

PRODUÇÃO DE MEMBRANAS DE CELULOSE BACTERIANA USANDO MELAÇO DE SOJA

Erika F. Souza^{1,2}, Selma C. Terzi¹, Gabriela S. Santos³, Sidinea C. Freitas¹, Otniel Freitas-Silva¹
e Leda M.F. Gottschalk¹

¹ Embrapa Agroindústria de Alimentos

² Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - PPGAN

³ Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

e-mail: leda.fortes@embrapa.br

Classificação: Novos Materiais e Processos em Nanotecnologia e suas Aplicações no Agronegócio

Resumo

A celulose é composta de monômeros de glicose unidos por ligações glicosídicas β 1,4. Tradicionalmente é extraída de vegetais, e sua composição consiste de moléculas associadas à hemicelulose e à lignina. Já a celulose bacteriana (CB) compreende celulose pura possuindo propriedades únicas, como a alta cristalinidade, e é amplamente produzida por algumas das cepas dos gêneros *Acetobacter* e *Gluconacetobacter*. Há uma busca por uma fonte energética para otimização da produção e do rendimento de biomassa de CB que apresente maior sustentabilidade econômica e ambiental. Assim, o melaço de soja dispõe como um subproduto potencialmente promissor. Neste contexto, foi investigada a produção de CB por *G. xylinus* (ATCC 53582) em cultura estática, usando melaço de soja hidrolisado como substrato em diferentes concentrações, durante 10 dias de incubação. O melaço de soja foi caracterizado quimicamente, submetido a hidrólise ácida e avaliado em diferentes concentrações. O maior rendimento de CB foi obtido com 40 g/L de açúcares, com a produção de 1,71g/L. Assim o melaço de soja pode ser um candidato a substrato adequado e promissor para a produção de CB.

Palavras-chave: Celulose bacteriana; Melaço de soja; *Gluconacetobacter xylinus*; Resíduo agroindustrial

PRODUCTION OF BACTERIAL CELLULOSE MEMBRANES USING SOYBEAN MOLASSES

Abstract

Cellulose is composed of glucose monomers bound by β 1,4 glycosidic bonds. It is traditionally extracted from vegetables, and its composition consists of hemicellulose and lignin associated molecules. However, bacterial cellulose (CB) comprises pure cellulose having unique properties, such as high crystallinity and is widely produced by some strains from *Acetobacter* and *Gluconacetobacter* genera. There is a search for an energy source to optimize the production and yield of CB biomass that presents greater economic and environmental sustainability. Thus, soybean molasses provides as a potentially promising by-product. In this context, the CB by *G. xylinus* (ATCC 53582) production was investigated in static culture, using hydrolyzed soybean molasses as substrate in different concentrations during 10 days of incubation. Soybean molasses was chemically characterized, subjected to acid hydrolysis and tested at different concentrations. The highest yield of CB was obtained in 40 g/L of sugars, with the production of 1,71g/L. Thus, soybean molasses may be a suitable and promising substrate candidate for CB production.

Keywords: Bacterial cellulose; Soybean molasses; *Gluconacetobacter xylinus*; Agro-industrial waste

1 INTRODUÇÃO

A celulose sintetizada por micro-organismos, conhecida como celulose bacteriana (CB), é um biopolímero obtido a partir da fermentação de meios de cultura ricos em sacarídeos. O fato de ser quimicamente pura a distingue favoravelmente da celulose obtida a partir da biomassa vegetal, associada geralmente à lignina e à hemicelulose (KESHK et al., 2006). Devido às suas características e

peculiaridades, a CB pode ser aplicada na indústria alimentícia como espessante; na medicina, como substituto temporário da pele humana e no desenvolvimento de novos materiais poliméricos (SHAH et al., 2013). O primeiro uso da CB na indústria de alimentos foi na produção de nata de coco nas Filipinas, tornando-se uma iguaria popular. Sua textura gelificante e completa indigestibilidade no trato intestinal humano a torna atrativa para uso em alimentos. Em 1992, foi introduzida em bebidas dietéticas no Japão. É também consumida como Kombucha para tratamento de saúde (CHAWLA et al., 2009), entre outras aplicações.

Contudo, o custo de produção deste biopolímero ainda é caro comparado ao da celulose vegetal. A fonte de carbono mais utilizada para a produção de CB é a glicose, no entanto, bactérias do gênero *Gluconacetobacter* são capazes de utilizar substratos com diferentes mono ou dissacarídeos, alcoóis ou ácidos dicarboxílicos. Por isso há grande interesse no uso de substratos alternativos de baixo custo como os resíduos agroindustriais (CARREIRA et al., 2011).

A soja é um grão muito versátil que dá origem a produtos e subprodutos muito usados pela indústria química e de alimentos. Durante o processamento da soja para a obtenção do óleo e da proteína, são gerados diversos subprodutos ricos em carboidratos tais como a casca, o melaço, o okara e a farinha. O subproduto do processo de obtenção do concentrado proteico da soja é o melaço de soja (SILVA, 2011).

O melaço de soja apresenta de 55 a 60% de oligossacarídeos solúveis, 8 a 12% de proteína e 15 a 20% de gordura. Esses carboidratos podem ser fermentados por micro-organismos e assim usados para gerar biocombustíveis etanol e butanol, enzimas xilanases e lipases e outros produtos como o ácido oleico, ácido lático e polihidroxialcanoato (ABDULLAH; JU, 2016), características estas promissoras para o seu uso como substrato para fermentação de *G. xylinus*.

Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi produzir celulose a partir da fermentação da bactéria *G. xylinus* (ATCC 53582) usando o resíduo agroindustrial melaço de soja como meio de cultivo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Caracterização do melaço de soja

O melaço de soja foi cedido pela empresa Selecta em Minas Gerais. Ele foi caracterizado em relação a umidade e cinzas em Analisador Termo Gravimétrico (TGA 2000 Las Navas Instruments T= 550°C, O₂, peso constante). O Nitrogênio Total foi determinado pelo método Kjeldahl e o extrato etéreo por extrator automático (ANKOM) de gordura da amostra por éter de petróleo.

2.2 Determinação do açúcar redutor

A concentração de açúcares redutores foi determinada pelo método do DNS (MILLER, 1959), utilizando glicose como padrão. As absorbâncias foram medidas a 540nm em Espectrofotômetro (Micronal AJX 1900).

2.3 Preparo dos meios

Foi preparado meio sintético HS (20 g/L de glicose, 5 g/L peptona, 5 g/L extrato de levedura, 1,15 g/L de ácido cítrico e 2,7 g/L de fosfato de sódio) (HESTRIN; SCHRAMM, 1954) e meios com melaço de soja diluídos. O melaço foi hidrolisado com adição de H₂SO₄ concentrado até o pH 1,5 e posterior aquecimento a 80°C por 10 min. O açúcar redutor foi determinado e o melaço diluído pela adição de água destilada nas concentrações de 20 (MSH 20), 40 (MSH 40), 80 (MSH 80), 100 (MSH 100) e 130g/L (MSH 130) de açúcar redutor. O pH em todos os meios foi ajustado para 6,0. As fermentações ocorreram em Frasco Schott de 250 mL contendo 70 mL de meio autoclavado a 121°C/15 minutos.

2.4 Produção de celulose

A cepa *G. xylinus* ATCC 53582, foi mantida em ágar manitol sob refrigeração a 4°C. O pré-inóculo foi preparado com caldo manitol e incubado a 28 °C por 48-72 horas. O inóculo de 5% (v/v) da suspensão de células de *G. xylinus* foi adicionado aos meios HS, MSH 20, MSH 40, MSH 80, MSH 100 e MSH 130. A fermentação foi realizada em duplicata a 28 °C por 10 dias.

2.5 Purificação de celulose bacteriana

As membranas obtidas foram purificadas por imersão com solução aquosa de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 2% por 2 horas (em 3 lavagens) para remoção dos resíduos de célula bacteriana. Em seguida, aquecidas numa solução aquosa de NaOH 1 M a 80 °C por 30 min, e então lavadas várias vezes com água deionizada. Por fim, as membranas foram secas em estufa a 65-70 °C até peso constante.

2.6 Determinação do Brix

O Brix dos melações após a diluição foi medido em refratômetro Atago, Modelo Pal-1.

2.7 Determinação do pH

O pH dos meios foi ajustado inicialmente a 6,0 e foi medido ao final da fermentação em pHmetro Ion, modelo PHB500.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização do melação de soja

Os resultados obtidos pelas análises realizadas de umidade, cinzas, nitrogênio total, extrato etéreo, açúcar redutor e Brix estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Caracterização química do melação de soja

UMIDADE (g/100g)	CINZAS (g/100g)	NITROGÊNIO TOTAL (g/100g)	EXTRATO ETÉREO (g/100g)	AÇÚCAR REDUTOR*	BRUX*
27,99	11,62	0,92	7,50	148,90	62,5

* Considerando o melação de soja hidrolisado

O resultado de açúcar redutor obtido após o processo de hidrólise foi satisfatório, possibilitando a disponibilidade dos açúcares redutores para a fermentação.

3.2 Produção de membrana

Em estudos preliminares onde o melação de soja bruto foi usado, não foi observada a produção de membrana de CB. Posteriormente, o melação foi hidrolisado com H₂SO₄ e utilizado para a produção da CB. Houve produção de membranas de CB nos meios com melação de soja nas concentrações de 20 (MSH 20), 40 (MSH 40) e 80g/L (MSH 80) de açúcar redutor. As membranas foram formadas na superfície do meio devido ao processo estático. Nas concentrações de 100 g/L (MSH 100) e 130 g/L (MSH 130) não ocorreu a formação das membranas de CB, nem foi observado crescimento bacteriano significativo. Esse fato é reforçado pelo baixo consumo de açúcar redutor nesses meios, de 6,8 g/L e 5,5 g/L para os meios MSH 100 e MSH 130, respectivamente (Tabela 2).

A média dos resultados de concentração de açúcar redutor final (g/L), peso das membranas obtidas e o pH final estão mostrados na Tabela 2. Considerando o peso seco das membranas obtidas, o meio com melação de soja hidrolisado que propiciou a maior produção da membrana de CB (1,71g/L) foi o meio MSH 40, com um consumo de 15,45 g/L de açúcar redutor em 10 dias. No entanto, a produção ainda foi inferior a obtida no meio sintético HS (5,77g/L) que teve um consumo semelhante de açúcar redutor (14,81 g/L). Maiores estudos devem ser realizados para aumentar a produção da CB em meio contendo melação de soja.

Cakar et al. (2014) obteve resultado semelhante (1,64 g/L) produzindo CB a partir de melação de cana em cultivo estático por 7 dias também com *G. xylinus*. Bae e Shoda (2004) usaram melação de cana como substrato para produção de celulose por *Acetobacter xylinum* BPR2001. Nesse estudo o melação também apresentou melhores rendimentos após a hidrólise do melação com H₂SO₄ e com concentração de 20g/L (5,3 g/L).

Tabela 2. Parâmetros fermentativos da produção de celulose bacteriana após 10 dias de cultivo.

MEIO	AÇUCAR REDUTOR INICIAL (g/L)	°BRIX INICIAL	AÇUCAR REDUTOR FINAL (g/L)	PESO MEMBRANAS (g/L)	pH FINAL
HS	20	NA	5,19	5,77	4,31
MSH 20	20	6,3	11,04	1,21	5,70
MSH 40	40	12,2	24,55	1,71	5,50
MSH 80	80	20,8	55,02	0,60	5,20
MSH 100	150	35,4	143,2	NA	3,66
MSH 130	200	48,7	194,5	NA	2,28

NA, Não se aplica

4 CONCLUSÃO

O melaço de soja se mostrou uma fonte alternativa promissora para obtenção de celulose bacteriana. Foi possível obter CB a partir de melaço de soja hidrolisado e diluído até a concentração de 80 g/L de açúcar redutor. A produção foi maior na concentração de 40 g/L de açúcares redutores. Experimento futuros variando parâmetros de fermentação como volume de inóculo e suplementação do meio, devem ser realizados para aumentar a produção de CB.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos a Embrapa Agroindústria de Alimentos pela disponibilização dos laboratórios e o financiamento do estudo.

REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, A.; JU, L. Soybean carbohydrate as fermentation feedstock for production of biofuels and value-added chemicals. *Process Biochemistry*, v.51, n.8, p.1046-1057, 2016.
- BAE, S.; SHODA, M. Bacterial Cellulose Production by Fed-Batch Fermentation in Molasses Medium. *Biotechnology progress*, v. 20, n. 5, p. 1366-1371, 2004.
- CAKAR, Fatih et al. Improvement production of bacterial cellulose by semi-continuous process in molasses medium. *Carbohydrate polymers*, v. 106, p. 7-13, 2014.
- CARREIRA, P. et al. Utilization of residues from agro-forest industries in the production of high value bacterial cellulose. *Bioresource Technology*, v. 102, n.15, p. 7354-7360, 2011.
- CHAWLA, P.R.; BAJAJ, I.B.; SURVASE, S.A.; SINGHAL, R.S. Microbial cellulose: fermentative production and applications. *Food Technology Biotechnology*, v. 47, n. 2, p. 107-124, 2009.
- HESTRIN, S.; SCHRAMM, M. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. *Biochemical Journal*, v. 58, n. 2, p. 345-352, 1954.
- KESHK, S. M. A. S.; RAZEK, T. M. A.; SAMESHIMA, K. Bacterial cellulose production from beet molasses. *African Journal of Biotechnology*, v. 5, n. 17, p. 1519-1523, 2006.
- SHAH, N., et al. Overview of bacterial cellulose composites: a multipurpose advanced material. *Carbohydrate Polymers*, v. 98, n.2, p. 1585-1598, 2013.
- SILVA, F.B. Produção de etanol a partir de melaço de soja hidrolisado enzimaticamente. Dissertação Universidade Federal de Uberlândia.p.120, 2011.