

---

## INTERAÇÃO ENTRE FONTE DE NITROGÊNIO ORGÂNICA E INORGÂNICA NA PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA PELA CEPA *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 1431

---

L.M.F. GOTTSCHALK, A.I.S. BRÍGIDA, E.M. PENHA, J.P.L. SILVA, E.F. SOUZA, S.C. TERZI, L.A.N. VIANA, E.M.M. OLIVEIRA

Embrapa Agroindústria de Alimentos, 23020-470, Rio de Janeiro, Brasil, leda.fortes@embrapa.br

Projeto Componente: 04      Plano de Ação: 02

---

### Resumo

O presente trabalho avaliou a interação entre duas fontes de nitrogênio (uma orgânica e outra inorgânica) na produção de celulose bacteriana (CB) pela cepa *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 1431. Para tanto, delineou-se um planejamento experimental <sup>2</sup> com pontos central e axial, onde extrato de levedura e sulfato de amônio foram adicionados ao meio sintético em diferentes concentrações, contendo glicose fixa a 20 g/L. Os experimentos foram conduzidos por 7 dias em fermentação estática a 28°C. Os resultados obtidos mostraram que maior produção de CB foi obtida sem sulfato de amônio e concentração de extrato de levedura maior que 12,5 g/L (0,856 g/L).

**Palavras-chave:** Celulose, *gluconacetobacter*, fonte de nitrogênio, planejamento experimental

### Publicação relacionada

L.M.F. GOTTSCHALK, A.I.S. BRÍGIDA, E.M. PENHA, J.P.L. SILVA, E.F. SOUZA, S.C. TERZI, L.A.N. VIANA E E.M.M. OLIVEIRA. Avaliação da fonte de nitrogênio na produção de celulose bacteriana pela cepa *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 1431 em meio sintético. SINAFERM 2013.

---

### Introdução

Entre as muitas espécies de bactérias capazes de produzir a celulose bacteriana (CB), as do gênero *Gluconacetobacter* têm sido utilizadas como modelo para elucidação das características básicas da biossíntese de celulose (BASAVARAJ, HUNGUND e GUPTA, 2010). Suas propriedades únicas, tais como pureza e cristalinidade elevadas, biodegradabilidade e afinidade biológica excelentes, além da grande capacidade de retenção da água fazem da CB um novo material disponível para as indústrias de alimentos e de produtos químicos (SHODA e SUGANO, 2005).

A espécie *G. hansenii*, identificada como uma espécie estritamente aeróbica, gram-negativa, tem

sido considerada um organismo modelo para o estudo da síntese de celulose (LYER *et al.*, 2010).

Dependendo da forma do processo (estático ou agitado), existe uma variação nas propriedades da celulose obtida (GALAS *et al.*, 1999). Nas condições de cultura estacionária, uma membrana espessa e gelatinosa de CB é acumulada na superfície de um meio de cultura, ao passo que em condições de cultura agitada, a celulose pode ser produzida na forma de uma suspensão fibrosa, pellets ou esferas (KRYSZYNOWICZ *et al.*, 2002; BAE e SHODA, 2005).

Devido à limitação de rendimento na exploração comercial da CB, muitos pesquisadores vêm tentando aumentar a produtividade usando diferentes fontes de carbono

e de nitrogênio (BASAVARAJ, HUNGUND e GUPTA, 2010; Carreira *et al.*, 2011; MOHITE, KAMALJA e PATIL, 2012). Desde a descoberta da produção da celulose bacteriana, o meio sintético mais utilizado, meio HS (HESTRIN e SCHRAMM, 1954), possui glicose como fonte de carbono e extrato de levedura e peptona como fontes de nitrogênio. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência da concentração do extrato de levedura e do sulfato de amônio na produção da celulose pela cepa *G. hansenii* ATCC1431 em meio sintético.

## Materiais e métodos

### Produção da celulose

A cepa *G. hansenii* ATCC 1431, foi mantida em ágar manitol sob refrigeração. 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. hansenii* foi adicionado ao meio sintético HS (20 g/L de glicose, 1,15 g/L de ácido cítrico e 2,7 de fosfato de sódio) com as diferentes fontes de nitrogênio separadas ou combinadas (extrato de levedura e sulfato de amônio) de acordo com o planejamento experimental delineado. A fermentação foi realizada em Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio, com pH inicial ajustado em 6,0, a 28°C por 7 dias.

### Purificação da celulose bacteriana

As películas obtidas na superfície dos meios de cultivos foram purificadas por imersão com solução aquosa de SDS a 2% por 2 horas (em 3 lavagens) para remoção dos restos de célula bacteriana. Em seguida, aquecidas numa solução aquosa de NaOH 1M a 80°C por 30min, e então lavadas com água deionizada várias vezes para remoção do álcali residual e secas em estufa a 65°C-70°C até peso constante.

## Resultados e discussão

Resultados preliminares demonstraram que o sulfato de amônio em combinação com o extrato de levedura resultou num rendimento do produto (CB) por substrato consumido do meio (açúcar redutor) superior ao obtido com o meio sintético

HS. Visando estudar a interação de fonte de nitrogênio orgânica e inorgânica na produção de celulose bacteriana, bem como as melhores concentrações de aplicação, aplicou-se a metodologia de superfície de resposta (MSR) através de um planejamento fatorial 2<sup>2</sup> com 3 pontos centrais e 4 axiais. A produção de celulose bacteriana, em g/L, foi definida como variável resposta. Os dados da matriz do delineamento bem como as respostas correlacionadas a cada ponto encontram-se na Tab 1. Empregou-se a técnica da Análise de Variância (ANOVA) na análise dos resultados a fim de se determinar qual o modelo seria utilizado de forma a obter o melhor ajuste aos dados experimentais para a variável resposta. A produção de celulose variou de 0 a 0,858 g/L, nas condições estudadas para os 11 experimentos.

Tab 1 – Planejamento fatorial 2<sup>2</sup> avaliando efeito da fonte de nitrogênio em diferentes concentrações na produção de celulose bacteriana (CB).

Ensaio	Extrato de Levedo (% m/v)	Sulfato de Amônio (% m/v)	Produção de CB (g/L)
1	3,6	0,7	0,432
2	21,4	4,3	0,442
3	3,6	4,3	0,312
4	21,4	0,7	0,858
5	0	2,5	0
6	25	2,5	0,624
7	12,5	0	0,856
8	12,5	10	0,540
9	12,5	2,5	0,582
10	12,5	2,5	0,639
11	12,5	2,5	0,525

A diferença entre estes pontos de mínimo e máximo foi maior do que a variação da produção de celulose para as condições de ponto central ( $\Delta = 0,057$ ). Assim, pôde-se observar, com confiança de 95%, efeito significativo tanto para concentração de sulfato de amônio quanto para de extrato de levedo (Fig 1).

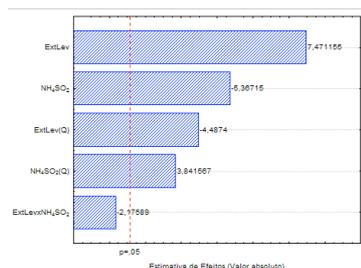


Fig 1 – Estimativa dos efeitos lineares e quadráticos das variáveis independentes concentrações de sulfato de amônio e de extrato de levedo na produção de celulose bacteriana.

Com base nos resultados, espera-se um aumento na produção de CB com o incremento de extrato de levedura no meio. Já o sulfato de amônio, mesmo quando associado com extrato de levedura, apresentou efeito negativo na produção de celulose bacteriana. O efeito da interação das duas fontes de nitrogênio não foi estatisticamente significativo.

Assim, o modelo de segunda ordem não-linear para a produção de celulose com as variáveis codificadas incluindo apenas os parâmetros estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ) é expresso por:

$Y_1 = 0,189 + 0,074X_1 - 0,002X_1^2 - 0,068X_2 + 0,010X_2^2$ , onde  $X_1$  é a concentração de extrato de levedo e  $X_2$  é a concentração de sulfato de amônio.

Analisando a ANOVA deste modelo, observou-se que o erro puro do modelo é pequeno, o que indica boa representatividade do mesmo ( $R^2 = 0,96$ ). Isto pode ser visualizado pela proximidade dos pontos reais da superfície de resposta teórica (Fig 2).

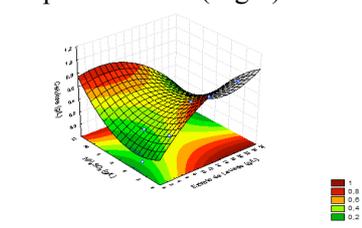


Fig 2 – Superfície de resposta para o modelo gerado para a produção de celulose bacteriana.

## Conclusões

A produção de celulose bacteriana pode ser incrementada quando a fonte de nitrogênio é ausente de sulfato de amônio e com concentração de extrato de levedura maior ou igual a 12,5 g/L (0,856 g/L), não sendo observado aumento significativo na produção para concentrações maiores que 12,5 g/L.

## Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq, Finep, Capes e Projeto MP1 Rede Agronano – Embrapa.

## Referências

- BAE, S.; SHODA, M. Production of bacterial cellulose by *Acetobacter xylinum* BPR 2001 using molasses medium in a jar fermentor. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 67, p. 45-51, 2005.
- BASAVARAJ, S.; HUNGUND, S.; GUPTA, G. Improved production of bacterial cellulose from *Gluconacetobacter persimmonis* GH-2. *J. Microbial Biochem. Technol.*, v. 2, n. 5, p. 127-133, 2010.
- CARREIRA, P.; MENDES, J.A.S.; TROVATTI, E.; SERAFIM, L.S.; FREIRE, C.S.R.; SILVESTRE, A.J.D.; NETO, C.P. Utilization of residues from agroforest industries in the production of high value bacterial cellulose. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 7354–7360, 2011.
- GALAS, E.; KRYSZYNOWICZ, A.; TARABASZ-SZYMANSKA, L.; PANKIEWICZ, T.; RZYSKA, M. Optimization of the production of bacterial cellulose using multivariable linear regression analysis. *Acta Biotechnol*, v. 19, p. 251-260, 1999.
- KRYSZYNOWICZ, A.; CZAJA, W.; WIKTOROWSKA-JEZIERSKA, A.; M GONC ALVES-MIS 'KIEWICZ, M TURKIEWICZ AND S BIELECKI. Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, v. 29, p. 189-195, 2002.
- LYER, P.R.; GEIB, S.M.; CATCHMARK, J.; KAO, T.; TIEN, M. Genome sequence of a cellulose-producing bacterium, *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 23769. *J. of Bacteriol.*, v. 192(16), p. 4256-4257, 2010.
- MOHITE, B.V.; KAMALJA, K.K.; PATIL, S.V. Statistical optimization of culture conditions for enhanced bacterial cellulose production by *Gluconoacetobacter hansenii* NCIM 2529. *Cellulose*, v. 19, p. 1655–1666, 2012.
- SHODA, M.; SUGANO, Y. Recent advances in bacterial cellulose production. *Biotechnol Bioprocess Eng*, v. 10, p. 1-8, 2005