

APROVEITAMENTO DO LÍQUIDO DO SISAL COMO SUBSTRATO PARA PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA

H. S. L. LIMA¹, E. NASCIMENTO¹, A. I. BRÍGIDA², F. K. ANDRADE³, M. F. BORGES³,
M. F. ROSA^{1,3}

¹ Universidade Federal do Ceará, Departamento de Engenharia Química

² Embrapa Agroindústria de Alimentos

³ Embrapa Agroindústria Tropical

E-mail para contato: helderlevi@gmail.com

RESUMO – No presente trabalho avaliou-se a produção de celulose bacteriana (CB) pela bactéria *Gluconacetobacter hansenii* CCT 1431 através de fermentação submersa estática utilizando o líquido do sisal como meio de cultivo alternativo. Efeito da concentração de substrato, pH do meio e suplementação na produção de CB foram investigados. Maior produção (3,38 g/L) foi obtida nas condições de 15 g/L de açúcar, pH 5 e 7,5 g/L de extrato de levedura.

1. INTRODUÇÃO

A celulose bacteriana (CB) é um polissacarídeo extracelular produzido principalmente por bactéria do gênero *Gluconacetobacter*. Quando obtida por processo fermentativo submerso estático, a CB se apresenta na forma de um filme com propriedades especiais que possibilitam a aplicação principalmente na área biomédica e desenvolvimento de materiais compósitos (Chawla *et al.*, 2009). Dentre as propriedades que tornam a CB superior à celulose vegetal tem-se: pureza, alto índice de cristalinidade, resistência mecânica, resistência à tração, biocompatibilidade e estabilidade química. Têm sido relatado em alguns estudos a utilização de co-produtos e resíduos da agroindústria na produção de CB (Kurosuni *et al.*, 2009). O emprego de fontes de carbono alternativas em processos fermentativos é de grande interesse, uma vez que possibilitam a redução de custos do produto final e permite o aproveitamento de resíduos ou produtos da agroindústria, agregando valor à cadeia produtiva e diminuindo o impacto ambiental causado por eles.

Dentre os resíduos da agroindústria brasileira pouco explorados, tem-se o líquido de sisal ou suco de sisal. O sisal é uma planta de origem mexicana que tem o seu plantio direcionado para a produção de fibra dura que têm o Brasil como principal produtor. O líquido do sisal é um resíduo oriundo do processo de obtenção da fibra que por sua vez representa apenas 4% do peso total das folhas processadas. Poucos trabalhos têm sido desenvolvidos no âmbito de agregar valor através do aproveitamento desse resíduo que atualmente tem sido abandonado nos campos de produção saturando o solo com matéria orgânica e contaminando aquíferos e rios (Andrade *et al.*, 2013). Nesse contexto, insere-se o objetivo do presente trabalho que consiste em avaliar a produção de celulose bacteriana utilizando o líquido do sisal como fonte alternativa de carbono.

2. METODOLOGIA

2.1. Caracterização do líquido de sisal

O líquido de sisal coletado pela Embrapa Algodão (Campina Grande, PB) foi armazenado à -18°C até a execução do trabalho. O mesmo foi caracterizado quanto sua composição de açúcares por HPLC, teor de nitrogênio total pelo método de Kjeldahl, pH e sólidos solúveis totais expressos em °brix (BRASIL, 2005).

2.2. Estudo da influência das condições de cultivo na produção de CB

Durante o processo de fermentação, avaliou-se o efeito da concentração inicial de açúcares (2,5 a 15 g/L), do pH inicial de fermentação (3 a 8) e da concentração de nitrogênio no meio (0,62 a 4,07 g/L) na produção de CB (g/L) e no rendimento do processo (%). A concentração de nitrogênio foi avaliada através da suplementação do meio com extrato de levedura e/ou sulfato de amônio através de um planejamento experimental 2^2 completo com ponto central e axial. A faixa estudada variou de 0 a 15 g/L para o extrato de levedura e de 0 a 10 g/L para o sulfato de amônio. A produção de CB (g/L) e o rendimento (%) foram definidos como variáveis resposta.

2.2. Inoculação

Após a ativação da linhagem *G. hansenii* CCT 1431 em caldo HS descrito em Hestrin e Schramm (1954), os meios estéreis foram adicionados de 3% (v/v) de inóculo. Após a inoculação procedeu-se a distribuição de 100 mL de meio em placa de petri de 14,5 cm de diâmetro. A fermentação submersa ocorreu sob condições estáticas a 30°C por cinco dias.

2.3. Purificação de CB e análise do meio fermentado

Após a fermentação, as películas de celulose formadas foram recolhidas e, os meios fermentados, filtrados e separados para análise de açúcares e pH. O teor de açúcares do meio fermentado foi determinado pelo método de DNS descrito em Miller (1959) após hidrólise ácida das amostras. As membranas de CB foram purificadas através de tratamento alcalino. Para tal as películas foram lavadas individualmente com água e submetidas a tratamento térmico a 100°C imersas em solução de NaOH 4% (m/v) por 1 hora e em seguida á 55°C por 1 hora em solução composta por H_2O_2 1% (v/v) e NaOH 4% (m/v). Depois, as películas foram lavadas em água destilada até a neutralização. A massa de celulose foi determinada através de secagem e pesagem da película a 170°C em balança de infra-vermelho.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O líquido de sisal apresentou 0,62 g/L de nitrogênio total; pH 4,48; 6,82 °brix; 12,39 g/L de glicose; 1,49 g/L de sacarose e 1,17 g/L de frutose. Uma vez que o líquido do sisal utilizado no presente estudo possui razoável teor de açúcar, sendo em maior parte constituído por glicose (82,4%), este é passível de ser um meio alternativo para processos fermentativos, em especial, para produção de CB.

Os resultados da avaliação do efeito da concentração de açúcares na produção de CB são apresentados na tabela 1. Observa-se que a linhagem *G. hansenii* CCT 1431 apresentou capacidade de sintetizar CB no intervalo estudado (2,5 a 15 g/L) com destaque para a concentração de 15 g/L de açúcares onde se obteve a maior produção (2,6 g/L). Apesar de ter-se observado um aumento gradativo na produção de celulose, o rendimento permaneceu constante. Não houve variação significativa no pH final do extrato fermentativo entre os experimentos, ficando em torno de 8,6.

Tabela 1 – Efeito da concentração de açúcar na produção de CB por *G. hansenii* CCT 1431 utilizando líquido de sisal como fonte alternativa de carbono.

Açúcares (g/L)	pH final	Celulose (g/L)	Rendimento (%)	Açúcar consumido (%)
2,50	8,58 ± 0,08 ^a	0,66 ± 0,04 ^a	29,54 ± 0,04 ^a	85,93 ± 4,28 ^a
5,00	8,80 ± 0,03 ^a	0,97 ± 0,03 ^a	25,48 ± 0,03 ^a	74,75 ± 3,87 ^{ac}
7,50	8,61 ± 0,28 ^a	1,42 ± 0,08 ^b	27,29 ± 0,08 ^a	67,42 ± 1,06 ^{bd}
10,00	8,68 ± 0,29 ^a	1,99 ± 0,13 ^c	26,76 ± 0,13 ^a	59,34 ± 1,09 ^b
15,00	8,35 ± 0,22 ^a	2,60 ± 0,19 ^d	25,45 ± 0,19 ^a	64,77 ± 4,14 ^{bc}

* Letras iguais (a, b, c, d) na mesma coluna não apresentam diferenças significativas ($\alpha=0,05$)

Os resultados do estudo do efeito do pH na produção de CB são apresentados na tabela 2. A maior produção de CB foi observada nas condições de pH 5 e 6 e o melhor rendimento em pH 5. Não houve formação de CB nas condições de pH 3 e 8. Tem sido reportado que, em valores de pH muito ácidos, há inibição de crescimento e produção de CB (Chawla *et al.*, 2009). Acredita-se que meios com pH mais elevados devem induzir a outra rota metabólica já que, embora não tenha produzido CB em pH 8, a bactéria consumiu mais de 90% do açúcar fornecido.

Tabela 2 – Efeito do pH inicial de fermentação na produção de CB *G. hansenii* CCT 1431 utilizando suco de sisal como fonte alternativa de carbono.

pH inicial	pH final	Celulose (g/L)	Rendimento (%)	Açúcar consumido (%)
3,00	2,78 ± 0,03 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a
4,00	4,95 ± 0,02 ^b	1,32 ± 0,23 ^b	10,54 ± 1,84 ^b	60,61 ± 4,38 ^b
5,00	7,20 ± 0,07 ^c	2,60 ± 0,11 ^c	23,29 ± 1,00 ^c	63,73 ± 5,17 ^{bc}
6,00	6,57 ± 0,05 ^d	2,62 ± 0,17 ^c	19,07 ± 1,25 ^d	84,22 ± 0,89 ^d
7,00	7,43 ± 0,12 ^e	1,92 ± 0,19 ^d	17,44 ± 1,74 ^d	71,59 ± 2,89 ^c
8,00	7,53 ± 0,13 ^e	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	92,66 ± 3,37 ^d

* Letras iguais (a, b, c, d) na mesma coluna não apresentam diferenças significativas ($\alpha=0,05$)

Os efeitos da concentração de nitrogênio, bem como da fonte de suplementação, na produção de CB são apresentados na tabela 3. A análise dos dados foi feita no intervalo de confiança de 95%. Para a variável resposta celulose (g/L) foi observado efeito significativo apenas para a concentração de sulfato de amônio, sendo observado um decréscimo na produção de CB com o aumento da mesma. Contudo, no intervalo de confiança de 90%, a concentração de extrato de levedura também é significativa, observando-se uma maior produção de CB com o aumento desta. Ao nível de 95%, nenhuma variável estudada apresentou efeito significativo para a variável resposta rendimento (%). Çoban e Biyik (2011) também observaram maior produção e melhores rendimentos com o uso de extrato de levedura quando comparados com sulfato de amônio.

Tabela 3 – Planejamento 2² completo avaliando o efeito do sulfato de amônio e extrato de levedura como fonte de nitrogênio na produção de CB.

Ensaio	Ext. de Levedura (g/L)	NH ₄ SO ₂ (g/L)	Celulose (g/L)	Rendimento (%)
1	2,20	1,50	2,92	20,44
2	2,20	8,50	2,31	23,30
3	12,80	1,50	3,01	22,20
4	12,80	8,50	2,48	18,17
5	0,00	5,00	1,76	12,60
6	15,00	5,00	2,83	22,62
7	7,50	0,00	3,38	25,16
8	7,50	10,00	2,14	15,56
9	7,50	5,00	2,69	20,20
10	7,50	5,00	2,50	18,73
11	7,50	5,00	2,96	22,22

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que, maior produção de CB por *G. hansenii* CCT 1431 utilizando sisal como fonte de carbono é obtida utilizando-se 15 g/L de açúcar total, pH 5 e 7,5 g/L de extrato de levedura. Quanto ao efeito da suplementação, este apresenta uma faixa ótima para extrato de levedura de 4 a 15 g/L, sendo observada uma redução na produção de CB em cultivos suplementados com sulfato de amônio.

3. REFERÊNCIAS

- ANDRADE, R.; JORNELAS, J.; BRANDÃO, W. Situação atual do sisal na Bahia e suas novas possibilidades de utilização e aproveitamento. Comunicação. Disponível em: <http://www.seagri.ba.gov.br/pdf/3_comunicacao01v9n1.pdf>. Acesso em: 28 jan 2013.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos. Edição IV. Instituto Adolfo Lutz. Brasília: Ministério da Saúde, 2005
- CHAWLA P. R.; BAJAJ, I. B.; SURVASE, S. A.; SINGHAL, R. S. - Microbial Cellulose: Fermentative Production and Applications - Fermentative Production of Microbial Cellulose, *Food Technol. Biotechnol.* v. 47, n. 2, p. 107-124, 2009.
- ÇOBAN, E. P.; BIYIK, H. Effect of various carbon and nitrogen sources on cellulose synthesis by *Acetobacter lovaniensis* HBB5. *African Journal of Biotechnol.* v.1, n. 27, p. 5346-5354, 2011
- HESTRIN, S.; SCHRAMM, M. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. *Biochem. Journal*, v. 58, n. 2, p. 345-352, 1954
- KUROSUMI, A.; SASAKI, C.; YAMASHITA, Y.; NAKAMURA, Y. Utilization of various fruit juices as carbon source for production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* NBRC 13693. *Carbohydrate Pol.* v. 76, n 2, p. 333-335, 2009.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analyt. Chem.*, v. 31, p. 426, 1959.