the Society for General Microbiology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1991. p. 81-122.
- 66 DAWES, E.A.; SENIOR, P.J. The role and regulation of energy reserve polymers in microorganisms. **Adv. Microbial Physiol.**, New York, v. 10, p. 135-278, 1973.
- 67 DEINEMA, M.H.; ZEVENHUIZEN, L.P.T.M. Formation of cellulose fibrils by Gram-negative bacteria and their role in bacterial flocculation. **Arch. Mikrobiol.**, Heidelberg, v. 78, p. 42-57, 1971.
- 68 DELL, A.; DUTTON, G.G.S.; JANSSON, P-E., et al. Absence of *O*-formyl groups in *klebsiella* polysaccharides. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 122, p. 340-343, 1983.
- 69 DELMER, D.P. Biosynthesis of cellulose. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.**, San Diego, v. 41, p. 105-153, 1983.

- 70 DELMER, D.P. Cellulose biosynthesis. The biochemistry of cellulose biosynthesis. **Tappy J.**, Norcross, v. nov., p. 141-143, 1987.
- 71 DENGLER, T.; JANN, B.; JANN, K. Structure of the serine-containing capsular polysaccharide K40 antigen from *Escherichia coli* 08:K40:H9. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 150, p. 233-240, 1986.
- 72 DIETZLER, D.N.; LECKIE, M.P.; STERNHEIM, W.L., et al. Evidence for the regulation of bacterial glycogen synthesis by cyclic AMP. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Duluth, v. 77, p. 1468-1477, 1977.
- 73 DOI, Y.; SEGAWA, A.; KUNIOKA, M. Biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate in *Alcaligenes eutrophus*. **Int. J. Biol. Macromol.**, Guildford, v. 12, p. 106-111, 1990.
- 74 DOI, Y.; TAMAKI, A.; KUNIOKA, M., et al. Biosynthesis of an unusual polyester (10 mol% 3-hydroxybutyrate and 90 mol% 3-hydroxyvalerate units) in *Alcaligenes eutrophus* from pentanoic acid. **J. Chem. Soc. Chem. Commun.**, Cambridge, v. p. 1635-1636, 1987.
- 75 DOI, Y.; TAMAKI, A.; KUNIOKA, M., et al. Production of copolymers of 3-hydroxybutyrate by *Alcaligenes eutrophus* from butyric and pentanoic acids. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, Heidelberg, v. 28, p. 330-334, 1988.
- 76 DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K., et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, Washington, v. 28, p. 350-356, 1956.
- 77 DUGUID, J.P.; WILKINSON, J.F. The influence of cultural conditions on polysaccharide production by *Aerobacter aerogenes*. **J. Gen. Microbiol.**, Reading, v. 9, p. 174-189, 1953.
- 78 DUTTON, G.G.S.; SAVAGE, A.V. Structural investigation of the capsular polysaccharide of *Klebsiella* serotype K58. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 84, p. 297-305, 1980a.

- 79 DUTTON, G.G.S.; SAVAGE, A.V. Structural investigation of the capsular polysaccharide of *Klebsiella* serotype K12. *Carbohydr. Res.*, Amsterdam, v. 83, p. 351-362, 1980b.
- 80 EIDELS, L.; PREISS, J. Carbohydrate metabolism in *Rhodopseudomonas capsulata*: enzyme titers, glucose metabolism and polyglucose polymers synthesis. *Arch. Biochem. Biophys.*, Duluth, v. 140, p. 75-89, 1970.
- 81 ERBING, C.; KENNE, L.; LINBERG, B., et al. Structural studies of the capsular polysaccharide from *Klebsiella* type 1. *Carbohydr. Res.*, Amsterdam, v. 50, p. 115-120, 1976.
- 82 ERNEST, A.; BÖGER, P. Glycogen accumulation and the induction of nitrogenase activity in the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *J. Gen. Microbiol.*, Reading, v. 131, p. 3147-3153, 1985.
- 83 ERNEST, A.; KIRSCHENLOHR, H.; DIEZ, J., ET AL. Glycogen content and nitrogenase activity in *Anabaena variabilis*. *Arch. Microbiol.*, Heidelberg, v. 140, p. 120-125, 1984.
- 84 FIEDLER, M.; FUSSEL, M.; SATTLER, K. Production and application of bacterial cellulose . I. Survey on state of research and investigation concerning fermentation kinetic. *Zentralbl. Mikrobiol.*, Jena, v. 144, p. 473-484, 1989.
- 85 FINDLEY, R.H.; WHITE, D.C. Polymeric beta-hydroxy-alkanoates from environmental samples and *Bacillus megaterium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v. 45, p. 71-78, 1983.
- 86 FONTANA, J.D.; KRISMAN, C.R. Glycogen synthesis in the fungus *Neurospora crassa*. *Biochim. Biophys. Acta*, Amsterdam, v. 540, p. 183-189, 1978.
- 87 FONTANA, J.D. Contribuciones al conocimiento bioquímico de *Neurospora crassa*.. Buenos Aires, 1980. Tese (Doutorado em Bioquímica), Universidade de Buenos Aires.
- 88 FONTANA, J.D.; GEBARA, M.; BLUMEL, M., et al.  $\alpha$ -4-O-Methyl-D-glucuronidase componente of xylanolytic complexes. In: WOOD, W.A. & KELLOGG, S.T., *Methods Enzymol.* San Diego: Academic Press, 1988. p. 560-571.

- 89 FONTANA, J. D.; ABILHOA, M.A. Brazilian company sells cellulose wound dressing. **Bioprocessing Technology**, Engelwood, v. 11, n. 8, p. 3, 1989.
- 90 FONTANA, J.D.; SOUZA, A.M. DE; FONTANA, C.K., et al. *Acetobacter* cellulose pellicle as a temporary skin substitute. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, Clifton, v. 24/25, p. 253-264, 1990.
- 91 FONTANA, J.D.; FRANCO, V.C.; SOUZA, S.J. DE, et al. Nature of plant stimulators in the production of *Acetobacter xylinum* ("tea fungus") biofilm used in skin therapy. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, Clifton, v. 28/29, p. 341-351, 1991.
- 92 FORNG, E.R.; ANDERSON, S.M.; CANNON, R.E. Synthetic medium for *Acetobacter xylinum* that can be used for isolation of auxotrophic mutants and study of cellulose biosynthesis. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 55, p. 1317-1319, 1989.
- 93 FRANZEN, L.E.; NORBERG, A.B. Structural investigation of the acid polysaccharide secreted by *Zooglea ramigera* 115. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 128, p. 111-117, 1984.
- 94 FUKUI, T.; YOSHIMOTO, A.; MATSUMOTO, M., et al. Enzymatic synthesis of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate in *Zooglea ramigera*. **Arch. Microbiol.**, Heidelberg, v. 110, p. 149-156, 1976.
- 95 GABRIEL, A. Economic value of biopolymers and their use in enhanced oil recovery. In: BERKELEY, R.G.W., GOODWAY, G.W. & ELLWOOD, D.C., **Microbial Polysaccharides and Polysaccharidases**. London: Academic Press, 1979. p. 191-204.
- 96 GARDNER, K.H.; BLACKWELL, J. The hydrogen bonding in native cellulose. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 343, p. 232-237, 1974.
- 97 GLASER, L. The synthesis of cellulose in cell-free extracts of *Acetobacter xylinum*. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 232, p. 627-636, 1958.
- 98 GOGOLEWSKI, S.; JOVANOVIC, M.; PERREN, S.M., et al. Tissue response and *in vivo* degradation of selected polyhydroxyacids (PHB), and poly(3hydroxybutyrate-co-

- hydroxyvalerate) (PHB/VA). **J. Biomed. Mater. Res.**, New York, v. 27, n. 9, p. 1135-1148, 1993.
- 99 GRASSELLI, J.G. **Atlas of Spectral Data and Physical Constants of Organic Compounds**. Cleveland: CRC, 1973, p. B-393.
- 100 GRIEBEL, R.; SMITH, Z.; MERRICK, J.M. Metabolism of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate. 1. Purification, composition and properties of native poly- $\beta$ -hydroxybutyrate granules from *Bacillus megaterium*. **Biochemistry**, Washington, v. 7, p. 3676-3681, 1968.
- 101 GRIEBEL, R.J.; MERRICK, J.M. Metabolism of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate: effect of mild alkaline extraction on native poly- $\beta$ -hydroxybutyrate granules. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 108, p. 782-789, 1971.
- 102 GROMET, Z.; SCHRAMM, M.; HESTRIN, S. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. IV. Enzyme systems present in a crude extract of glucose-grown cells. **Biochem. J.**, London, v. 67, p. 679-689, 1957.
- 103 GROSS, R. A.; MELLO, C. DE; LENZ, R.W., et al. Biosynthesis and characterization of poly( $\beta$ -hydroxyalkanoates) produced by *Pseudomonas oleovorans*. **Macromolecules**, v. 22, p. 1106-1115, 1989.
- 104 HAIGLER, C.H.; BENZIMAN, M. Biogenesis of cellulose I microfibrils occurs by cell-direct self-assembly in *Acetobacter xylinum*. In: BROWN JR, R.M., **Cellulose and Others Natural Systems**. New York: Plenum Publishing Corp., 1982. p. 272-297.
- 105 HAIGLER, C.H.; BROWN JR, R.M.; BENZIMAN, M. Calcofluor White ST alters *in vivo* assembly of cellulose microfibrils. **Science**, London, v. 210, p. 903-906, 1980.
- 106 HARDER, W.; DIJKHUIZEN, L. Physiological responses to nutrient limitation. **Annu. Rev. Microbiol.**, Palo Alto, v. 37, p. 1-23, 1983.
- 107 HARDING, N.E.; CLEARY, J.M.; CABANAS, D.K., et al. Genetic and physical analyses of a cluster of genes essential for xanthan gum biosynthesis in *Xanthomonas campestris*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 169, p. 2854-2861, 1987.

- 108 HAYWOOD, G.W.; ANDERSON, A.J.; CHU, L., et al. The role of NADH- and NADP-linked acetoacetyl-CoA reductases in the poly-3-hydroxyalkanoate-synthesizing organism *Alcaligenes eutrophus*. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v. 52, p. 259-264, 1988.
- 109 HAYWOOD, G.W.; ANDERSON, A.J.; DAWES, E.A. The importance of PHB-synthase substrate specificity in polyhydroxyalkanoates synthesis by *Alcaligenes eutrophus*. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v. 57, p. 1-6, 1989a.
- 110 HAYWOOD, G.W.; ANDERSON, A.J.; DAWES, E.A. A survey of the accumulation of novel polyhydroxyalkanoates by bacteria. **Biotechnol. Lett.**, Kew, v. 11, p. 471-476, 1989b.
- 111 HAYWOOD, G.W.; ANDERSON, A.J.; EWING, D.F., et al. Accumulation of a polyhydroxyalkanoate containing primarily 3-hydroxydecanoate from simple carbohydrate substrates by *Pseudomonas* sp strain NCIMB 40135. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 56, p. 3354-3359, 1990.
- 112 HESTRIN, S.; SCHRAMM, M. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. II. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. **Biochem. J.**, London, v. 58, p. 345-352, 1954.
- 113 HILARIO, A.H.; VASQUEZ, L.A.M. Utilização de um substituto temporário da pele (BioFill) nas perdas cutâneas de pacientes ambulatoriais. **Rev. Bras. Cir.**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 6, p. 393-398, 1988.
- 114 HISAMATSU, M.; SANO, K.; AMEMURA, A., et al. Acidic polysaccharides containing succinic acid in various strains of *Agrobacterium*. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 61, p. 89-96, 1978.
- 115 HOBOT, J.A.; CARLEMALM, E.; VILLIGER, W., et al. Periplasmic gel: new concept resulting from reinvestigation of bacterial cell envelope ultrastructure by new methods. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 160, n. 1, p. 143-152, 1984.
- 116 HOLLINGSWORTH, R.I.; ABE, M.; DAZZO, F.B., et al. Identification of 3-hydroxybutanoic acid as a component of the acidic extracellular polysaccharide of *Rhizobium trifolii* 0403. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 134, p. C7-11, 1984.

- 117 HOLLINGSWORTH, R.I.; DAZZO, F.B.; MORT, A.J. Reexamination of the presence of 3-hydroxybutyryl substituents in the acid capsular polysaccharide of *Rhizobium trifolii* 0403. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 169, p. 3369-3371, 1987.
- 118 HOLME, T. Continuous culture studies on glycogen synthesis in *Escherichia coli* B. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 11, p. 763-775, 1957.
- 119 HOLME, T.; LAURENT, T.; PALMSTIERNA, H. On the glycogen in *Escherichia coli* B; variation in molecular weight during growth. **Acta Chem. Scand.**, Copenhagen, v. 11, p. 757-762, 1957.
- 120 HOLMES, P.A. Application of PHB - a microbially produced biodegradable thermoplastic. **Phys. Technol.**, v. 16, p. 32-36, 1985.
- 121 HORWITZ, W., **Official Methods of Analysis of the AOAC**. 7th. Washington: 1975, p. 678.
- 123 HUISMAN, G.J.; LEEUW, O. DE; EGGINK, G., et al. Synthesis of poly-3-hydroxyalkanoates is a common feature of fluorescent pseudomonads. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 55, p. 1949-1954, 1989.
- 124 IANNINO, N.I.; COUSO, R.O.; DANKERT, M. Lipid-linked intermediates and synthesis of acetan in *Acetobacter xylinum*. **J. Gen. Microbiol.**, Reading, v. 134, p. 1731-1736, 1988.
- 125 IELP, L.; COUSO, R.; DANKERT, M. Lipid-linked intermediates in the biosynthesis of xanthan gum. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 130, p. 253-256, 1981a.
- 126 IELP, L.; COUSO, R.; DANKERT, M. Xanthan gum biosynthesis - pyruvic acid cetal residues are transferred from phosphoenol pyruvate to the pentasaccharide-P-P-lipide. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Duluth, v. 102, p. 1400-1408, 1981b.
- 127 IELP, L.; COUSO, R.; DANKERT, M. Xanthan gum biosynthesis, acetylation occurs at the prenyl-phosphosugar stage. **Biochem. Int.**, Marrichville, v. 6, p. 323-333, 1983.

- 128 JACKSON, F.A.; DAWES, E.A. Regulation of the tricarboxylic acid cycle and poly- $\beta$ -hydroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii* grown under nitrogen or oxygen limitation. *J. Gen. Microbiol.*, Reading, v. 97, p. 303-312, 1976.
- 129 JANES, B.; HOLLAR, J.; DENNIS, D. Molecular characterization of the poly- $\beta$ -hydroxybutyrate biosynthetic pathway of *Alcaligenes eutrophus* H16. In: DAWES, E.A., **Novel Biodegradable Microbial Polymers**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1990. p. 175-190.
- 130 JANN, B.; HOFFMANN, P.; JANN, K. Structure of the 3-deoxi-D-manno-octulosonic acid-(KDO)-containing capsular polysaccharide (K14 antigen) from *Escherichia coli* O6:K14:H31. *Carbohydr. Res.*, Amsterdam, v. 120, p. 131-141, 1983.
- 131 JANSSON, P-E.; LINBERG, B.; LINDBERG, J., et al. Structural studies of a polysaccharide (S-194) elaborated by *Alcaligenes* ATCC 31961. *Carbohydr. Res.*, Amsterdam, v. 156, p. 157-163, 1986.
- 132 JANSSON, P-E.; LINBERG, B.; LINDQUIST, U. Structural studies of the capsular polysaccharide from *Streptococcus pneumoniae* type 4. *Carbohydr. Res.*, Amsterdam, v. 95, p. 73-80, 1981.
- 133 JANSSON, P-E.; LINBERG, B.; WIDMALM, G., et al. Structural studies of the capsular polysaccharide from *Klebsiella* types 8 and 82, a reinvestigation. *Carbohydr. Res.*, Amsterdam, v. 175, p. 103-109, 1988.
- 134 JANSSON, P-E.; LINDBERG, B.; SANDFORD, P.A. Structural studies of gellan gum, an extracellular polysaccharide elaborated by *Pseudomonas elodea*. *Carbohydr. Res.*, Amsterdam, v. 124, p. 135-139, 1983.
- 135 JANSSON, P-E.; LINDBERG, B.; WIDMALM, G. Structural studies of an extracellular polysaccharide (S-130) elaborated by *Alcaligenes* ATCC 31555. *Carbohydr. Res.*, Amsterdam, v. 139, p. 217-223, 1985.
- 136 JANSSON, P-E.; SAVITRI, N.; LINBERG, B. Structural studies of a polysaccharide (S-88) elaborated by *Pseudomonas* ATCC 31554. *Carbohydr. Res.*, Amsterdam, v. 156, p. 165-172, 1986.

- 137 KAAR, D.B.; WATERS, J.K.; SUZUKI, F., et al. Enzymes of the poly- $\beta$ -hydroxybutyrate and citric acid cycles of *Rhizobium japonicum* bacteroids. **Plant Physiol.**, Oxford, v. 75, p. 1158-1162, 1984.
- 138 KAMIO, Y.; TERAWAKI, Y.; NAKAJIMA, T., et al. Structure of glycogen produced by *Selenomonas ruminantium*. **Agric. Biol. Chem.**, Tokyo, v. 45, p. 209-216, 1981.
- 139 KANG, K.S.; VEEDER, G.T.; COTTRELL, I.W. Some novel bacterial polysaccharides of recent development. **Progress in Industrial Microbiology**, Oxford, v. 18, p. 231-253, 1983.
- 140 KANG, K.S.; VEEDER, G.T.; MIRRASOUL, P.J., et al. Agar-like polysaccharide produced by *Pseudomonas* species: production and basic properties. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 43, p. 1086-1091, 1982.
- 141 KEEVIL, C.W.; MARCH, P.D.; ELLWOOD, D.C. Regulation of glucose metabolism in oral streptococci through independent pathways of glucose 6-phosphate and glucose 1-phosphate formation. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 157, p. 560-567, 1984.
- 142 KENNE, L.; LINBERG, B.; MADDEN, J.K. Structural studies of the capsular antigen from *Streptococcus pneumoniae* type 26. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 73, p. 175-182, 1977.
- 143 KNEE JR, E.J.; WOLF, M.; LENZ, R.W., et al. Influence of growth conditions on production and composition of PHA by *Pseudomonas oleovorans*. In: DAWES, E.A., **Novel Biodegradable Microbial Polymers**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1990. p. 439-440.
- 144 KÖNIG, H.; NUSSER, E.; STETTER, K.O. Glycogen in *Methanolobus* and *Methanococcus*. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v. 28, p. 265-269, 1985.
- 145 KÖNIG, H.; SKORKO, R.; ZILLING, W., et al. Glycogen in thermoacidophilic archaeabacteria of the genera *Sulfolobus*, *Thermoproteus*, *Desulfurococcus* and *Thermococcus*. **Arch. Microbiol.**, Heidelberg, v. 132, p. 297-303, 1982.

- 146 KOREEDA, A.; HARADA, T.; OGAWA, K., et al. Study of ultrastructure of gel-forming (1→3)- $\beta$ -D-glucan (curdlan-type polysaccharide) by electron microscopy. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 33, p. 396-399, 1974.
- 147 KOTLER, R.; SIEGELE, D.A.; TORMO, A. The stationary phase of the bacterial life cycle. **Ann. Rev. Microbiol.**, Palo Alto, v. 47, p. 855-874, 1993.
- 148 KRISMAN, C.R. A method for colorimetric estimation of glycogen with iodine. **Anal. Biochem.**, Duluth, v. 4, p. 17-23, 1962.
- 149 KUO, M-S.; MORT, A.J. Location and identity of the acyl substituents on the extracellular polysaccharides of *R. trifolii* and *R. leguminosarum*. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 145, p. 247-265, 1986.
- 150 KUO, M-S.; MORT, A.J.; DELL, A. Identification and location of a *L*-glycerate, an unusual acyl substituent in gellan gum. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 156, p. 173-187, 1986.
- 151 LAGEEVEN, R.G.; HUISMAN, G.W.; PREUSTING, H., et al. Formation of polyesters by *Pseudomonas oleovorans*: effect of substrates on formation and composition of poly-(R)-3-hydroxyalkanoates and poly-(R)-hydroxyalkenoates. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 54, p. 2924-2932, 1988.
- 152 LAW, J.H.; SLEPECKY, R.A. Assay of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 82, p. 33-36, 1961.
- 153 LEMOIGNE, M. Products of dehydration and of polymerization of  $\beta$ -hydroxybutyric acid. **Bull. Soc. Chim. Biol.**, Paris, v. 8, p. 770-782, 1926.
- 154 LEWIS, B.A.; SMITH, F. Sugar and derivatives. In: STAHL, E., **Thin-layer Chromatography: a Laboratory Handbook**. New York: Egon Stahl, 1969. p. 807-837.
- 155 LEY, J. DE; SWINGS, J.; GOSSELE, F. Family VI. Acetobacteraceae. In: KRIEG, N.R. & HOLT, J.G., **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984. p. 268-274.

- 156 LIEBERGESELL, M.; SCHIMIDT, B.; STEINBUCHEL, A. isolation and identification of granule-associated proteins relevant for poly-(3-hydroxyalkanoic acid) biosynthesis in *Chromatium vinosum* D. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v. 99, n. 2/3, p. 227-232, 1992.
- 157 LIN, C.C.; CASIDA-JR, L.E. Gelrite as a gelling agent in media for the growth of the thermophilic microorganisms. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 47, p. 427-429, 1984.
- 158 LIN, F.C.; BROWN JR, R.M. Purification of cellulose synthase from *Acetobacter xylinum*. In: SCHUERCH, C., **Cellulose and Wood - Chemistry and Technology**. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1989. p. 473-479.
- 159 LIN, F.C.; BROWN JR, R.M.; DRAKE-JR, R.R., et al. Identification of the uridine 5'-diphosphoglucose (UDP-glc) binding subunit of cellulose synthase in *Acetobacter xylinum* using the photoaffinity probe 5-azido-UDP-glc. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 265, p. 4782-4784, 1990.
- 160 LINDBERG, B.; LINDQUIST, U.; LÖNNGBERG, J., et al. Structural studies of capsular polysaccharide of *klebsiella* type 37. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 58, p. 443-451, 1977.
- 161 LINTON, J.D. The relationship between metabolite production and the growth efficiency of the producing organism. **FEMS microbiol. Rev.**, Amsterdam, v. 75, p. 1-18, 1990.
- 162 LINTON, J.D.; ASH, S.G.; HUYBRECHTS, L. Microbial polysaccharides. In: BYRON, D., **Biomaterials - Novel Materials from Biological Sources**. London: Macmillan Publishers, 1991. p. 215-261.
- 163 LOWRY, O.; ROSENROUGH, N.J.; FARR, L., et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 193, p. 265-275, 1961.
- 164 LUGTENBERG, B.; ALPHEN, L. VAN. Molecular architecture and functioning of the outer membrane of *Escherichia coli* and other Gram-negative bacteria. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 737, n. 1, p. 51-115, 1983.

- 165 MATTHYSSE, A.G. Role of the cellulose fibrils in *Agrobacterium tumefaciens* infection. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 154, p. 906-915, 1983.
- 166 McDERMOTT, T.R.; GRIFFTH, S.M.; VANCE, C.P., et al. Carbon metabolism in *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids. **FEMS Microbiol. Rev.**, Amsterdam, v. 63, p. 327-340, 1989.
- 167 MERGAERT, J.; WEBB, A.; ANDERSON, C., et al. Microbial degradation of poly-(3-hydroxybutyrate) and poly-(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in soils. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 59, n. 10, p. 3233-3238, 1993.
- 168 MICHL, H.; HABERLER, F. **Monatsh.**, v. 85, n. 4, p. 779-795, 1954.
- 169 MITOMO, H.; BARHAM, P.J.; KELLER, A. Crystallinity and morphology of poly( $\beta$ -hydroxybutyrate) and its copolymer. **Polym. J.**, v. 19, p. 1241-1253, 1987.
- 170 MOSKOWITZ, G.J.; MERRICK, J.M. Metabolism of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate. III. Enzymatic synthesis of the D(-)- $\beta$ -hydroxybutyryl coenzyme A by an enoyl hydrase from *Rhodospirillum rubrum*. **Biochemistry**, Washington, v. 8, p. 2748-2755, 1969.
- 171 NAIR, K.G. Purification and properties of 3',5'-cyclic phosphodiesterase from dog heart. **Biochemistry**, Washington, v. 5, p. 150-157, 1966.
- 172 NEIDHARDT, F.C.; INGRAHAM, J.L.; SCHAECHTER, M. **Physiology of the Bacterial Cell**. Sunderland: Sinauer Associates, Inc., 1990. p. 175-196.
- 173 NIKAIDO, H.; VAARA, M. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. **Microbiol. Rev.**, Washington, v. 49, n. 1, p. 1-32, 1985.
- 174 O'NEILL, M.A.; SELVENDRAN, R.R.; MORRIS, V.J. Structure of the acidic extracellular gelling polysaccharide produced by *Pseudomonas elodea*. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 124, p. 123-133, 1983.
- 175 O'NEILL, M.A.; SELVENDRAN, R.R.; MORRIS, V.J., et al. Structure of the extracellular polysaccharide produced by the bacterium *Alcaligenes* (ATCC 31555) species. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 147, p. 295-313, 1986.

- 176 ODHAM, G.; TUNLID, A.; WESTERDAHL, G., et al. Combined determination of poly- $\beta$ -hydroxyalkanoic and cellular fatty acids in starved marine bacteria and sewage sludge by gas chromatography with flame ionization or mass spectrometry detection. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 52, p. 905-910, 1986.
- 177 OEDING, V.; SCHLEGEL, H.G.  $\beta$ -ketothiolase from *Hydrogenomonas eutropha* H16. **Biochem. J.**, London, v. 134, p. 239-248, 1973.
- 178 OKAMURA, K.; MARCHESSAULT, R.H. X-ray structure of poly- $\beta$ -polyhydroxybutyrate. In: RAMACH, G.M., **Conformation of Biopolymers**. New York: Academic Press Inc., 1967. p. 709-720.
- 179 PALMER, T.N.; WOBER, G.; Whelan, W.J. The pathway of exogenous and endogenous carbohydrate utilization in *Escherichia coli*: a dual function for the enzymes of the maltose operon. **Eur. J. Biochem.**, Heidelberg, v. 39, p. 601-612, 1973.
- 180 PAOLA, D.Q. DE; SOUZA, M.G.P.P. Película celulósica - novo curativo biológico para melhoria do leito receptor de enxertia cutânea. **Rev. Bras. Cir.**, Rio de Janeiro, v. 77, n. 3, p. 135-138, 1987.
- 181 PEIXOTO, R.; SANTOS, D.L.N. Biofill. Uso e avaliação clínica de uma película celulósica em lesões cutâneas. **Rev. Bras. Cir.**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 2, p. 141-145, 1988.
- 182 PEOPLES, O.P.; SINSKEY, A.J. Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate synthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16. Characterization of the genes encoding  $\beta$ -ketothiolase and acetoacetyl-CoA reductase. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 264, p. 15293-15297, 1989a.
- 183 PEOPLES, O.P.; SINSKEY, A.J. Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) synthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16. Identification and characterization of the PHB polymerase gen (*phbC*). **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 264, p. 15298-15303, 1989b.
- 184 PEOPLES, O.P.; SINSKEY, A.J. Polyhydroxybutyrate (PHB): a model system for biopolymer engineering: II. In: DAWES, E.A., **Novel Biodegradable Microbial Polymers**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1990. p. 191-202.

- 185 PITANGUY, I.; SALGADO, F.; MARACAJA, T.F. Utilização de película de celulose (BioFill) como curativo biológico. **Rev. Bras. Cir.**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 5, p. 317-326, 1988.
- 186 PREISS, J. Bacterial glycogen synthesis and its regulation. **Annu. Rev. Microbiol.**, Palo Alto, v. 38, p. 419-458, 1984.
- 187 PREISS, J. Chemistry and metabolism of intracellular reserves. In: POINDEXER, J.S. & LEADBETTER, E.R., **Bacteria in Nature**. New York: Plenum Press, 1989. p. 189-258.
- 188 PREISS, J.; ROMEO, T. Physiology, biochemistry and genetics of bacterial glycogen synthesis. **Adv. Microbial Physiol.**, London, v. 30, p. 183-238, 1989.
- 189 PREISS, J.; WALSH, D.A. The comparative biochemistry of glycogen and starch. In: GINSBURG, V. & ROBBINS, P., **Biology of Carbohydrates**. New York: Wiley, 1981. p. 199-314.
- 190 PRIKAR, H.S.; CAMPBELL, P.; FEINGOLD, D.S., et al. Biosynthesis of heparin. Hydrogen exchange at C5 of the glucuronosil residues. **Biochemistry**, Washington, v. 19, p. 495-500, 1980.
- 191 REBELLO, C.; ALMEIDA, D.A.; LIMA-JR, E.M., et al. Biofill, um novo substituto da pele: nossa experiência. **Rev. Bras. Cir.**, Rio de Janeiro, v. 77, n. 6, p. 404-414, 1987.
- 192 REUSCH, R.N. Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate/calcium polyphosphate complexes in eukaryotic membranes. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, Baltimore, v. 191, p. 377-381, 1989.
- 193 REUSCH, R.N.; HISKE, T.W.; SADOFF, H.L. Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate membrane structure and its relationship to genetic transformability in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 168, p. 553-562, 1986.
- 194 REUSCH, R.N.; HISKE, T.W.; SADOFF, H.L., et al. Cellular incorporation of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate into plasma membranes of *Escherichia coli* and *Azotobacter vinelandii* alters native membrane structure. **Can. J. Microbiol.**, Ottawa, v. 33, p. 435-444, 1987.

- 195 REUSCH, R.N.; SADOFF, H.L. D(-)-poly- $\beta$ -hydroxybutyrate in membranes of genetically competent bacteria. *J. Bacteriol.*, Washington, v. 156, p. 778-788, 1983.
- 196 REUSCH, R.N.; SADOFF, H.L. Putative structure and functions of a poly- $\beta$ -hydroxybutyrate/calcium polyphosphate channel in bacterial plasma membranes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 85, p. 4176-4180, 1988.
- 197 RIBEREAU-GAYON, G.; SABRAW, A.; LAMMEL, C., et al. Biosynthesis of bacterial glycogen. IX: Regulatory properties of the adenosine diphosphate glucose pyrophosphorylases of the Enterobacteriaceae. *Arch. Biochem. Biophys.*, Duluth, v. 142, p. 675-692, 1971.
- 198 ROMEO, T.; KUMAR, A.; PREISS, J. Analysis of the *Escherichia coli* glycogen gene cluster suggests that catabolic enzymes are encoded amongst the biosynthetic gene. *Gene*, Amsterdam, v. 70, p. 363-376, 1988.
- 299 ROSS, P.; MAYER, R.; BENZIMAN, M. Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiol. Rev.*, Washington, v. 55, p. 35-58, 1991.
- 200 ROSS, P.; WEINHOUSE, H.; ALONI, Y., et al. Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature*, London, v. 325, p. 279-281, 1987.
- 201 RUBEN, G.C.; BOKELMAN, G.H. Triple-stranded, left-hand-twisted cellulose microfibril. *Carbohydr. Res.*, Amsterdam, v. 160, p. 434-443, 1987.
- 202 SANDFORD, P.A. Exocellular, microbial polysaccharides. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, San Diego, v. 36, p. 265-313, 1979.
- 203 SANDFORD, P.A.; BAIRD, J. Industrial utilization of polysaccharides. In: ASPINAL, G.O., *The Polysaccharides*. New York: Academic Press, 1983. p. 411-490.
- 204 SANDFORD, P.A.; COTTRELL, I.W.; PETTITT, D.J. Microbial polysaccharides: New products and their applications. *Pure and Appl. Chem.*, Oxford, v. 56, p. 879-892, 1984.

- 205 SCHRAMM, M.; GROMET, Z.; HESTRIN, S. Synthesis of cellulose by *acetobacter xylinum* III. Substrates and inhibitors. **Biochem. J.**, London, v. 67, p. 669-679, 1957.
- 206 SCHRAMM, M.; HESTRIN, H. Factors affecting production of cellulose at the air/liquid interface of a culture of *Acetobacter xylinum*. **J. Gen. Microbiol.**, Reading, v. 11, p. 123-129, 1954.
- 207 SCHUBERT, P.; KRUGER, N.; STEINBÜCHEL, A. Molecular analysis of the *Alcaligenes eutrophus* poly(3-hydroxybutyrate) biosynthetic operon: identification of the N terminus of poly(3-hydroxybutyrate) synthase and identification of the promoter. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 173, p. 168-175, 1991.
- 208 SCHUBERT, P.; STEINBÜCHEL, A.; SCHLEGEL, H.G. Cloning of the *Alcaligenes eutrophus* genes for synthesis of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid (PHB) and synthesis of PHB in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 170, p. 5837-5847, 1988.
- 209 SENGHA, S.S.; ANDERSON, A.J.; HACKING, A.J., et al. Production of alginate by *Pseudomonas mendocina* in batch and continuous culture. **J. Gen. Microbiol.**, Readind, v. 135, p. 795-804, 1989.
- 210 SENIOR, P.J.; BEECH, G.A.; RITCHIE, G.A., et al. The role of oxygen limitation in the formation of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate during batch and continuous culture of *Azotobacter beijerinckii*. **Biochem. J.**, London, v. 128, p. 1193-1201, 1972.
- 211 SENIOR, P.J.; DAWES, E.A. Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate biosynthesis and regulation of glucose metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. **Biochem. J.**, London, v. 125, p. 55-66, 1971.
- 212 SENIOR, P.J.; DAWES, E.A. The regulation of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate synthesis in *Azotobacter beijerinckii*. **Biochem. J.**, London, v. 134, p. 225-238, 1973.
- 213 SHEN, L.; PREISS, J. The activation and inhibition of bacterial adenosine-diphosphoglucose pyrophosphorylase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Duluth, v. 17, p. 424-429, 1964.

- 214 SHEN, L.C.; ATKINSON, D.E. Regulation of adenosine diphosphate glucose synthase from *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 245, p. 3996-4000, 1970.
- 215 SHERBROCK-COX, V.; RUSSEL, N.J.; GRACESA, P. The purification and characterization of the alginate present in extracellular material produced by mucoid strain of *Pseudomonas aeruginosa*. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 135, p. 147-154, 1984.
- 216 SHU, C-H.; YANG, S-T. Effects of temperature on cell growth and xanthan production in batch culture of *Xanthomonas campestris*. **Biotechnol. Bioeng.**, New York, v. 35, p. 454-468, 1990.
- 217 SKAJÅK-BRÆK, G.; GRASDALEN, H.; LARSEN, B. Monomer sequence and acetylation pattern in some bacterial alginate. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 154, p. 239-250, 1986.
- 218 SLATER, S.C.; VOIGE, W.G.; DENNIS, D.E. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Alcaligenes eutrophus* H16 poly- $\beta$ -hydroxybutyrate biosynthetic pathway. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 170, p. 4431-4436, 1988.
- 219 SLEPECKY, R.A.; LAW, J.H. A rapid spectrophotometric assay of alfa, beta-unsaturated acids and beta-hydroxy acids. **Anal. Chem.**, Washington, v. 32, n. 12, p. 1697-1699, 1960.
- 220 SMET, M.J. DE; EGGINK, G.; WITHOLT, B., et al. Characterization of intracellular inclusions formed by *Pseudomonas oleovorans* during growth on octane. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 154, p. 870-878, 1983.
- 221 SOMOGYI, M. A new reagent for determination of sugars. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 160, p. 61-68, 1945.
- 222 SOUZA, A.M. DE; SUTHERLAND, I.W. Exopolysaccharide and storage polymer production in *Enterobacter aerogenes* type 8 strains. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, v. 76, p. 463-468, 1994.
- 223 STANIER, R.Y.; INGRAHAM, J.L.; WHEELIS, M.L., et al. **General Microbiology**. 5th. London: Macmillan Education Ltd, 1990, p. 145-146.

- 224 STAM, H.; VERSEVELD, H.W. VAN; VRIES, W. DE, et al. Utilization of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate in free-living cultures of *Rhizobium* ORS571. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v. 35, p. 215-220, 1986.
- 225 STANDAL, R.; IVERSEN, T.G.; COUCHERON, D.H., et al. A new gene required for cellulose production and a gene encoding cellulolytic activity in *Acetobacter xylinum* are colocalized with the bsc operon. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 176, n. 3, p. 665-672, 1994.
- 226 STEINBÜCHEL, A. Polyhydroxyalkanoic acids. In: BYRON, D., **Biomaterials - Novel Materials from Biological Sources**. London: Macmillan Publishers, 1991. p. 123-213.
- 227 STEINBÜCHEL, A.; SCHUBERT, P. Expression of the *Alcaligenes eutrophus* poly-( $\beta$ -hydroxybutyric acid)-synthetic pathway in *Pseudomonas* sp. **Arch. Microbiol.**, Heidelberg, v. 153, p. 101-104, 1989.
- 228 STEINBÜCHEL, A.; SCHUBERT, P.; TIMM, A., et al. Genetic and molecular analysis of the *Alcaligenes eutrophus* polyhydroxybutyrate-biosynthetic genes and accumulation of PHA in recombinant bacteria. In: DAWES, E.A., **Novel Biodegradable Microbial Polymers**. Dordrecht: kluwer Academic Publishers, 1990. p. 143-159.
- 229 STOKKE, B.T.; ELGSAETER, A.; SKAJÅK-BRÆK, G., et al. The molecular size and shape of xanthan, xylan, bronchial mucin, alginate, and amylose as revealed by electron microscopy. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 160, p. 13-28, 1987.
- 230 STRYER, L. **Biochemistry**. 3rd. New York: W.H. Freeman & Co., 1988, p. 464.
- 231 SUTHERLAND, I.W. Biosynthesis of microbial exopolysaccharides. **Adv. Microb. Physiol.**, New York, v. 23, p. 79-150, 1982.
- 232 SUTHERLAND, I.W. Hydrolysis of unordered xanthan in solution by fungal cellulases. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 131, p. 93-104, 1984.
- 233 SUTHERLAND, I.W. Exopolymers - their role and their application. **44th FEMS Symposium**. Amsterdam: Bath University Press, 1988a. p. 240-249.

- 234 SUTHERLAND, I.W. Bacterial surface polysaccharides: structure and function. **Int. Rev. Cytol.**, San Diego, v. 231, p. 113-187, 1988b.
- 235 SUTHERLAND, I.W., **Biotechnology of Microbial Exopolysaccharides**. 1<sup>st</sup> st. Cambridge: Cambridge University Press, 1990.
- 236 SUTHERLAND, I.W. Alginates. In: BYRON, D., **Biomaterials - Novel Materials from Biological Sources**. London: Macmillan Publishers, 1991. p. 308-331.
- 237 SUTHERLAND, I.W.; Elwood, D.C. Microbial exopolysaccharides - industrial polymers of current and future potential. In: BULL, A.T, ELWOOD, D.C. & RATLEDGE, C., **29th Symposium of the Society for General Microbiology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1979. p. 107-150.
- 238 SUTHERLAND, I.W.; NORVAL, M. The synthesis of exopolysaccharide by *Klebsiella aerogenes* membrane preparations and the involvement of lipid intermediates. **Biochem. J.**, London, v. 120, p. 567-576, 1969.
- 239 SUTHERLAND, I.W.; WILKINSON, J.F. Depolymerases for bacterial exopolysaccharides obtained from phage-infected bacteria. **J.Gen. Microbiol.**, Reading, v. 39, p. 373-383, 1965.
- 240 SUTHERLAND, I.W.; WILKINSON, J.F. The composition of lipopolysaccharides of *Klebsiella aerogenes* and *Aerobacter cloacae*. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 117, p. 261-263, 1966.
- 241 SWISSA, M.; ALONI, Y.; WEINHOUSE, H., et al. Intermediary steps in cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* : studies with whole cells and cell-free preparations of the wild type and a celluloseless mutant. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 143, p. 1142-1150, 1980.
- 242 SWISSA, M.; BENZIMAN, M. Factors affecting the activity of citrate synthase of *Acetobacter xylinum* and its possible regulatory role. **Biochem. J.**, London, v. 153, p. 173-179, 1976.

- 243 TAIT, M.I.; SUTHERLAND, I.W.; CLARK-STURMAN, J. Effect of growth conditions on the production, composition and viscosity of *Xanthomonas campestris* exopolysaccharide. **J. Gen. Microbiol.**, Reading, v. 132, p. 1483-1492, 1986.
- 244 TAPPI. **Standard Methods**, p. T 203, 1961.
- 245 TARR, H.L.A.; HIBBERT, H. Studies on reactions relating to carbohydrates and polysaccharides. XXXV. Polysaccharide synthesis by the action of *Acetobacter xylinus* on carbohydrates and related compounds. **Can. J. Res.**, Ottawa, v. 4, p. 372-388, 1931.
- 246 TEATHER, R.M.; WOOD, P.J. Use of congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 43, n. 4, p. 777-780, 1982.
- 247 TIMM, A.; STEINBÜCHEL, A. Formation of polyesters consisting of medium chain-length 3-hydroxyalkanoic acids from gluconate by *Pseudomonas aeruginosa* and other fluorescent pseudomonads. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 56, p. 3360-3367, 1990.
- 248 TONN, S.J.; GANDER, J. E. Biosynthesis of polisaccharides by prokaryotes. **Ann. Rev. Microbiol.**, Palo Alto, v. 33, p. 169-199, 1979.
- 249 TREVELYAN, W.E.; HARRISON, J.S. Studies on yeast metabolism. I. Fractionation and microdetermination of cell carbohydrates. **Biochem. J.**, London, v. 50, p. 298-303, 1952.
- 250 TREVELYAN, W.E.; PROCTER, D.P.; HARRISON, J.S. Detection of sugars on paper chromatograms. **Nature**, London, v. 166, p. 444-445, 1950.
- 251 URBANOWISK, J.; LEUNG, P.; WEISSBACH, H., et al. The *in vitro* expression of the gene for *Escherichia coli* ADP glucose pyrophosphorylase is stimulated by cyclic AMP and cyclic-AMP receptor protein. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 258, p. 2782-2784, 1983.
- 252 VALLA, S.; COUCHERON, D.H.; FJAERVICK, E., et al. Cloning of the gene involved in cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum* : complementation of

- cellulose-negative mutants by the UDPG pyrophosphorylase structural gene. **Mol. & Gen. Genet.**, Berlin, v. 217, p. 26-30, 1989.
- 253 VALLA, S.; COUCHERON, D.H.; KJOSBAKKEN, J. *Acetobacter xylinum* contains several plasmids: evidence for their involvement in cellulose formation. **Arch. Microbiol.**, Heidelberg, v. 34, p. 9-11, 1983.
- 254 VALLA, S.; COUCHERON, D.H.; KJOSBAKKEN, J. Conjugative transfers of the naturally occurring plasmids of *Acetobacter xylinum* by Inc-P-plasmid mediated mobilization. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 165, p. 336-339, 1986.
- 255 VALLA, S.; COUCHERON, D.H.; KJOSBAKKEN, J. The plasmids of *Acetobacter xylinum* and their interaction with the host chromosome. **Mol. & Gen. Genet.**, Berlin, v. 208, p. 76-83, 1987.
- 256 VALLA, S.; KJOSBAKKEN, J. Cellulose-negative mutants of *Acetobacter xylinum*. **Can. J. Microbiol.**, Ottawa, v. 128, p. 1401-1048, 1982.
- 257 WALLEN, L.L.; ROHWEDDER, W.K. Poly- $\beta$ -hydroxyalkanoate from activated sludge. **Environ. Sci. & Technol.**, Washington, v. 8, p. 576-579, 1974.
- 258 WEBB, T.E.; COLVIN, J.R. The extracellular protein of *Acetobacter xylinum* and their relationship to cellulose synthesis. **Can. J. Biochem.**, Ottawa, v. 45, p. 465-470, 1967.
- 259 WEINHOUSE, H.; BENZIMAN, M. Regulation of hexose phosphate metabolism in *Acetobacter xylinum*. **Biochem. J.**, London, v. 138, p. 537-542, 1974.
- 260 WHITE, D.G.; BROWN JR, R.M. Prospects for the commercialization of the biosynthesis of microbial cellulose. In: SCHUERCH, C., **Cellulose and Wood - Chemistry and Technology**. New York: John Wiley & Sons. Inc., 1989. p. 573-590.
- 261 WHITFIELD, C.; VALVANO, M.A. Biosynthesis and expression of cell-surface polysaccharides in Gram-negative bacteria. **Adv. in Microb. Physiol.**, New York, v. 35, p. 135-246, 1993.

- 262 WILKINSON, J.F. The problem of energy-storage compounds in bacteria. **Exp. Cell Res. Suppl.**, Duluth, v. 7, p. 111-130, 1959.
- 263 WILLIAM, D.H.; WILKINSON, J.F. The isolation and estimation of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate inclusions of *Bacillus* species. **J. Gen. Microbiol.**, Reading, v. 19, p. 198-209, 1958.
- 264 WILLIAMS, W.S.; CANNON, R.E. Alternative environmental roles for cellulose produced by *Acetobacter xylinum*. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 55, p. 2448-2452, 1989.
- 265 WITHOLT, B.; HUISMAN, G.W.; PREUSTING, H. Bacterial poly(3-hydroxyalkanoates). In: DAWES, E.A., **Novel Biodegradable Microbial Polymers**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1990. p. 161-173.
- 266 WOLFROM, M.L.; THOMPSON, A. Acetolysis. **Methods Carbohydr. Chem.**, New York, v. 3, p. 143-147, 1963
- 267 WONG, H.C.; FEAR, A.L.; CALHOON, R.D., et al. Genetic organization of cellulose synthase operon in *Acetobacter xylinum*. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 87, p. 8130-8134, 1990.
- 268 WOOD, P.J. Specificity in the interaction of direct dyes with polysaccharides. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 85, p. 271-287, 1980.
- 269 YAMANAKA, S.; WATANABE, K.; KITAMURA, N., et al. The structure and mechanical properties of sheets prepared from bacterial cellulose. **J. Mater. Sci.**, v. 24, p. 3141-3145, 1989.
- 270 YU, F.; JEN, Y.; TAKEUCHI, E., et al.  $\alpha$ -glucan phosphorylase from *Escherichia coli*. Cloning of the gene and purification and characterization of the protein. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 263, p. 13706-13711, 1988.
- 271 ZAAR, K. Visualization of pores (export sites) correlated with cellulose production in the envelope of the Gram-negative bacterium *Acetobacter xylinum*. **J. Cell. Biol.**, New York, v. 80, p. 773-777, 1979.

- 272 ZEVENHUIZEN, L.P.T.M.; EBBINK, A.G. Interrelations between glycogen, poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid and lipids during accumulation and subsequent utilization in a *Pseudomonas*. **Antonie Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.**, Dordrecht, v. 40, p. 103-120, 1974.
- 273 ZHANG, H.; OBIAS, V.; GONYER, K., et al. Production of polyhydroxyankanoates in sucrose-utilizing recombinant of *Escherichia coli* and *Klebsiella* strains. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 60, n. 4, p. 1198-1206, 1994.

## ANEXO

FONTANA, J.D.; SOUZA, A.M. DE; FONTANA, C.K., et al. *Acetobacter* cellulose pellicle as a temporary skin substitute. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, Clifton, v. 24/25, p. 253-264, 1990.

FONTANA, J.D.; FRANCO, V.C.; SOUZA, S.J. DE, et al. Nature of plant stimulators in the production of *Acetobacter xylinum* ("tea fungus") biofilm used in skin therapy. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, Clifton, v. 28/29, p. 341-351, 1991.

SOUZA, A.M. DE; SUTHERLAND, I.W. Exopolysaccharide and storage polymer production in *Enterobacter aerogenes* type 8 strains. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, v. 76, p. 463-468, 1994.

## **Acetobacter Cellulose Pellicle as a Temporary Skin Substitute**

J. D. FONTANA,<sup>\*1</sup> A. M. DE SOUZA,<sup>1</sup> C. K. FONTANA,<sup>2</sup>  
I. L. TORRIANI,<sup>1</sup> J. C. MORESCHI,<sup>3</sup> B. J. GALLOTTI,<sup>3</sup>  
S. J. DE SOUZA,<sup>3</sup> G. P. NARCISCO,<sup>3</sup> J. A. BICHARA,<sup>3</sup>  
AND L. F. X. FARAH<sup>3</sup>

<sup>1</sup>*LQBB-Biomass Chemio/Biotechnology Lab, Department of Biochemistry, UFPR, PO Box 19046 (81.504) Curitiba-PR, Brazil;*

<sup>2</sup>*LACEN-FSCMR, Curitiba-PR, Brazil; and <sup>3</sup>BioFill Produtos Biotecnologicos S/A Curitiba-PR, Brazil*

### **ABSTRACT**

A bacterial strain with morphological and biochemical properties close to *Acetobacter xylinum* has been cultured in nonagitated, inverted sucrose- and yeast water-based medium for the production of thick, smooth, and floating cellulosic pellicles. The cellulose content (>90%, dry weight, depending on the efficiency of water washing) and the  $\beta$ -D-homopolyglucan nature of these pellicles were assessed by physical, chemical, and enzymatic methods. The apyrogenic bacterial biomass, a minor component of the dried biofilm (BioFill<sup>®</sup>), is inactivated by ethylene dioxide. Once applied on exuding or bloody tissues, this biofilm displays several advantages as a biological dressing, and hence, it is valuable as a temporary skin substitute in the treatment of skin wounds, such as burns, ulcers, grafts, and as an adjuvant in dermal abrasions.

**Index Entries:** *Acetobacter; cellulose pellicles; skin substitute; biological dressing.*

### **INTRODUCTION**

Cellulose biosynthesis in some acetobacteria has been known for more than 100 years (1,2). Cellulose membrane formation by *Acetobacter xylinum*, and its flotation, correlate with the carbon dioxide evolution

\*Author to whom all correspondence and reprint requests should be addressed.

from the fermented free sugars. The whole process is favored by an appropriate oxygen supply to the nonagitated cultures, as opposed to shaken cultures that restrict cellulogenesis (3). The synthesis of a true cellulosic film by *A. xylinum* (*A. aceti* ssp. *xylinum*) (4), an unique anabolism amid bacteria, involves the extrusion of nascent  $\beta$ -D-glucan chains and/or partially crystallized microfibrils through a pore row disposed at the level of the bacterial cell membrane (5,6). This biosynthetic model for the cellulose ribbon exportation and the regulation of the key enzyme, cellulose synthetase, by a cyclic guanyl-dinucleotide coupled to a specific phosphodiesterase has been established recently (7,8).

Bacterial cellulose is different from algal or plant homologous  $\beta$ -D-glucans (9), because the latter compose part of the cell-wall architecture (10). The natural plolysaccharide synthesized by *A. xylinum* displays characteristics of type I cellulose: parallel chains and offset plans (11). In vitro synthesis of cellulose can be also carried out with detergent-solubilized cellulose synthase, resulting in small fibrils of 17 Å in diameter (7). Some strains of *A. xylinum* also synthesize a xanthan gum-like exopolysaccharide (12), now designated as "acetan." Comparative studies on the balance of cellulose/acetan synthesis in selected strains of *A. xylinum* and naturally-derived mutants are in progress (13).

Artificial skin development is an important medical advance (14,15). We report a partial characterization of a cellulosic biofilm, produced by a wild type bacterial strain, with morphological, physiological, and biochemical properties of an *Acetobacter* sp., as well some of the current medical uses in the therapy of skin wounds.

## MATERIALS AND METHODS

The strain being used is a wild type microorganism isolated from a decomposing homemade *Matricaria* sp. infusion by L. F. Farah (16). The similarity of the resulting pellicle with human skin inspired its medical application as a temporary skin substitute (17). Cultures of the strain are maintained at 28°C in solid or unshaken liquid media containing 5% glucose, 1% yeast extract, and 3% calcium carbonate (GYC medium) (18); stocks are transferred biweekly. Enriched cultures, when needed, were produced substituting 4% ethanol for glucose as the sole C source (19). The water soluble fraction of infusions, prepared from *Ilex*, *Paulinia*, *Camelia*, and *Coffea* spp. and malt extract, can also support *Acetobacter* growth instead of yeast water or extract. Scaled up cultures for the cellulose membrane preparation (2) (36–60 h at 28°C) were carried out in 5% sucrose that was partially inverted by baker yeast or mild H<sup>+</sup> hydrolysis during routine steam sterilization. Medium supplementation was provided by the yeast-water, generated in the previous step, after a brief boiling procedure.

Monitoring of total and reducing sugars and acetic acid was performed by the phenol-sulfuric method (20), alkaline copper method (21) and gas chromatography on a Porapak Q column, respectively. Optical micrographs were taken with an AFX-II device in a Nikon-Labophot microscope and electron micrographs with a Phillips-SEM 505 scanning electron microscope. Infrared spectra of acetone and vacuum-dried bacterial film, as well from its O-acetylated derivative, were recorded with a Perkin Elmer-Aculab M IR spectrometer. The X-ray diffraction diagrams were obtained with a Flat Laue camera using transmission geometry and Ni filtered Cu (K $\alpha$ ) radiation. The samples were placed in a specimen holder with mylar windows, where they could be kept wet during the exposure. Dry samples were mounted on a fiber specimen holder. Exposure time was generally 4 h, and the specimen to film distance was 42 mm. Enzymatic hydrolysis was performed using Celluclast® (Novo Industri A/S, Copenhagen, Denmark) or snail gastric juice hydrolases, following the general guidelines of a previous work (22). Trifluoroacetic acid (TFA) hydrolysis was carried out, as described by Albersheim (23), except that cellulosic films were preswollen in the concentrated acid (1:1, v/v) for 2 h at 95°C. Samples for thin layer chromatography (TLC) were run in Silica Gel 60 chromatoplates (Merck E. Merckag, Darmstadt, W. Germany) and gas liquid chromatography (GLC) using alditol acetate (OV-225 column) or per-silyl derivatives (SE-30) of mono- and disaccharide standards and samples (22). Assessment of aseptically water- or saline-rewet biofilms in skin treatments were conducted under the supervision of a dermatologist (J. A. Bichara) in patients suffering of skin wounds resulting from burns, ulcers, or facial dermabrasion. Parallel medical research data in outpatients, infirmaries, clinics, and hospitals were also compiled.

## RESULTS AND DISCUSSION

The *Acetobacter* strain currently used is a Gram-negative rod- to ellipsoidally-shaped bacterium (Fig. 1), with a cell type and assembling pattern (individualized cells, pairs, and chains) resembling the characteristics and variability described for the *Acetobacter* genus and some *aceti* species (18). It also presents other attributes ascribed to the *aceti* sp. and *xylinum* ssp., such as reduction or loss of cellulose-synthesizing ability (24) and cell pleomorphism or staining variability owing to cell aging or culture media composition. The consortium with baker's yeast does not disturb the bacterial cell growth or the extracellular cellulosic pellicle formation, probably owing to the bacterium's ability to oxidize yeast-generated ethanol. In view of the buildup of acetic acid, a pH drop to 2.1 results in yeast growth inhibition and overoxidation of the acid to CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O.

The supplement influence on the volumetric bioconversion of free sugars was measured as mL of wet cellulosic mantle/L of culture media:

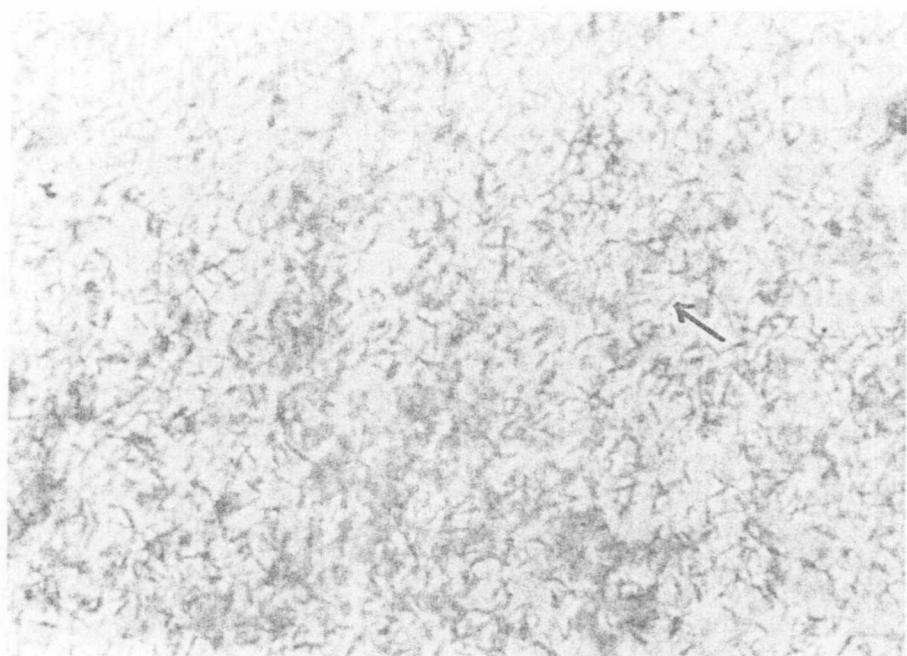


Fig. 1. Optical microscopy picture of a Coomassie R stained fresh biofilm from the *Acetobacter* wild type strain (2800 $\times$  final magnification).

160 for yeast extract, 101 for *Ilex* extract, and 185 for a combination of both. Regarding the search of less expensive supplements, and in view of their heterogeneous composition, it is difficult to ascribe the benefit to a particular class of compounds or nutrients. Work is in progress to complete and report the fractionation of this and similar plant extracts in order to determine the value of inorganic salts, nitrogen-containing compounds, polymeric constituents, and trace elements.

The synthesized cellulosic network, which traps part of the bacterial cells even after thorough washing with water, is easily stained with dyes, such as Ponceau S (protein) and safranin (the counterstain for Gram negative microorganisms), or Congo Red. The biofilms become heavily fluorescent (UV light at 354 nm) after contact with CalcoFluor White ST, a probe reported to be selective for some  $\beta$ -D-glucans (25). Figure 1 shows a whole biofilm stained with Coomassie Brilliant Blue: the bacterial biomass is more intensely dyed owing to its protein content (one isolated cell is marked with an arrow). This staining profile is less visible on detergent (1% SDS) or 1M NaOH washed biofilms. If the native biofilm is washed with stronger alkali, i.e., 17.5 g%, as recommended for fractionation of  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -cellulose (26), it experiences a dramatic shrinkage (approximately a 60% size reduction), whereas detergent washing results in cleaner and more transparent membranes, without shrinking.

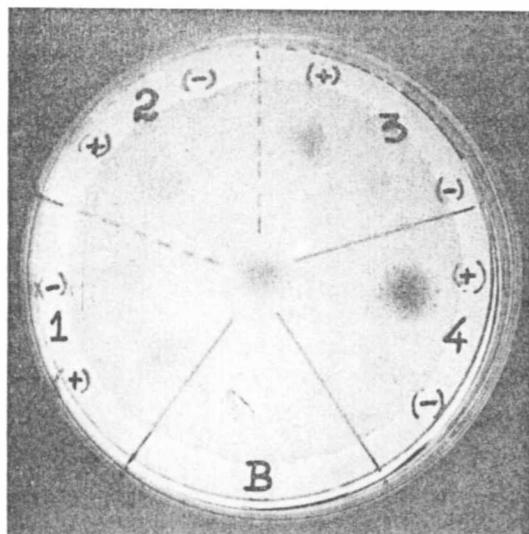


Fig. 2. Chromogenic plate test for the cellulosic nature of the *Acetobacter* biofilm: 1, 2, and 3 = different preparations of threefold diluted snail gut enzymes (native, sat. ammonium sulfate precipitate, and BioGel P-2 filtered, respectively); 4 = Celluclast; (-) = heat inactivated enzyme; and (+) = test with the active enzyme. B = zone of no enzyme application (D-glucose standard, 20  $\mu$ g was applied in the center of the plate; other details in the text).

Slightly buffered biofilms (citrate-phosphate 10 mM, pH 4.8) are quickly depolymerized by cellulolytic enzymes from *Trichoderma* (Celluclast<sup>®</sup>) or the gut of the snail *Megalobulimus paranaguensis* (22). The final step of the breakdown of cellulose into celldextrins, cellobiose, and then glucose may be easily seen if the digested biofilm is rebuffered at pH 7.0 (100 mM phosphate), containing a cocktail of glucose-oxidase plus peroxidase/aminoantipyrine (plate test in Fig. 2). Despite its lower cellulase concentration, treatment with the snail gut hydrolase complex also results in visible hydrolysis, owing to its higher cellobiase content. Furthermore, the almost pure cellulosic nature of the biofilm was suggested by the thin-layer chromatography of free sugars released by fungal cellulase action (Fig. 3, set A). Comparison of short- (lane S/A) with long-incubation times (lane L/A) indicates that the initial oligomeric spots are cellobiose + celldextrins since they are converted to glucose. The same profile is seen with the native membrane (just washed with water; lanes S and L/W), but the free sugar resolution here is hampered by the contamination of the hydrolysate with other cell components. Under the same incubation conditions for the detergent-washed film (lane L/D), direct glucose release is preferential, possibly owing to a better performance of the  $\beta$ -glucosidase component of the cellulolytic complex. Accordingly, glucose appears as the product after strong trifluoroacetic acid (TFA) hydrolysis of the water-washed native biofilm (lane T/W). It was noted that 95°C treatment with

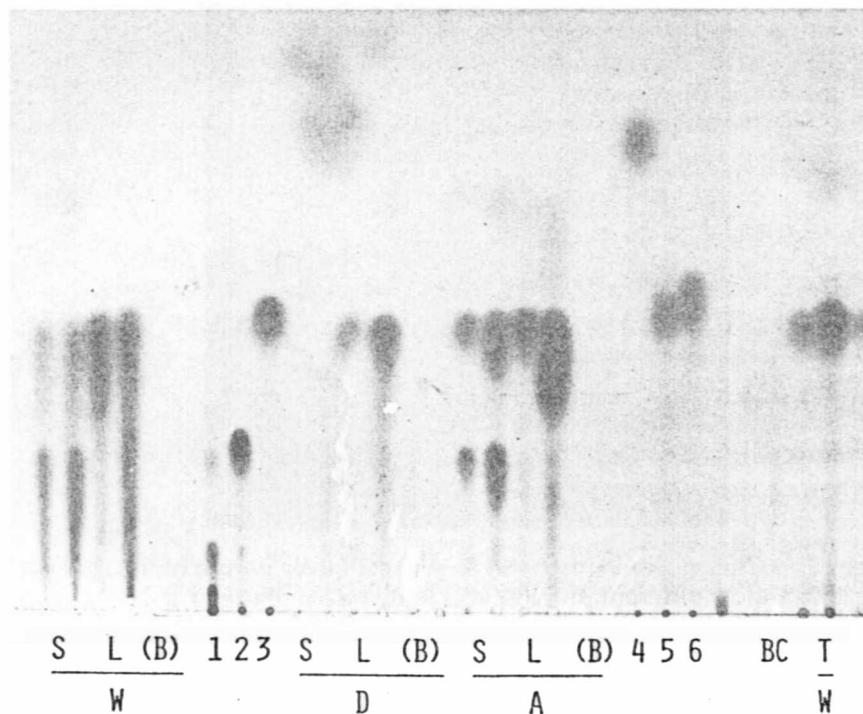


Fig. 3. Thin layer chromatography of sugars released from BioFill® after cellulolytic enzymes action (Celluclast®). W, D, A=water, detergent (1% SDS), and alkali (5M NaOH) washed biofilm substrates; S, L=Short (3 h) and Long (60 h) incubation times. (B)=enzyme "blank"; and T=Trifluoroacetic acid hydrolysis. Standards: 1=cellooligosaccharides; 2=cellobiose; 3=D-glucose; 4=L-rhamnose; 5=L-arabinose; and 6=D-mannose. Plate: Silica-Gel 60, Merck; Solvent=isopropanol: ethyl acetate:water (85:5:10). Spray: orcinol/methanol/sulfuric acid.

concentrated TFA (diluted 1:2, owing to the moisture in the sample), does not lead to a complete pellicle dissolution, even after 6 h incubation. The contribution of the bacterial biomass weight (dry basis) probably cannot explain the partial retention of the membrane integrity. Infrared spectroscopy recorded for native, alkali, or detergent-washed biofilms, and their O-acetylated derivatives, disclosed some, but not all of the bands of maximal absorption for cellulose (27). For example, band type 2b at  $891\text{ cm}^{-1}$  (resulting from deformational vibration of the axial ( $\text{C}^{(1)}-\text{H}$  bond) is noticeable. It is known that, in  $\beta$ -linked polyglucosans, the bands of types 1 and 3 (respectively for D-glucopyranosyl ring vibration and breathing) are reduced in intensity and sometimes absent altogether (28).

The search for trace or minor polymeric glycan components in the native biofilm was assessed in the alkali-solubilized fraction. For this, 20 g of a well-drained fresh pellicle (previously defatted by boiling in chloroform-methanol) was extensively extracted with 5M sodium hydroxide,

containing 20 mM NaBH<sub>4</sub>. The extract, filtered through a M porous glass membrane, was precipitated with 3 vol. absolute ethanol, producing 15 mg dry material. Free sugars, resulting from TFA hydrolysis, were converted to alditol-acetate derivates and analyzed by GLC. A monosaccharide profile glucose > arabinose > rhamnose > mannose is seen, and except for arabinose, the hexoses, and the deoxy-hexose are, incidentally, components of acetan, an acidic heteroglycan reported to be present in some wild-type and mutant strains of *Acetobacter xylinum* (13). Uronic acid acetan moiety, if also present in the hydrolysate, could not be detected as alditol acetate derivatives of mono- or oligosaccharide although in the "building blocking" process of biosynthesis, an acidic hepta-saccharide unit have been isolated (29). Glucose, as a major component, could be explained by the cellulosic "core" of acetan and less probably by some more easily hydrolyzable  $\gamma$ -cellulose contamination in the alkali extract. No explanation is available for the presence of arabinose since the only pentose reported for *Acetobacter* membrane is xylose (11), and only traces of the latter can be detected by GLC. It is worth mentioning that a differentiated cell wall structure was postulated for *Acetobacter* to explain the unusual cell resistance to lysis (30) and that this bacterium also perform the biosynthesis of  $\beta$ -1,2-branched glucan (31).

Scanning electron microscopy of osmium tetroxide-treated membranes are shown in Fig. 4. in frontal view for unused BioFill® (A) and the membrane after its spontaneous scaling from a skin wound treatment (B). In the latter, distinct layers of the cellulose pellicle are visible, bringing up some fragments of the epidermal crust. The ease in application of BioFill® as a therapeutical tool in skin wounds is exemplified in Fig. 5. Close adherence of the membrane to the wet wound bed follows, as is clearly visible in the central zone of the piece. The pellicle firmly sticks on glass surfaces as soon as the water excess is evaporated, and it does not allow liquid water crossing (Fig. 6), but does allow transfer of water vapor and gases, an important feature for current medical applications.

The growing cellulosic network displays a remarkable capability of water retention: 200 g of well-drained fresh *Acetobacter* biofilm (0.40 cm thickness) after drying results in only 1.35 g (average 0.05 mm thickness). Drying obviously causes dramatic changes in the porosity of the cellulose multilayer assembly, as well in the physical interaction between the polysaccharide individual chains. Microscopic inspection of a rehydrated film, pressed between two calibrated microscope covers, shows that the film experiences a very limited swelling not exceeding a doubling in thickness, compared with the eightfold reduction observed in the original dehydration step. The dried film displays almost no resistance to tear and moderately supports tension strength. The latter attribute increases dramatically in fresh rewetted cellulosic mantles.

Crystallinity and microfibril orientation is also affected by manipulation and physical/chemical treatments, as revealed by X-ray diffraction measurements (Fig. 7A-D). The exhaustively washed biofilm (A, kept

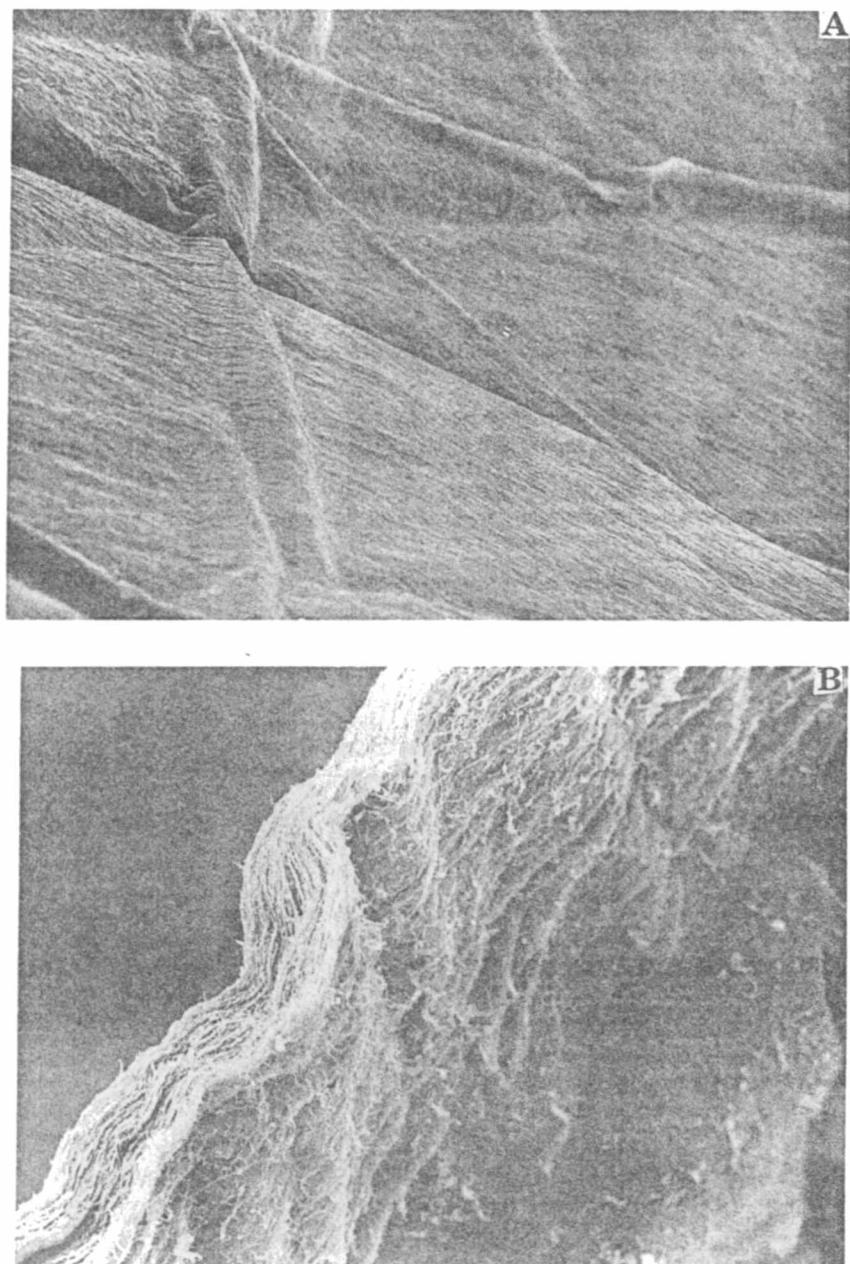


Fig. 4. Scanning electron micrograph of osmium tetroxide impregnated BioFill®. (A) Unusued biofilm (frontal view; 1200 $\times$  final magnification); (B) Used Biofill® + fragments of the epidermal crust (2000 $\times$  final magnification).

wet) discloses a diffuse halo in the X-ray diagram, a condition typical for amorphous cellulose. Upon a 10% stretching and drying, it acquires a preferential orientation for the crystallized regions (B), whereas the commercial product shows no preferencial orientation and some degree of crystallinity (C), this latter property increasing after alkali treatment and drying of the original wet pellicle (D, 10% stretched sample).

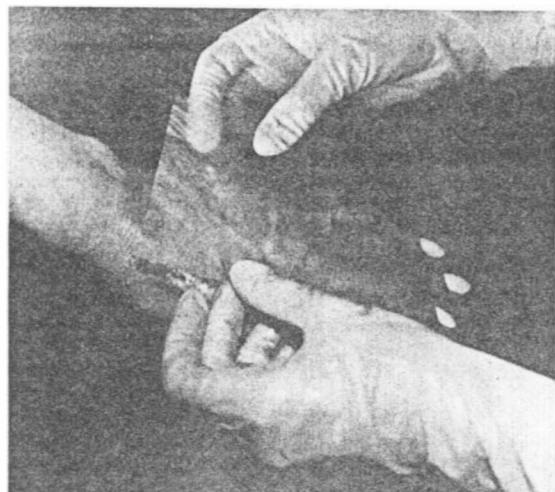


Fig. 5. Application of BioFill® to a human hand burn.

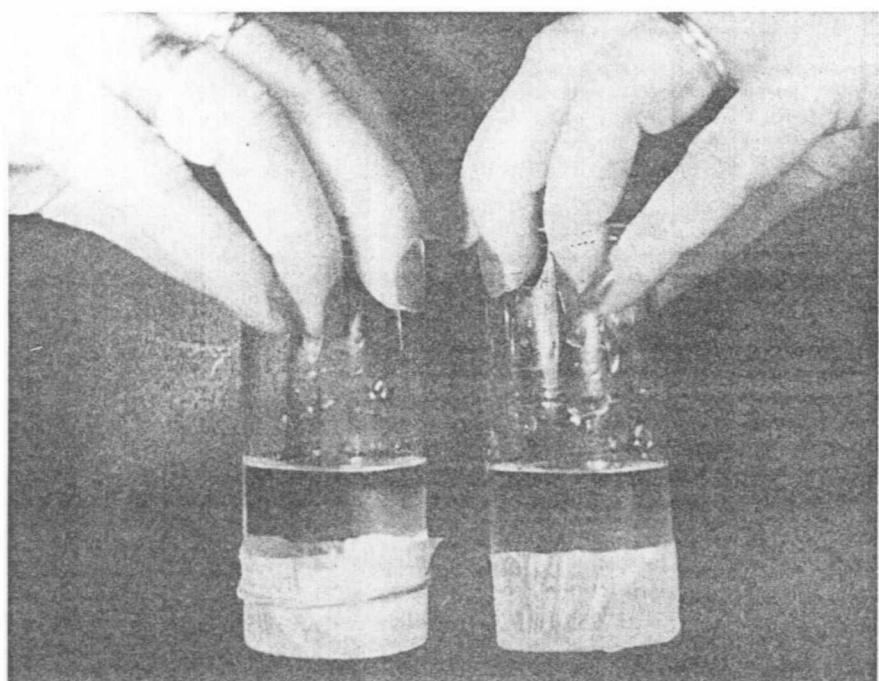


Fig. 6. BioFill® adherence and filtration properties (cylinder water column is 40 mL; for other details, see text).

BioFill® is experiencing an exponential use for several skin injury treatments, such as basal cell carcinoma/skin graft, severe body burns, facial peeling, sutures, dermabrasions, skin lesions and second degree burns, chronic ulcers, infectious epidermolysis, and both donor and receptor sites in skin grafts (32-37). These authors document the following advantages for BioFill® as a temporary skin substitute and biological dressing in

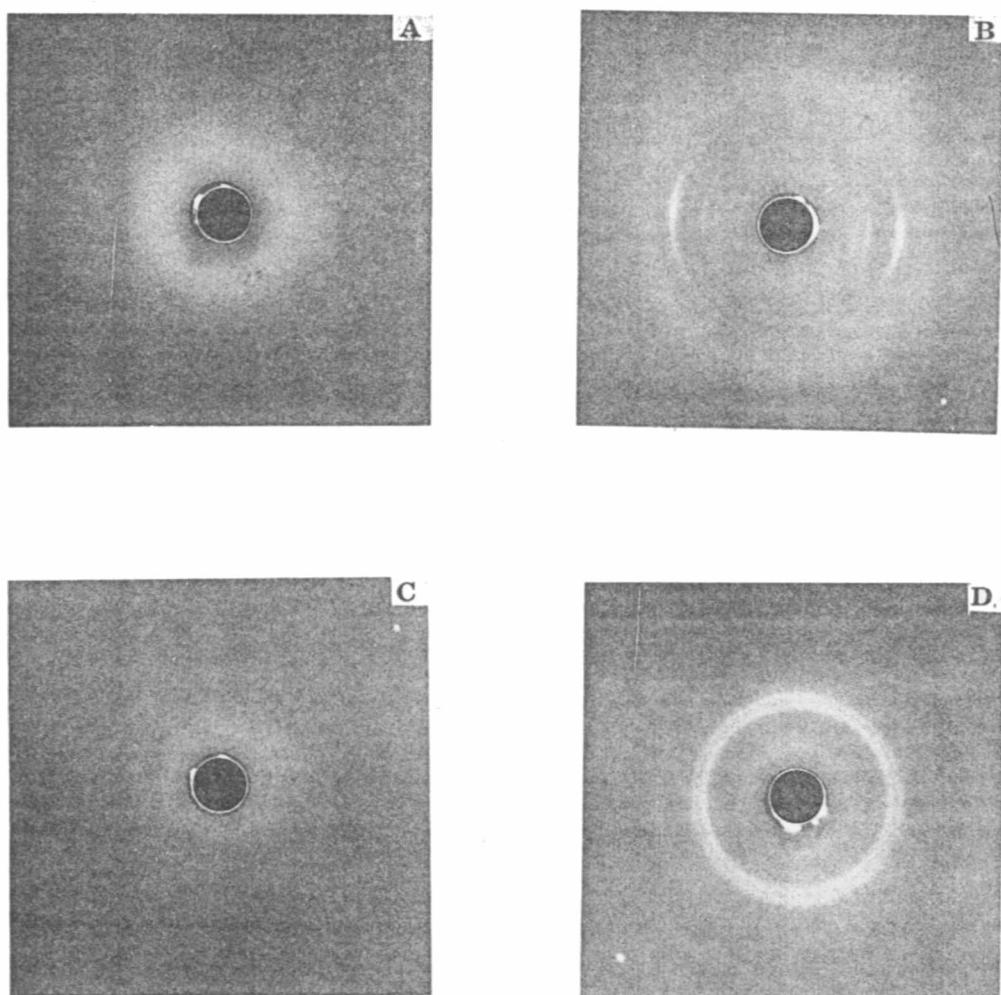


Fig. 7. X-ray diagrams of differently treated *Acetobacter* biofilms. (A) Exhaustively water washed biofilm (wet specimen). (B) Wet biofilm, 10% stretched (dried specimen). (C) BioFill® (commercial product; 8.5% moisture). (D) Wet biofilm previously treated with 17.5% alkali, 10% stretched (dried specimen). [A reference diagram was recorded for cotton cellulose (picture not shown)].

more than 300 treatments: immediate pain relief, close adhesion to the wound bed, diminished postsurgery discomfort, efficient barrier to pathogenic microbe installation/growth (reduced infection rates), easiness of the skin/wound inspection (transparency), faster healing, improved exudate retention (water, electrolytes, and proteins), spontaneous detachment following reepithelialization, and reduced treatment time and costs.

Part of the same authors have indicated just one flaw, limited elasticity when application of BioFill® is made in areas of great mobility (e.g., perioral region).

## CONCLUSIONS

Cellulose recovered from richer natural sources (e.g., lignocellulosics) requires drastic chemical treatments in order to ensure complete removal of lignin, hemicelluloses, and extractives. This results in a completely altered structure and, hence, the irreversible loss of advantageous native properties regarding the medical applications pursued in this work. Cotton cellulose is the natural source of highest purity, but its applications, though of marked usefulness, is limited to the well-established laboratorial and hospital routines. *Acetobacter* pellicle, a very intimate association of almost pure cellulose microfibrils and parts of the apyrogenic microbial biomass, owing to its peculiar physical, chemical, and biological properties, is an efficacious and improved tool for the treatment of several skin wounds. Further insights in the fine architecture of this kind of biofilm, the molecular nature of its minor constituents, and its biological effects are being undertaken to search for improvement of this very successful biotechnological advance and for possible alternative uses.

## ACKNOWLEDGMENTS

The financial support of a CNPq/PADCT-SBIO-88/FINEP grant is especially acknowledged, as well the technical assistance of R. Hoffmeister (CME-UFPR), A. C. Ramalho (Institute of Physics, UNICAMP-SP), I. N. Lyra, M. Farell (owners of scholarships from SEDICT/RHAE-CONCITEC-PR), and N. Albuquerque (carrier technician at the LQBB-Dept. of Biochemistry, UFPR).

## REFERENCES

1. Brown, A. J. (1886), *J. Chem. Soc. Trans.* 49, 432-439.
2. Tarr, H. L. A. and Hibbert, H. (1931), *Can. J. Res.* 4, 372-388.
3. Schramm, M. and Hestrin, H. (1954), *J. Gen. Microbiol.* 11, 123-129.
4. Savidge, R. A. and Colvin, J. R. (1985), *Can. J. Microbiol.* 31, 1019-1025.
5. Zaar, K. (1979), *J. Cell. Biol.* 80, 773-777.
6. Aloni, Y. and Benziman, M. (1982), *Cellulose and Other Natural Polymer Systems: Biogenesis, Structure, and Degradation*, Brown, R. M., Jr. ed., Plenum, New York, pp. 341-361.
7. Delmer, D. P. (1987), *Tappi J. November*, 141-143.
8. Ross, P., Weinhouse, H., Aloni, Y., Michaeli, D., Weinberg-Ohana, P., Mayer, R., Braun, S., de Vroom, E., van der Marel, G. A., van Boom, J. H., and Benziman, M. (1987), *Nature* 325, 279-281.
9. Aspinall, G. O. (1983), *The Polysaccharides*, vol. 2, Academic, Orlando, MI, USA, p. 13-17.
10. Preston, R. D. (1974), *The Physical Biology of Plant Cell Walls*, Chapman & Hall, London.

11. Ruben, G. C. and Bokelman, G. H. (1987), *Carbohydr. Res.* 160, 434-443.
12. Couso, R. O., Ielpi, L., and Dankert, M. (1987), *J. Gen. Microbiol.* 133, 2123-2135.
13. Iannino, N. I., Couso, R. O. and Dankert, M. (1988), *J. Gen. Microbiol.* 134, 1731-1736.
14. Tavis, M. J., Thornton, J., Doinet, R., and Barlett, R. M. (1978), *Surg. Clin. North Am.* 58, 1233-1249.
15. Peytavin, J. L. (1986), *BioFutur Juin*, 37-40.
16. Farah, L. F. X. (1986), *J. Acad. PR. Med. (JAMP)*, April/March.
17. US Patent Application no. 878.880, filed May 21, 1986.
18. Krieg, N. R. and Holt, J. G., eds. (1984), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. II, Williams and Wilkins, Baltimore, MD, pp. 267-278.
19. Brock, T. D. (1979), *The Biology of Microorganisms*, 3rd ed., Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ, p. 606.
20. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Ribers, P. A., and Smith, F. (1956), *Anal. Chem.* 28, 350-356.
21. Somogyi, M. (1945), *J. Biol. Chem.* 160, 61-68.
22. Fontana, J. D., Gebara, M., Blumel, M., Schneider, H., MacKenzie, R., and Johnson, K. G. (1988), *Meth. Enzymol.* 160, 560-571.
23. Albersheim, P., Nevins, D. J., English, P. D. and Karr, A. (1967), *Carbohydr. Res.* 5, 340-345.
24. Swissa, M., Aloni, Y., Weinhouse, H., and Benziman, M. (1980), *J. Bacteriol.* 143, 1142-1150.
25. Haigler, C., Brown, R. M., Jr. and Benziman, M., (1980), *Science* 210, 903-906.
26. TAPPI (1961), *Standard Method T 203*.
27. Baker, S. A. (1963), *Methods Carbohydr. Chem.* 3, 104-108.
28. Baker, S. A., Bourne, E. J. and Whiffen, D. H. (1956), *Methods Biochem. Anal.* 3, 238.
29. Sutherland, I. W. (1985), *Ann. Rev. Microbiol.* 39, 255.
30. Colvin, J. R. and Leppard, G. G. (1977), *Can. J. Microbiol.* 23, 701-709.
31. Colvin, J. R., Sowden, L. C., Daoust, V., and Perry, M. (1979), *Can. J. Biochem.* 57, 1284-1288.
32. de Paola, D. Q. and Souza, M. G. P. P. (1987), *Rev. Bras. Cirurg.* 77(3), 135-138.
33. Cabral, L. M., Gattaz, M. D., Factore, L. A. P., Mattar, J. A., Diament, D. and Oliveira, A. M. (1987), *ibid* 77(6), 1-7.
34. Rebello, C., Almeida, D. A., Lima, E. M., Jr., and Dornelas, M. P. (1987), *ibid* 77(6), 404-414.
35. Peixoto, R. and Santos, D. L. N. (1988), *ibid* 78(2), 141-145.
36. Pitanguy, I., Salgado, F., and Maracaja, T. F. (1988), *ibid* 78(5), 317-326.
37. Hilario, A. H. and Vasquez, L. A. M. (1988), *ibid* 78(6), 393-398.

## Nature of Plant Stimulators in the Production of *Acetobacter xylinum* ("Tea Fungus") Biofilm Used in Skin Therapy

JOSE D. FONTANA,<sup>\*1</sup> VALERIA C. FRANCO,<sup>1</sup>  
SILVIO J. DE SOUZA,<sup>2</sup> IVONE N. LYRA,<sup>1</sup>  
AND ANGELITA M. DE SOUZA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Biomass Chemo/Biotechnology Laboratory (LQBB),  
Department of Biochemistry, Federal University of Parana (UFPR),  
PO Box 19046 (81.504), Curitiba, PR, Brazil;  
and <sup>2</sup>BioFill Produtos Biotecnologicos S/A, Curitiba-PR, Brazil*

### ABSTRACT

Caffeine and related xanthines were identified as potent stimulators for the bacterial cellulose production in *A. xylinum*. These compounds are present in several plants whose infusions are useful as culture-medium supplements for this acetobacterium.

The proposed target for these native purine-like inhibitory substances is the novel diguanyl nucleotide phosphodiesterase(s) that participate(s) in the bacterial cellulogenic complex.

A better understanding of this feature of *A. xylinum* physiology may facilitate the preparation of bacterial cellulose pellicles, which are applied as a biotechnological tool in the treatment of skin burns and other dermal injuries.

**Index Entries:** *Acetobacter xylinum*; cellulosic pellicle; biological dressing; xanthine stimulation; "tea fungus"; caffeine.

### INTRODUCTION

Following the first report on *Acetobacter* (cellulose) pellicle formation in 1886 (1), more than one century elapsed before the discovery of the

\*Author to whom all correspondence and reprint requests should be addressed.

regulatory mechanism involved in the bacterial cellulose synthesis (2-7). The latter authors showed the participation of an unusual diguanyl cyclic nucleotide as a positive effector of the *A. xylinum* cellulose synthase activity. The whole enzymatic complex also includes a specific guanyl cyclase, activated by  $Mg^{2+}$ , and a pair of specific phosphodiesterases performing a two-step degradation of the cyclic activator. The first esterase has its action blocked by  $Ca^{2+}$  (7).

Among the natural sources, *A. xylinum* has been reported as participating in formation of the so-called "tea fungus" (8), a term that probably arises from the bacterium's unique ability to synthesize a floating cellulose network that resembles a surface mold on nonagitated liquid media. *A. xylinum* mantle is also referred to, in lay terms, as "algal jam" or "zooglea" on home-made preparations. A more proper designation might be "schizoglea". On the other hand, the bacterium supports temporary consortium with other microorganisms (e.g., common yeast [9]), since its marked acidogenic metabolism on ethanol and/or free sugars guarantees a dominance at the log/late-growth phases. Lysis of the other microorganism may help the uptake of additional nutrients. Thus, the expression "tea fungus" might also be rationalized in this way. Recently proposed alternative environmental roles for the *A. xylinum* mantle were protection against UV radiation and enhanced colonization of sugar substrates, when competing with other microorganisms (10). Nutritional requirements for acetobacteria have been reported in relation to C and N sources, but the *xylinum* species was not included among the seven species studied (11). Growth on ethanol or sucrose may be useful in differentiation of species of *Acetobacter*, namely, *aceti*, *liquefaciens*, *pasteurianus*, and *hansenii* (8). No growth was reported for the species *hansenii* on ethanol or for species *pasteurianus* on sucrose. Not all strains of a given species were able to grow in the disaccharide, as seen for *A. aceti*, which may include, according to some authors, *xylinum* as a subspecies (12). *A. xylinum* has been reclassified as *A. hansenii* (8,13). Thus, a previous inversion of sucrose by yeast or even the lysed yeast presence may favor the growth of any *Acetobacter* strain unable to grow on sucrose. Mixed cultures of *Acetobacter* and *Candida* were reported (14). A defined synthetic medium was designed for growth and cellulose production by *A. xylinum*, and, except for the already used C sources (glucose, citric acid) and salts, it included nicotinamide (13), a key building block of redox coenzymes. The advantage of this medium is its efficiency for selection of auxotrophic mutants, and, less important from a basic research standpoint, the only disadvantage is its reduced efficiency for cellulose synthesis, compared to undefined media (15). We have reported the preparation of cellulosic biofilm using a wild-type strain of *A. xylinum* (here designated strain BF) on an industrial scale and for medical uses—for example, as a temporary skin substitute in burns and other injuries (9). This cellulosic pellicle and its medical applications may be seen as a successful biotechnological enterprise, since the

last surveys (1987-1989), based solely in 10 Brazilian dermatologists' groups, have reported hundreds of favorable medical applications (9, 16-20). We predicted the beneficial role of certain plant extracts in cellulose synthesis by *A. xylinum* (9), when they were used as substitutes for such conventional and conutritional sources as yeast and malt extracts.

The present investigation is centered in the nature of compounds arising from such plants as *Camellia* (commercial tea), *Paulinia* ("guaraná"), *Coffea* (unroasted seeds), *Theobroma* (cacao), *Kola* or *Sterculia* (cola nut), and *Ilex* ("mate") and their possible role as positive effector(s) in cellulose synthesis by *A. xylinum*. These plants display, as a common feature, a high content of xanthine-based substances. Because of the reduced amount required as supplement to the C source, their infusions may be used as low-priced ingredients in medium formulation.

## MATERIALS AND METHODS

### Microorganisms

The most frequently used wild strain of *A. xylinum* was BF, and it was inoculated directly from fresh BioFill® biofilms (9). Strains JF, from a souring "guaraná" soft drink, and USDA 207, provided by R. Tanner, were kept in a CaCO<sub>3</sub>-enriched medium as stock cultures and were used to confirm the stimulatory effect of pure drugs. Other conditions were described in the previous report (9), heavy inocula being adopted to shorten culture time to <5 at 28°C without agitation in a BOD 347-CD Incubator (Tecnal, São Paulo, Brazil). Unfavorable conditions for the growth of yeast and other microorganisms were ensured by the natural production of acetic acid by *A. xylinum* and the inclusion of 0.1 mL% of Mycostatin® (Squibb Industria Química SA) and 0.5 mg/mL of Benomyl® (du Pont) in the media. Fruitfly access to the open fermentation vessels was avoided by covering them with napkins.

### Plant Active-Compounds Assessment

Fermentations were carried out in half-filled, 200-mL, open cylindrical vessels, C sources being either 5% glucose, sucrose, or yeast-inverted sugars supplemented with 0.5 mL% of ethanol. Growth and floating cellulosic mantle production proceeded without agitation of the cultures. Plant extracts (infusions) were prepared keeping each source (1.2 g of dry leaves or seeds) in contact with 1 L of freshly boiled distilled water for 30 min after filtration through a compact layer of glass wool. No particulate matter was visible in the resulting warm infusions, the solid dry weight of which accounted for <300 mg/L, most of the material being polysaccharide. Concerning culture-media formulation, the composition of these infusions (and yield, on a dry basis) ensured neither a significative rein-

forcement to the generous load of free sugars nor an excess of N and P sources. Part of the plant infusions, as known duplicative volumes and prior to inclusion in the fermentation media, was alternatively extracted with chloroform with or without pH adjustment in order to enhance or to reduce the xanthine content of the final aqueous solution to be used as media supplement. In order to avoid further dilution of the infusions, other media components were added as solids or from 10 concentrated solutions to 1.1× concentrated infusion. Yeast extract (0.005–0.01 g%) was included in the media in order to avoid too much reduced cellulosic membranes in the control experiments.  $^{14}\text{C}$ -(U)-Glucose pulse-chase was carried out when all cultures presented visible growing membranes (48–60 h), hampering the excessive turnover of radioactivity to components other than cellulose.

### Optical and Electronic Image Recording

Images from the cellulose network and bacterial biomass were recorded as described (9). In the case of optical microscopy, the material was previously dyed with a 10 mg/mL solution of Calcofluor white M2R in order to render cellulose fluorescent to UV light (21).

### Analytical Procedures

Paper chromatography for radiolabeled free sugars was carried out on Whatman 3MM filter paper with ethyl acetate/isopropanol/acetic acid/methanol/water (10/2/1/4/8, v/v) following pretreatment of "cold" or  $^{14}\text{C}$ -labeled membranes with boiling 5M KOH, buffering at pH 4.8, and their extensive fungal cellulolysis with Celluclast® (Novo Nordisk do Brasil, Araucaria-PR). Glucose, cellobiose, and traces of cellobiosaccharides were made visible with alkaline silver nitrate and their  $^{14}\text{C}$ -labeled fraction measured by liquid scintillometry in Bray's solution (22). GLC for xanthines, without previous derivatization, was performed in a Varian-Intralab 3300 gas chromatograph equipped with a capillary SE-30 column (J & W Scientific Inc.) and FID detector. This was confirmed by GLC-MS on a PONA dimethyl-silicone capillary column (Hewlett-Packard) in a trimodular 5890/5970/ChemiStation from the same supplier. Mass spectrometry was carried out using the electron-impact mode. Both columns were operated isothermally at 240°C, using N<sub>2</sub> and He as carrier gases, respectively. UV spectra of chloroform-soluble plant extracts, after pretreatment with dilute HCl and redissolution in methanol, were recorded in a Varian-Intralab DMS-80 spectrophotometer. Plant infusions, after being made alkaline, were extracted with chloroform, and the resulting residues, containing the xanthines, were acidified with HCl and resolubilized with methanol. These materials were submitted to a chromogenic plate test using an inexpensive modification of the murexide reaction (23): addition to equal parts of NaClO<sub>4</sub> (< 10% of active Cl<sub>2</sub>) and fuming HCl. Depending on the

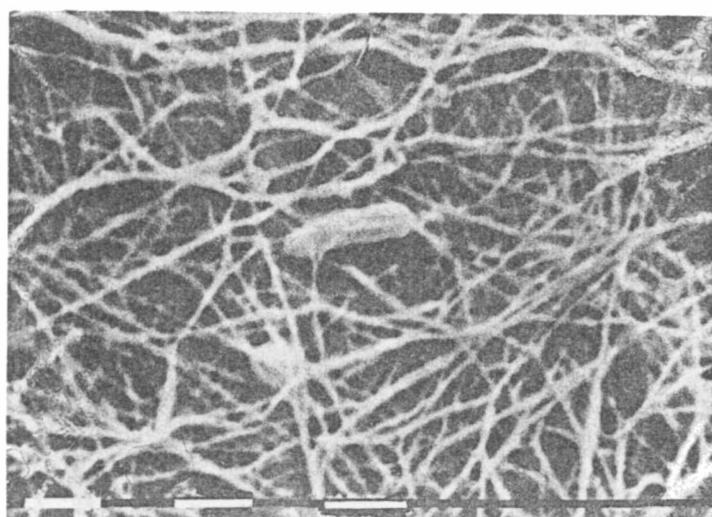


Fig. 1. Scanning electron micrograph (SEM) of an *A. xylinum* impregnated biofilm (strain "JF"); final magnification = 20,000.

amount of the material assayed, an orange-reddish color developed upon heating at 100°C.

## RESULTS AND DISCUSSION

Growth of all strains of *A. xylinum* led, after 72 h at 28°C, to the formation of a compact and floating pellicle, provided that the medium formulation was favorable for cellulose biosynthesis. Viewing the membrane network by TEM of large magnification (Fig. 1; 20,000 $\times$ ) allows one to observe cellulose microfibrils and some trapped bacterial cells, which remain even after extensive water washings and membrane squeezing. Native, detergent-, or alkali-treated membranes strongly took up CalcoFluor. The respective fluorescences under UV light (results not shown) were proportional to the cellulose-layer thickness and, hence, to the amount of synthesized cellulose in each membrane.

Comparative growth of *A. xylinum* in the free-sugar media, separately supplemented with reduced amounts of extracts from different families of plants (Sterculiaceae, Sapindaceae, Theaceae, Aquifoliaceae, Rubiaceae), resulted in a noticeable enhancement of the respective cellulosic membranes. The best stimulation, at room temperature, was obtained with tea infusions (*Camellia sinensis*) at longer cultivation (>7 d), and with "guaraná" (*Paulinia cupana*) at shorter times (<5 d). The effect can be more properly observed in the isolated and extensively washed pellicles (Fig. 2). The respective gravimetric data, after lyophilization, are shown

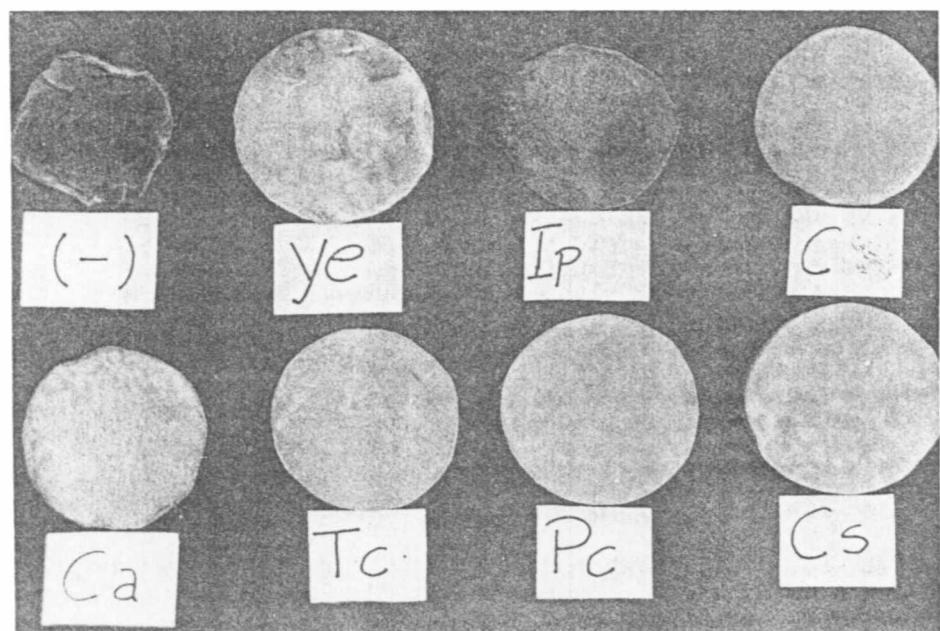


Fig. 2. Comparative aspect of processed *A. xylinum* membranes. The floating biofilms from the separate and nonagitated liquid cultures of strain "BF" (15 d at room temperature) were removed, thoroughly washed with water to remove loosely adhered cells and residual medium material, drained of excess water, and photographed. (-) control—basic medium without plant infusion addition. Supplementation as follows: ye = yeast extract (0.12g%); Ip = *Ilex paraguayensis* ("mate"); C = *Kola nitida* (cola nut); Ca = *Coffea arabica*; Tc = *Theobroma cacao*; Pc = *Paulinia cupana* ("guarana"); Cs = *Camellia sinensis*.

in Table 1 (experiment A). These plant infusions (that is, the solubilized part of 120 mg of whole material/100 mL of solvent) resulted in variable residual matter upon solvent evaporation. Analysis for carbohydrate, in the case of tea infusion, indicated <30 mg%. Most of this content was polysaccharide material, a noncompetitive C source for the 5-g% load of free sugars in culture media. Protein was barely detected in 10%-trichloroacetic-precipitated material free of interfering low-mol-wt phenolic compounds. Contribution of nitrogenous compounds other than protein (except for those mentioned further on) were not evaluated. On the other hand, all tested plants contained a variable amount of xanthine-related bases, as detected in the respective chloroform extracts (e.g., about 2 mg in each 100 mL of tea infusion). Since these kinds of substances display biological activity (e.g., inhibition of the enzyme performing "second-messenger" degradation in glycogen metabolism [24]), there was clear evidence of a regulatory role for them in *A. xylinum* cellulose synthesis, which is also mediated by cyclic nucleotides (6,7). In order to check this hypothesis by comparison with untreated tea infusion (a; control), three

Table 1  
Effect of Native and Partially Decaffeinated Plant Infusions  
in *A. xylinum* (strain "BF") Cellulosic Membrane Production

Additions or modifications to basic medium <sup>a</sup>	Wet (drained) weight, g% <sup>b</sup>	Dry (lyophilized) weight, mg% <sup>b</sup>
A <sup>c</sup>		
None	1.2	7.9
ye (yeast extract)	20.6	217.5
Cs (tea)	35.3	310.4
Pc (guarana)	32.7	295.5
Ca (coffee)	14.0	104.2
Tc (cacao)	11.6	78.5
Cn (cola nut)	8.6	71.9
Ip ("mate")	7.5	75.2
B <sup>d</sup>		
Untreated tea infusion	—	44.8
Native pH; CHCl <sub>3</sub> extracted	—	9.1
HCl (pH < 3); CHCl <sub>3</sub> extracted	—	23.7
NaOH (pH > 11); CHCl <sub>3</sub> extracted	—	4.5
C <sup>d</sup>		
Untreated tea infusion	3.3	30.7
CHCl extracted	0.7	10.6
CHCl <sub>3</sub> extracted; reconstituted	3.2	29.6

<sup>a</sup>Basic medium composition is as follows: 5 g% (inverted) sucrose in A and B; 5 g% glucose in C. Yeast-based supplementations: A=0.01 g% yeast extract; B and C=yeast water (replacing yeast extract on the same dry basis); 0.5 mL% ethanol in all experiments.

<sup>b</sup>Per 100 mL of liquid and nonagitated culture medium.

<sup>c</sup>Reduced inoculum; larger vessels (400 mL of medium); growth at room temperature for 15 d.

<sup>d</sup>Usual inoculum, vessel size, and incubator (see Materials and Methods section); crop of membranes at 84 h (experiment B) and 72 h (experiment C).

portions were pretreated by chloroform extraction as follows: (b) at the original pH, 5.6; (c) at an acidic pH (0.01M HCl); and (d) under basic (0.01M NaOH) conditions, the latter two then being neutralized. An equivalent amount of NaCl was added to samples (a) and (b). Gravimetric data for the resulting cellulosic pellicles using these modified tea infusions are shown in Table 1 (experiment B). It was clear that the pH increase, favoring the extraction of alkaloid-like compounds by chloroform, was also proportionally unfavorable for cellulose synthesis. On the contrary, low-pH chloroform extraction (pH < 3) left an infusion resulting in a membrane weight equivalent to half of that of the untreated infusion. Another experimental variation was to repeat the extraction with chloroform at the natural pH as duplicate runs (Table 1; experiment C). Reincorporation of residual matter into the growth medium after solvent evaporation resulted in complete recovery of cellulose synthesis. The use of control (untreated) and

pretreated infusions as culture-media supplements strongly indicated that most of the stimulatory compound(s) were extractable with chloroform under a neutral or basic condition. More-polar solvents (e.g., methanol) also removed the active compound(s) from infusion residues, but led to larger masses of extracted material, thus making it difficult to interpret the data. The residue from chloroform extract (under alkaline conditions), as well as the pure caffeine, gave positive reactions to the modified murexide test. UV spectra of the same samples displayed the same  $\lambda_{\text{max}}$  (about 270 nm). Confirmation of the structure for this positive regulator in cellulose biosynthesis by *A. xylinum* was followed by GLC on a SE-30 column ( $R_T$  for caffeine, theobromine, for theophylline standards equal to 12.7, 12.9, and 14.3 min): *Camellia* infusion furnished a single component with an  $R_T$  = 12.2 min. A similar result was obtained for *Paulinia* (with a larger peak area for the same  $R_T$ ); *Coffea* and *Theobroma* presented, besides the major fast peak, other minor components, two of them coincident with the theobromine and theophylline standards. Definite identification of the major purine was achieved by GLC-MS: its trimethylxanthine nature was corroborated by an  $R_T$  coincident with that of the caffeine standard (12.7 min) and an e.i. fragmentation pattern almost identical to the literature report (25): 194 > 109 > 67 > 55 > 82. Despite the net and dominant procellulogenic effect of caffeine (trimethylxanthine) in all plant infusions used herein, the minor analogous dimethylxanthines (theophylline and theobromine) may be having an ancillary positive effect, at least in the cases of "guarana" and cacao, as seen in their multipeak chromatographic profiles (results not shown). Incidentally, a more efficient stimulation was observed for *P. cupana*, using shorter culture times. This is in accordance with its higher content in caffeine (4.49 g%) along with five other xanthines and a small amount of free guanine (26), the pyrimidine base involved in building up the cellulose synthase cyclic nucleotide activator (7). Remaining to be explored is the greater yield of cellulose membrane with longer culture time using *Camellia* infusion, despite its somewhat lower content of caffeine. Other minor and polar components of these plant infusions must play a synergistical role to xanthines. Calcium and magnesium content in the ranges of 30–68 and 90–270  $\mu\text{g}$ % were found in the presently used plant infusions. Phosphate was also an important component in culture media, and this agrees with a previous report for a minimal defined medium (13). In fact, we confirmed the positive contributions of these three substances to cellulose pellicle formation either as isolated or as combined additions, and keeping 0.12 g% yeast extract as a supplement (the latter fully soluble, as compared to tea in the same dry basis).

Our findings for xanthine activation of the cellulosic complex from *A. xylinum* were finally confirmed by experimentation with pure xanthine drugs. Their positive effects, separately or in combination, are reported in Table 2. Radiolabeling (brief pulse-chase) with  $^{14}\text{C}$ -glucose indicated that cellulose was the single significant glycan being synthesized under

Table 2  
Effect of Pure Xanthine Drugs in *A. xylinum*<sup>a</sup> Cellulosic Membrane Production

Addition to the basic medium <sup>b</sup>	mg% <sup>b</sup>	Wet (drained) weight g% <sup>c</sup>	Dry (lyophilized) weight, mg% <sup>c</sup>
None	—	2.0	30.0
Caffeine	0.6	8.1	151.3
	0.3	6.6	106.4
	0.15	5.1	90.7
	0.075	4.1	68.6
Theophylline	0.6	5.3	117.3
	0.3	4.3	97.8
	0.15	3.8	60.2
	0.075	3.5	58.0
Caffeine + theophylline	0.15+0.15	4.8	118.9

<sup>a</sup>Table data recorded from strain "BF"; effects confirmed in other strains.

<sup>b</sup>BM=5 g% (inverted) sucrose; 5 mg% yeast extract; 0.5 mL% ethanol.

<sup>c</sup>Per 100 mL of liquid and nonagitated culture medium.

xanthine stimulation. Use of a potent cellulase (Celluclast<sup>®</sup>) on alkali-pre-treated membranes led to recovery of almost all incorporated radioactivity as glucose and cellobiose (ratio of percentages of radioactivity=60-70/40-30, taking average data for the three different strains used).

Caffeine has been described as a noncompetitive inhibitor of dog-heart phosphodiesterase (27). A similar action was ascribed to theophylline and other methylxanthines (28). The net effect of these drugs was, thus, the enlargement of the physiological half-life of "secondary messenger(s)." Our results pointed strongly to this situation in *A. xylinum*, the methylxanthines most probably blocking the action of the specific diguanyl cyclic phosphodiesterase(s) and then avoiding or postponing the normal "switch off" of the active cellulose synthase. Work is in progress on this subject and to evaluate the contribution of other low-mol-wt components from plant infusions for an actively anabolizing bacterial biomass, despite their reduced concentrations in the 0.12%-based infusions.

## CONCLUSIONS

The historical statement of "tea fungus" adopted for *A. xylinum* was satisfactorily clarified. Activators for the bacterial cellulogenic complex and arising from *Camellia sinensis*, as well as from other, different plants, were identified as caffeine and related compounds (theophylline, theobromine). The suggested target(s) for these methylated xanthines were the unusual diguanyl cyclic phosphodiesterase(s) whose inhibition favors the cellulose biosynthesis. The modern medical biotechnology has accepted

artificial skins as a valid prospect (29). Several properties advantageous for its use as a temporary skin substitute were recognized for BioFill®, a competitive product based on a *A. xylinum* cellulosic biofilm (9). Its successful application by dermatologists and plastic surgeons in more than 400 cases (9,16-20) included human second- and third-degree skin burns, skin grafts, face peeling, infectious dermolysis, tattoo abrasions, trophic venous and chronic ulcers, and Hansenian legs. Histological and histometric studies in the repairing process of rat skin were also conducted with and without application of Biofill®. Enhanced proportions of fibroblasts, collagen, blood vessels, and granulation tissue were seen in the healing wound as a result of the cellulosic pellicle use, and the reepithelialization reached completion after 21 d (30). Our interest remains focused on the acquisition of a better understanding of *A. xylinum* phisiology and in its optimized growth/cellulose production.

## ACKNOWLEDGMENTS

The support from CNPq, PADCT/FINEP-CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), PADCT (Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico)/FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos) is acknowledged. The coauthors are doctorate, master, and trainee students in LQBB/Dept. Biochem./UFPR, receiving scholarships from RHAE/CNPq. We are grateful to R. Hoffmeister (CME, Centro de Microscopia Electronica) for obtaining the scanning electron micrograph.

## REFERENCES

1. Brown, A. J. (1886), *J. Chem. Soc. Trans.* **49**, 432-439.
2. Delmer, D. P. (1983), *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **41**, 105-153.
3. Lin, F. C., Brown, R. M. Jr., Cooper, J. B., and Delmer, D. P. (1985), *Science* **230**, 822-825.
4. Ross, P., Aloni, Y., Weinhouse, H., Michael, D., Weinberger-Ohana, P., Mayer, R., and Benziman, M. (1986), *Carbohydr. Res.* **149**, 101-117.
5. Thelen, M. P. and Delmer, D. P. (1986), *Plant Physiol.* **81**, 913-918.
6. Delmer, D. P. (1987), The biochemistry of cellulose biosynthesis. *Tappi J. Nov.*, 141-143.
7. Ross, P., Weinhouse, H., Aloni, Y., Michaeli, D., Weinberger-Ohana, P., Mayer, R., Braun, S., de Vroom, E., van der Marel, G. A., van Boom, J. H., and Benziman, M. (1987), *Nature* **325**, 279-281.
8. de Ley, J., Swings, J., and Gosselé, F. (1984), Family VI. Acetobacteraceae, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. II, Krieg, N. and Holt, J. G., eds., Williams & Wilkins, Baltimore, MD, pp. 268-274.

9. Fontana, J. D., de Souza, A. M., Fontana, C. K., Torriani, I. L., Moreschi, J. C., Gallotti, B. J., de Souza, S. J., Narciso, G. P., Bichara, J. A., and Farah, L. F. (1990), *Appl. Biochem. Biotechnol.* **24/25**, 253-264.
10. Williams, W. C. and Cannon, R. E. (1989), *Appl. Environ. Microbiol.* **55**(10), 2448-2452.
11. Rainbow, C. and Mitson, G. W. (1953), *J. Gen. Microbiol.* **9**, 371-375.
12. Savidge, R. A. and Colvin, J. R. (1985), *Can. J. Microbiol.* **31**, 1019-1025.
13. Forng, E. R., Anderson, S. M., and Cannon, R. E. (1989), *Appl. Environ. Microbiol.* **55**(5), 1317-1319.
14. Abadie, S. (1961), *Ann. Sci. Nat. Botan. Biol. Vegetale* **2**, 765-780.
15. Hestrin, S. and Schramm, M. (1954), *Biochem. J.* **58**, 345-352.
16. Pitanguy, I., Brentano, J. M. S., Bos, H., Salgado, F., and Mazzarone, F. (1988), *Rev. Bras. Cir.* **78**(1), 67-78.
17. Castro, O. C., Ribeiro Filho, A. S., Nogueira, V. M. (1988), *HFA-Publ. Tec. Cient.* (Brasilia) **3**(3), 209-232.
18. Pires, M. C., Reis, V. M. S., Gatti, T. R., Pegas, J. R. P., Guerra, J. M. M., and Sarpieri, A. (1989). VI World Congress of Dermatology, Rio de Janeiro. *Rev. Bras. Dermatol.* (in press).
19. Gattaz Sobrinho, A. (1989), *Rev. Bras. Cir.* **79**(1), 45-51.
20. Mayall, R. C., Mayall, A. C. D. G., and Rocha, H. C. (1989), XIX World Congress of the International Society for Cardiovascular Surgery, Toronto. *Rev. Bras. Angiol.* (in press).
21. Haigler, C. H., Brown, R. M. Jr., and Benziman, M. (1980), *Science* **210**, 903-906.
22. Bray, G. A. (1960), *Anal. Biochem.* **1**, 279-285.
23. Horwitz, W. (1975), *Official Methods of Analysis of the AOAC*, Washington, XII Ed., p. 678.
24. Lehninger, A. L. (1975), *Biochemistry*, 2nd Ed., Worth, New York.
25. Grasselli, J. G. (1973), *Atlas of Spectral Data and Physical Constants of Organic Compounds*, CRC, Cleveland, OH, p. B-393.
26. Michl, H. and Haberler, F. (1954), *Monatsh.* **85**(4), 779-795.
27. Nair, K. G. (1966), *Biochemistry* **5**(1), 150-157.
28. Corbascio, A. N. (1971), *Clin. Pharmac. Ther.* **12**, 559-561.
29. Peytavin, J. L. (1986), *Biofutur Juin*, 37-40.
30. Cabral, L. M. (1989), MSc Thesis, Escola Paulista de Medicina, São Paulo, Brasil.

# Exopolysaccharide and storage polymer production in *Enterobacter aerogenes* type 8 strains

Angelita M. de Souza and I.W. Sutherland

Institute of Cell and Molecular Biology, Edinburgh University, Edinburgh, UK

4672/08/93: accepted 16 October 1993

A.M. DE SOUZA AND I.W. SUTHERLAND. 1994. Many exopolysaccharide (EPS)-producing bacterial strains also synthesize storage polymers. The production of slime EPS and of the storage polymer glycogen was compared in batch cultures of EPS<sup>+</sup> and EPS<sup>-</sup> isogenic strains of *Enterobacter aerogenes* type 8. Conditions of nutrient imbalance with high C : N ratios favoured both EPS and storage polymer synthesis and resulted in little subsequent degradation of glycogen. In the EPS<sup>+</sup> strain, glycogen synthesis was consistently lower than in the EPS<sup>-</sup> strain, indicating that substrate was preferentially used for EPS production. Reduced levels of carbon substrate in the growth medium resulted in lower storage polymer synthesis and in the degradation of the glycogen formed in EPS-producing bacteria. Considerable differences in the synthesis and breakdown of intracellular carbohydrate were observed between bacteria grown in synthetic media with ammonium salts and the same bacteria grown in medium with casein hydrolysate as the nitrogen source. Growth in media depleted in magnesium was slower than in complete media but high yields of glycogen were obtained in both the EPS<sup>+</sup> and EPS<sup>-</sup> strains.

## INTRODUCTION

Under suitable nutrient conditions including nitrogen or sulphate limitation and glucose excess, enteric bacteria such as *Enterobacter aerogenes* synthesize large amounts of exopolysaccharide (EPS) and of glycogen. The production of each of these polymers in batch culture has been studied extensively. In general, culture of bacteria in the presence of excess carbon and energy source and a low concentration of a nutrient such as N, S or P, favours synthesis of both types of polymer (Sutherland 1990; Dawes 1991). Glycogen is thought to accumulate if an excess of energy exists over that needed for growth and other essential cell processes (Preiss and Romeo 1989). In *Escherichia coli* strains which did not produce EPS, growth rate and yield of glycogen were inversely related under nitrogen-limiting conditions of growth with excess glucose present as carbon substrate (Holme 1957). In *E. coli* glycogen accumulation usually occurs mainly after completion of the exponential phase of growth, whereas in some other prokaryotes, including *Rhodopseudomonas capsulata* and *Streptococcus sanguis*, glycogen is formed in exponentially-growing bacteria (Dawes 1991). There have also been studies on EPS synthesis using batch

cultures of the several strains of *Klebsiella aerogenes* which form both extracellular capsule and slime in addition to intracellular glycogen (e.g. Duguid and Wilkinson 1953). These studies indicated that both EPS and intracellular polysaccharide (glycogen) increased under favourable physiological conditions. Dicks and Tempest (1967) suggested that the extent of glycogen accumulation in *Kl. aerogenes* grown under phosphate or sulphate limitation might depend on the growth medium employed; glycogen synthesis in washed cells taken from continuous culture under K limitation depended on the relative concentration of extracellular K<sup>+</sup> and NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Studies on the non-enteric bacterial species *Xanthomonas campestris* show that similar growth conditions, of excess carbon substrate and limiting nitrogen or sulphur source, favour EPS (xanthan) production (Tait *et al.* 1986), but in these bacteria essentially no storage polymers are made. There are apparently no reports of studies on synthesis of EPS and storage polymers in other Gram-negative bacteria such as *Alcaligenes* sp. or *Azotobacter vinelandii*, which form both EPS and large amounts of the storage polymer poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid (PHB), but Zevenhuizen (1981) examined the effect of growth conditions on the production of polysaccharides, oligosaccharides, glycogen and PHB in fast-growing *Rhizobium* species which produce a complex mixture of extracellular polysaccharides and intracellular storage polymers.

Correspondence to: Professor I.W. Sutherland, Institute of Cell and Molecular Biology, Rutherford Building, University of Edinburgh, Mayfield Road, Edinburgh EH9 3JH, UK.

The efficient utilization of carbon substrate and conversion to extracellular polysaccharide is a feature of the commercial production of xanthan from batch cultures of *X. campestris* (Linton *et al.* 1991). However, it is not clear whether development of new polysaccharides from bacterial strains capable of synthesizing intracellular storage polymers can be as efficiently achieved. The aim of the present work was to study polysaccharide production in isogenic strains of *Ent. aerogenes* type 8 and to determine whether the carbon substrate was preferentially used for EPS or storage polymer synthesis, under different initial C : N ratios in batch cultures of the bacteria in synthetic and semi-synthetic culture media and whether glycogen breakdown after exhaustion of the external carbon source might support extended EPS production.

## MATERIALS AND METHODS

### Bacterial strains and methods of culture

The bacterial strains used for this study were *Ent. aerogenes* 87(S1), an EPS<sup>+</sup> slime-producing mutant of serotype 8 (a non-acylated EPS with a pentasaccharide repeat unit containing glucose, galactose and glucuronic acid (Jansson *et al.* 1988)), and O31, an EPS<sup>-</sup> mutant from the same strain. The slime-producing strain was chosen because of the relative ease of separation of bacterial cells from extracellular product compared with the original capsulate isolate. Bacteria were maintained on nutrient agar slopes and were routinely cultured in yeast extract medium in which phosphate buffering was used to reduce the fall in pH during growth (Sutherland and Wilkinson 1965). This latter medium contained (g 1<sup>-1</sup>): K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 7.0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3.0; MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.1; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.5. To study the effects of different physiological conditions, media were prepared from the same salts base with either ammonium sulphate or cascin hydrolysate (Difco casamino acids) as the nitrogen source. Glucose was sterilized separately and added aseptically to the sterile medium to a final concentration of 0.3, 0.5, 1.0 or 2.0% (w/v). The bacteria were grown in 500 ml volumes of medium in 2 l Erlenmeyer flasks shaken at 30°C on an orbital shaker at 250 rev min<sup>-1</sup>.

### Analytical methods

Immediately after sampling, the pH was determined and growth was measured spectrophotometrically at 600 nm against a medium blank. The culture samples (50 ml) were centrifuged at 50 000 g for 30 min and dry weights of the bacteria were determined from the washed and lyophilized deposits. Residual glucose in the growth medium was mea-

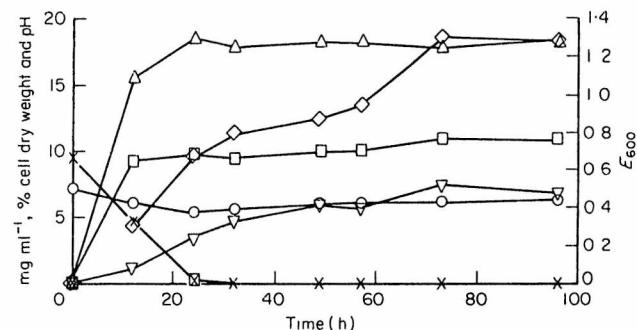
sured directly after removal of the bacteria by centrifugation, by the glucose oxidase technique, while a micromodification of the anthrone method (Trevelyan and Harrison 1952), applied to washed and lyophilized whole cells, gave a measure of intracellular glycogen. The relatively low anthrone response of known carbohydrate components of the lipopolysaccharides of *Ent. aerogenes* and of other cellular components validated this approach and the polyglucosidic nature of the intracellular material was confirmed by extraction with alkali, acid hydrolysis and glucose estimation. Further, turnover of anthrone-positive material, assumed to be glycogen, occurred under conditions where no cell lysis was detectable. Exopolysaccharide was measured following acetone precipitation of the polymer from the supernatant fluids obtained by high speed centrifugation (50 000 g for 30 min). The polymers were redissolved, dialysed thoroughly against tap water and distilled water, lyophilized and weighed. As a check, the carbohydrate content was determined by the phenol/sulphuric acid procedure (Dubois *et al.* 1956).

All analyses were normally performed in triplicate.

## RESULTS

### Growth in synthetic media

When media contained 0.05 g% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> together with 1% glucose as carbohydrate source, *Enterobacter* strain 87(S1) (EPS<sup>+</sup>) rapidly exhausted the sugar and accumulated both EPS and glycogen (Fig. 1). The corresponding EPS<sup>-</sup> strain showed a similar pattern of cell growth but glycogen accumulation was considerably higher (40% cell dry matter at 96 h as opposed to 19%). In *Enterobacter*



**Fig. 1** Growth and polysaccharide production of EPS<sup>+</sup> *Enterobacter aerogenes* strain 87 in batch culture in minimal medium supplemented with 0.05% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and 1% glucose. △, Growth measured at 600 nm; ○, pH; ×, residual glucose (mg ml<sup>-1</sup>); □, cell dry weight (mg ml<sup>-1</sup>); ▽, exopolysaccharide (mg ml<sup>-1</sup>); and ◇, intracellular glucose as measured by the anthrone test (% cell dry weight)

strain 87(S1), glucose was exhausted after 20 h, although both EPS and glycogen synthesis did continue for a further 10 and 40 h, respectively.

Under similar conditions where the carbon source consisted initially of 0.3% glucose, results were fairly similar but glucose was exhausted within 13 h. Considerably more glycogen was formed in the EPS<sup>-</sup> than the EPS<sup>+</sup> *Enterobacter* strain for all the culture conditions examined (Tables 1 and 2) and in both strains the glycogen content declined after glucose exhaustion. However, in the EPS<sup>+</sup> strain, glycogen breakdown commenced sooner and was initially more rapid, possibly because of the greater demands on precursors for EPS production. Results for experiments in which the glucose concentration was initially 0.5% were essentially intermediate between those observed at the higher and lower carbon substrate concentrations, respectively.

In synthetic medium with the same concentration of ammonium sulphate together with 2% glucose, the residual glucose level eventually fell to 0.4% but, perhaps because of the observed fall in pH and its effect on glucose uptake, a considerable decrease in glycogen content was observed after growth had ceased but before all the extracellular glucose had been utilized by the EPS<sup>-</sup> strain. The glyco-

gen content reached 12% of the cell dry weight at 24 h and fell only slightly on prolonged incubation of the EPS<sup>+</sup> bacteria. Table 1 shows the comparative yields for the two strains under the different substrate concentrations. When the content of ammonium sulphate in the medium was reduced to 0.025% (w/v) and 1% glucose was added, both strains again accumulated glycogen which was rapidly utilized between 40 and 60 h, during which time some cell lysis (as indicated by the fall in  $E_{600}$ ) also occurred. The synthesis of EPS in strain 87(S1) also continued during this period, although all extracellular glucose had been exhausted after 45 h. The relative amounts of glycogen produced by the two bacterial strains under these nutrient conditions are shown in Fig. 2.

#### The effect of complex nitrogen source

Most industrial media used for polysaccharide production contain complex nitrogen sources. It was thus of interest to determine the effect of using a complex nitrogen source such as casein hydrolysate rather than ammonium sulphate. Clearly some of the carbon in the amino acids as well as the carbohydrate substrate will be utilized for polysaccharide

**Table 1** Yields of cells and polysaccharides in *Enterobacter aerogenes* strains grown in synthetic media

Strain	Glc 2%/0.05% AS	Glc 1%/0.05% AS	Glc 0.5%/0.05% AS	Glc 0.3%/0.05% AS	Glc 1%/0.025% AS
<i>Enterobacter</i> strain 87					
cell dry weight (mg ml <sup>-1</sup> )	0.714	0.766	0.636	0.712	0.524
EPS (mg mg dry wt <sup>-1</sup> )	0.747	0.679	0.92	0.239	0.997
glycogen (% dry weight)	12.0	18.5	11.6	8.4	29.7
<i>Enterobacter</i> strain 31					
cell dry weight (mg ml <sup>-1</sup> )	0.866	1.136	0.686	0.774	0.436
glycogen (% dry weight)	18.5	39.9	17.3	23.3	42.4

Values given are the maximum values obtained under these growth conditions. All cultures were grown in 500 ml aliquots in 2 l Erlenmeyer shake flasks at 30°C and 250 rev min<sup>-1</sup>.

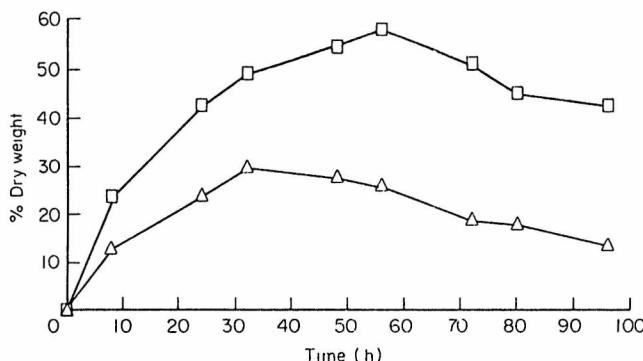
AS, Ammonium sulphate as nitrogen source; EPS, exopolysaccharide; Glc, glucose.

**Table 2** Yields of cells and polysaccharides in *Enterobacter aerogenes* strains grown in semisynthetic media

Strain	Glc 2%/0.1% CA	Glc 1%/0.1% CA	Glc 0.5%/0.1% CA	Glc 1%/0.05% CA
<i>Enterobacter</i> strain 87				
cell dry weight (mg ml <sup>-1</sup> )	0.669	0.633	0.598	0.363
EPS (mg mg dry wt <sup>-1</sup> )	1.194	1.636	1.194	3.195
glycogen (% dry weight)	28.9	36.8	21.8	27.4
<i>Enterobacter</i> strain 31				
cell dry weight (mg ml <sup>-1</sup> )	0.595	0.735	0.852	0.329
glycogen (% dry weight)	22.8	34.4	35.2	27.8

Values given are the maximum values obtained under these growth conditions and represent triplicate determinations of each estimation. All cultures were grown in 500 ml aliquots in 2 l Erlenmeyer shake flasks at 30°C and 250 rev min<sup>-1</sup>.

CA, Casein hydrolysate as nitrogen source; Glc, glucose; EPS, exopolysaccharide.



**Fig. 2** The production of glycogen as measured by the anthrone value of dry bacteria grown in minimal medium supplemented with 0.025%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  and 1% glucose. Results are shown for  $\Delta$ , EPS<sup>+</sup> *Enterobacter aerogenes* strain 87 and  $\square$ , EPS<sup>-</sup> strain O31

production. The bacteria grew very rapidly in the semisynthetic media with attendant rapid accumulation of glycogen and synthesis of EPS by strain 87(S1) (Fig. 3). These were the only conditions tested under which both bacterial strains produced the same amount of glycogen although, in the EPS<sup>-</sup> strain, glycogen did not reach a maximum until 80 h and did not decline sharply as seen in the EPS<sup>+</sup> strain. Marked differences were seen when the ratio of glucose to nitrogen source was changed (Table 2).

When the glucose content was increased to 2% in medium containing casein hydrolysate instead of ammonium sulphate, glucose utilization was incomplete. Exopolysaccharide and glycogen reached maxima at 36 h, after which the content of the intracellular polymer declined from 29 to 16%. The residual glucose level fell to about 5 mg ml<sup>-1</sup> in each strain after 36 h and did not decline further. Under these conditions, however, the pH fell sharply and growth apparently ceased for this reason. The

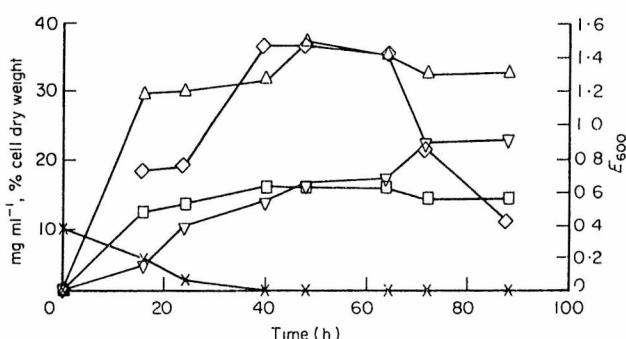
EPS<sup>-</sup> mutant again yielded more glycogen but the level declined to about 50% of the maximum in a manner similar to that seen in the EPS<sup>+</sup> strain. Increased buffering of the medium by doubling the phosphate concentration failed to cause any appreciable reduction in the fall in pH for strain 87 but caused reduced EPS synthesis to 0.15 g g<sup>-1</sup> dry cells after 72 h. Higher conversion of substrate to EPS and glycogen occurred when 1% glucose was incorporated into the medium, conditions under which the drop in pH value was much less.

### Magnesium depletion

As magnesium plays a vital role in many of the reactions leading to production of cells and of energy, and in several of the reactions yielding biosynthetic precursors of polysaccharides (Sutherland and Norval 1969), the effect of depletion of this essential ion was tested. Preliminary experiments showed that, for both the bacterial strains used, growth limitation was obtained when the concentration of  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  was reduced to 1/16 of that present in the salts base, i.e. to 0.00625 g l<sup>-1</sup>. Growth of the bacteria in the presence of 1% glucose and 0.05%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  was slower than that in magnesium-sufficient culture, but the eventual yields of cells were comparable with those obtained under most other growth conditions. The synthesis of glycogen was similar in both strains, reaching ca 31% of the cell dry weight after 115 h incubation at 30°C. Exopolysaccharide synthesis in strain 87(S1) reached 1.0 mg mg<sup>-1</sup> dry bacteria after the same time. In similar media in which casein hydrolysate was the nitrogen source, the EPS<sup>+</sup> strain produced less glycogen (20.8% dry weight) but more EPS (2.002 mg mg<sup>-1</sup>).

### DISCUSSION

Typically in batch fermentation of many EPS-producing bacteria, the cell growth is rapidly completed in 15–20 h, while EPS production may continue for a further 30–50 h (Sengha *et al.* 1989; Linton *et al.* 1991). Thus synthesis of the polysaccharide by many bacteria occurs during both the exponential and stationary phases of growth. During synthesis of the EPS succinoglycan in *Agrobacterium radiobacter*, substrate uptake is the main flux control point (Cornish *et al.* 1988a, b). A stable mutant from this bacterium could be partially derepressed under culture in glucose excess. This resulted in significantly higher EPS production. Similar controls may exist in other EPS-producing bacterial species. The situation, however, is more complicated in the enteric species *E. coli* or *Ent. aerogenes* in which considerable amounts of substrate are converted to both EPS and to the storage polymer glycogen and in *Alcaligenes* sp. which synthesizes EPS and PHB.



**Fig. 3** Growth and polysaccharide production of the EPS<sup>+</sup> *Enterobacter aerogenes* strain 87 in batch culture in minimal medium supplemented with 0.1% casein hydrolysate and 1% glucose.  $\Delta$ , Growth measured at 600 nm;  $\times$ , residual glucose (mg ml<sup>-1</sup>);  $\square$ , cell dry weight (mg ml<sup>-1</sup>);  $\nabla$ , exopolysaccharide (mg ml<sup>-1</sup>); and  $\diamond$ , intracellular glucose as measured by the anthrone test (% cell dry weight)

In our experiments using isogenic EPS<sup>+</sup> and EPS<sup>-</sup> strains of *Ent. aerogenes* type 8 with a range of different glucose concentrations and either ammonium salts or casein hydrolysate as nitrogen source, the level of storage polymer was consistently highest when EPS<sup>-</sup> mutants were used, suggesting that substrate is channelled to the production of EPS at the expense of storage polymer. This view is perhaps strengthened by the observation that at lower carbohydrate substrate levels, storage polymer is degraded after exhaustion of the carbon and energy source. Although there is no direct evidence that glycogen turnover into EPS occurs after the extracellular glucose substrate is exhausted, increased values for the extracellular polymer were certainly observed under some of the conditions which caused declining glycogen content. In a study of nitrogen-limited *E. coli*, Chen and Segal (1968) observed that following exhaustion of the nitrogen source, there was a rapid rise in glycogen content of the cells to 14% although almost 50% of the original glucose remained. During the stationary phase, simultaneous glucose uptake and glycogen degradation were observed. This is perhaps surprising in view of the finding by Romeo *et al.* (1988) that the genes for glycogen biosynthesis and degradation are located together in a cluster and that such organization might facilitate the regulation of these systems.

Under almost all the conditions tested in the present study, including media depleted in magnesium, the EPS<sup>+</sup> bacteria utilized the glucose substrate more rapidly than the corresponding EPS<sup>-</sup> strain. These results are in agreement with the observations of Linton (1990) for EPS-producing strains of *Ag. radiobacter* and *Erwinia herbicola*. Zevenhuizen (1981), in his study of *Rhizobium trifoli*, reported synthesis of EPS and glycogen when the bacteria were grown on 0.5% mannitol but prolongation of the incubation period did not lead to such a loss of glycogen as we have now found. Clearly, there is considerable conversion of substrate into storage polymer at the expense of EPS when micro-organisms capable of EPS and glycogen or PHB synthesis are contemplated for the commercial production of microbial EPS and it is fortunate that the major commercial bacterial polysaccharide currently produced, xanthan, is derived from bacteria which apparently lack significant quantities of any form of storage polymer. Linton (1990) has pointed out that EPS synthesis is a very efficient process and there is little scope for major improvement in the yield. However, if the microbial species producing an EPS also forms storage polymer this rapidly diverts substrate into an unwanted product. As the glycosyl donor used in the synthesis of glycogen in prokaryotes is ADP-glucose (Ribereau-Gayon *et al.* 1971; Preiss 1984), as opposed to UDP-glucose for exopolysaccharide production in the *Ent. aerogenes* strain (Sutherland and Norval 1970), substrate utilization for synthesis of EPS and storage

polymer is presumably controlled at the level of  $\alpha$ -D-glucose-1-phosphate before the glucose is converted to the sugar nucleotides.

Linton (1990) suggested that for *Ag. radiobacter*, in which glucose uptake involves periplasmic glucose-binding proteins, the cell appears to modulate the rate of EPS synthesis to match the rate of glucose access to the bacterium. If this is also true for *Ent. aerogenes*, and related enterobacterial species in which glucose enters the cell via the *pts* system, it will be of interest to know whether at certain stages of growth the rates of both EPS and glycogen synthesis are modulated to match glucose entry to the bacteria.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

A.M. de S. is on leave from the Department of Biochemistry, UFPr Curitiba, Brazil. The financial support of the Brazilian National Council for Science and Technology is gratefully acknowledged.

#### REFERENCES

- Chen, G.S. and Segal, I.H. (1968) *Escherichia coli* polyglucos phosphorylases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 127, 164-174.
- Cornish, A., Greenwood, J.A. and Jones, C.W. (1988a) Binding protein dependent glucose transport by *Agrobacterium radiobacter* grown in glucose-limited continuous culture. *Journal of General Microbiology* 134, 3099-3110.
- Cornish, A., Greenwood, J.A. and Jones, C.W. (1988b) The relationship between glucose transport and the production of succinoglycan exopolysaccharide by *Agrobacterium radiobacter*. *Journal of General Microbiology* 134, 3111-3122.
- Dawes, E.A. (1991) Storage polymers in prokaryotes. *Symposium of the Society for General Microbiology* 47, 81-122.
- Dicks, J.W. and Tempest, D.W. (1967) Potassium-ammonium antagonism in polysaccharide synthesis by *Aerobacter aerogenes* NCTC 418. *Biochimica et Biophysica Acta* 136, 176-179.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28, 350-356.
- Duguid, J.P. and Wilkinson, J.F. (1953) The influence of cultural conditions on polysaccharide production by *Aerobacter aerogenes*. *Journal of General Microbiology* 9, 174-189.
- Holme, T. (1957) Continuous culture studies on glycogen synthesis in *Escherichia coli* B. *Acta Chemica Scandinavica* 11, 763-775.
- Jansson, P.E., Lindberg, B., Widmalm, G., Dutton, G.G.S., Lim, A.V.S. and Sutherland, I.W. (1988) Structural studies of the capsular polysaccharides from *Klebsiella* types 8 and 82, a re-investigation. *Carbohydrate Research* 175, 103-109.
- Linton, J.D. (1990) The relationship between metabolite production and the growth efficiency of the producing organism. *FEMS Microbiology Review* 75, 1-18.

- Linton, J.D., Ash, S.G. and Huybrechts, L. (1991) Microbial polysaccharides. In *Biomaterials* ed. Byrom, D. pp. 215–261. London: Macmillan Publishers.
- Preiss, J. (1984) Bacterial glycogen synthesis and its regulation. *Annual Review of Microbiology* 38, 419–458.
- Preiss, J. and Romeo, T. (1989) Physiology, biochemistry and genetics of bacterial glycogen synthesis. *Advances in Microbial Physiology* 30, 183–238.
- Ribereau-Gayon, G., Sabraw, A., Lammel, C. and Preiss, J. (1971) Biosynthesis of bacterial glycogen IX: Regulatory properties of the adenosine diphosphate glucose pyrophosphorylases of the Enterobacteriaceae. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 142, 675–692.
- Romeo, T., Kumar, A. and Preiss, J. (1988) Analysis of the *Escherichia coli* gene cluster suggests that catabolic enzymes are encoded among the biosynthetic enzymes. *Gene* 70, 363–376.
- Sengha, S.S., Anderson, A.J., Hacking, A.J. and Dawes, E.A. (1989) The production of alginate by *Pseudomonas mendocina* in batch and continuous culture. *Journal of General Microbiology* 135, 795–804.
- Sutherland, I.W. (1990) *Biotechnology of Microbial Exopolysaccharides*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Sutherland, I.W. and Norval, M. (1969) The synthesis of exopolysaccharide by *Klebsiella aerogenes* membrane preparations and the involvement of lipid intermediates. *Biochemical Journal* 120, 567–576.
- Sutherland, I.W. and Wilkinson, J.F. (1965) Depolymerases for bacterial exopolysaccharides obtained from phage-infected bacteria. *Journal of General Microbiology* 39, 373–383.
- Tait, M.I., Sutherland, I.W. and Clarke-Sturman, A.J. (1986) Effect of growth conditions on the production, composition and viscosity of *Xanthomonas campestris* exopolysaccharide. *Journal of General Microbiology* 132, 1483–1492.
- Trevelyan, W.E. and Harrison, J.S. (1952) Studies on yeast metabolism. I. Fractionation and microdetermination of cell carbohydrates. *Biochemical Journal* 50, 298–303.
- Zevenhuizen, L.P.T.M. (1981) Cellular glycogen,  $\beta$ -1,2-glucan, poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid and extracellular polysaccharides in fast-growing species of *Rhizobium*. *Antonie van Leeuwenhoek* 47, 481–497.