

EXTRATO DE ALGAROBA COMO FONTE DE CARBONO PARA OBTENÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA.

E. S. NASCIMENTO¹, H. S. L. LIMA¹, F. K. ANDRADE², A. I. BRÍGIDA³, M. F. ROSA²,
M. F. BORGES²

¹ Universidade Federal do Ceará, Departamento de Engenharia Química

² Embrapa Agroindústria Tropical

³ Embrapa Agroindústria de Alimentos

E-mail para contato: eligenessampaio@hotmail.com

RESUMO – O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial do extrato de algaroba como substrato para produção de celulose bacteriana. Após obtenção do extrato da vagem de algaroba o mesmo foi caracterizado e a produção de celulose bacteriana (CB) foi avaliada em diferentes concentrações de açúcar e valores de pH. O extrato de algaroba possui 16° Brix é rico em açúcares do tipo glicose, celobiose e frutose e possui 1,10g/L de nitrogênio total. A produção de CB em diferentes concentrações de açúcar e valores de pH apresentou maior rendimento e produção de CB após 5 dias de fermentação submersa utilizando 15g/L de açúcar total e pH 4,0.

1. INTRODUÇÃO

A celulose bacteriana é um polímero linear de glicose, altamente cristalino, sintetizado extracelularmente por bactéria do gênero *Gluconacetobacter*, na forma de nanofibras. (Jozala *et al* 2011). As bactérias deste gênero são gram-negativas, tolerantes a condições ácidas, crescem em uma faixa de temperatura entre 15°C - 35°C e utilizam diversas fontes de carbono para produzir celulose bacteriana. Essa produção pode ocorrer de forma estática e submersa, o que resulta na formação de um filme de CB que, devido às suas características físicas e mecânicas, possui um papel bastante promissor para aplicações em diversas áreas (Chawla *et al.*, 2009).

Em paralelo, a algaroba é uma planta do gênero *prosopis* de origem andina, altamente resistente à seca, que se adaptou muito bem ao Nordeste do Brasil. Esta planta produz como fruto uma vagem rica em proteína, gordura, vitaminas, sais minerais e, principalmente, açúcar (Borges, 2004). Dentro deste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial do extrato de algaroba como substrato para produção de celulose bacteriana.

2. METODOLOGIA

2.1. Caracterização da Matéria-Prima

As vagens de algaroba foram coletadas na região do Trairi – Ceará. O extrato foi obtido através da trituração, peneiragem e centrifugação das vagens que ficaram intumescidas

em água destilada em uma proporção de 1:2 (kg de vagem/litros de água) por 24 horas a temperatura ambiente. O extrato obtido foi armazenado a -18°C e para os estudos de produção de celulose bacteriana, o extrato foi esterilizado (121°C por 15 minutos) e caracterizado. A determinação de pH foi realizada seguindo as normas do Instituto Adolf Lutz. (IAL 2004). O nitrogênio total foi quantificado empregando-se o método micro-Kjedahl (AOAC, 1995). O perfil de açúcares presente no extrato de algaroba foi determinado por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC).

2.2. Inóculo e Estudo da Influência das Condições de Cultivo na Produção de CB

O inóculo foi obtido por meio da inoculação da *G. hansenii* CCT 1431, previamente ativado, em caldo padrão sintético HS proposto por Hestrin e Schramm (2000) esterilizado a 121°C por 15 minutos e incubado a 30°C por 72 horas.

O efeito da concentração inicial de açúcares (2,5 a 30 g/L) e do pH inicial da fermentação (4 a 8) na produção de CB (g/L) e no rendimento do processo (%) foi avaliado em diferentes formulações do extrato de algaroba esterilizado (121°C por 15 minutos) e inoculado em 3% (v/v) da cultura. Alíquotas de 100mL das formulações foram distribuídas em placa de Petri (14,5cm de diâmetro) e incubados a 30°C por 5 dias. Os ensaios foram realizados em triplicata. As placas foram incubadas em estufa a 30°C por 5 dias. Após o período de incubação as películas foram retiradas e o extrato fermentado foi filtrado e armazenado para análises posteriores.

2.4. Purificação das Películas de CB e Análise do Extrato Fermentado

As películas de celulose bacteriana foram purificadas através de tratamento alcalino, com hidróxido de sódio 4% a 70°C por meia hora, realizado duas vezes para que toda a carga microbiana e coloração proveniente do extrato fossem extraídas completamente. Após o tratamento, as membranas foram lavadas com água destilada até a neutralização. A massa de celulose foi determinada através de secagem e pesagem da película a 170°C em balança de infravermelho. Os extratos obtidos após fermentação foram avaliados quanto a concentração de açúcares totais por DNS (Miller, 1959) e o pH final do meio foi determinado por potenciometria (IAL, 2004).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

O resultado da caracterização do extrato estéril de algaroba é apresentado na Tabela 1. O teor de nitrogênio (1,1g/L) constatado no extrato foi similar ao contido no meio HS (1,21g/L) descrito por Hestrin e Schramm (2000). O extrato apresentou elevado teor de açúcares (93,7g/L), sendo a frutose o principal contribuinte (37,23g/L) seguido de celobiose (30,8g/L) e glicose (25g/L).

Tabela 1 – Caracterização do extrato estéril das vagens de algaroba

Açúcar Total (g/L)	S. Solúveis (°Brix)	Frutose (g/L)	Celobiose (g/L)	Glicose (g/L)	Nitrogênio Total (g/L)	pH
93,70	16,30	37,23	30,81	25,61	1,10	4,69

Os resultados para o estudo da variação da concentração inicial de açúcar são apresentados na Tabela 2. A produção de CB aumentou com o aumento da concentração de açúcar, porém em taxas baixas. Contudo o rendimento de CB diminuiu com o aumento da concentração de açúcar, apresentando um melhor resultado para a concentração de 2,5g/L (19,51%). Tais resultados, provavelmente, indicam que, nessas condições, a bactéria utilizou outra rota metabólica mais ativa haja vista o elevado consumo de açúcar nos experimentos. Na concentração de 2,5g/L de açúcar, foi produzida uma película de CB de aparência frágil que provavelmente não apresentará uma resistência mecânica adequada. O ganho de massa de celulose produzida observada para concentrações 10 g/L a 30 g/L não foi estatisticamente significativo. Desta forma, a concentração de açúcar inicial de 15g/L foi escolhida, pois, nessas condições de cultivo, apesar do baixo rendimento, obteve-se uma maior massa de celulose, o que proporcionou a obtenção de uma película de celulose mais resistente frente às obtidas com menores concentrações de açúcar. Carreira (2010) avaliou a produção de CB a partir de resíduos industriais, como fontes alternativas de carbono, e observou que em substratos contendo glicose melhorou produção de CB (0,63g/L), resultado bem próximo ao que é mostrado neste estudo para a concentração de 15g/L.

Tabela 2 – Efeito da concentração inicial de açúcar na produção de CB por *G. hansenii*, utilizando extrato de algaroba como fonte alternativa de carbono

Açúcares (g/L)	Celulose (g/L)	Rendimento (%)	Açúcar consumido (% , g/g)
2,5	0,26 ± 0,06 d	19,51 ± 5,43f	52,35 ± 4,30c
5	0,36 ± 0,00c	9,01 ± 0,04b	66,03 ± 0,23a
7,5	0,36 ± 0,04cd	7,06 ± 0,75ab	68,27 ± 0,48ab
10	0,36 ± 0,02ab	4,92 ± 0,12ab	73,04 ± 1,74ab
15	0,53 ± 0,11ab	4,81 ± 1,00ab	73,71 ± 0,79b
20	0,60 ± 0,03ab	4,32 ± 0,29ab	69,48 ± 0,81ab
30	0,81 ± 0,08a	4,84 ± 0,40ab	56,04 ± 3,07c

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

O efeito do pH inicial de fermentação na produção e rendimento de CB., é apresentado na Tabela 3. Não houve diferença significativa na produção de celulose na faixa de pH estudada, entretanto um melhor rendimento foi obtido em pH 4,0. Novamente, observou-se que o consumo maior de açúcar não correspondeu necessariamente à maior conversão, o que pode estar relacionado a alguma rota metabólica alternativa, como já mencionada. Masaoka (1992) afirma que o pH ótimo para produção de CB está entre 4,0 e 6,0, o que está em concordância com os resultado descritos neste estudo, onde o maior rendimento foi obtido em pH 4,0 (15,4%). Para alguns valores de pH inicial, o pH final diminuiu após 5 dias de fermentação. Isto deve ter ocorrido pelo acúmulo de ácido glucônico, ácido acético ou láctico no meio de cultivo (Kongruang, 2008). Kurosomi (2009) obteve um rendimento de 0,3% a 2,1% na produção de CB utilizando sucos de diversas frutas sem suplementação (após 14 dias de fermentação), valores estes abaixo do obtido com o extrato de algaroba. No entanto, quando esses meios foram suplementados com fontes de nitrogênio, o rendimento aumentou de 3,3 a 19,5 vezes dependendo do suco utilizado.

Diante dos resultados obtidos, conclui-se que o extrato de algaroba apresenta potencial como fonte alternativa de carbono para produção de celulose bacteriana por

bactérias do gênero *Gluconacetobacter*, nas condições de concentração 15g/L em pH 4,0.

Tabela 3 – Efeito do pH inicial da fermentação na produção de CB por *G. hansenii* utilizando extrato de algroba como fonte alternativa de carbono

pH inicial	pH final	Celulose (g/L)	Rendimento (%)	Açúcar consumido (% g/g)
4	4,21 ± 0,02a	0,82 ± 0,02a	15,4 ± 1,14b	35,69 ± 2,76a
5	4,42 ± 0,28ab	0,73 ± 0,03a	10,96 ± 0,83a	44,37 ± 3,73a
6	6,29 ± 1,43ab	0,60 ± 0,15a	8,71 ± 2,29a	46,16 ± 9,55a
8	5,63 ± 0,6b	0,62 ± 0,03a	8,07 ± 0,48a	51,52 ± 1,99a

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

4. REFERÊNCIAS

- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International, 16 ed., Washington. 1995.
- BORGES, I F., Obtenção e Caracterização do Melado de Algaroba (*Prosopis juliflora*) e sua Utilização em uma formulação Alimentícia. Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal da Paraíba – João Pessoa 2004.
- CHAWLA, P. R.; BAJAJ, I. B.; SURVASE, S. A.; SINGHAL, R. S. .Microbial Cellulose: Fermentative Production and Applications, *F.Tech. And Biotech.*, 47 (2009), 107-124
- CARREIRA P. M. C. de Produção de Celulose Bacteriana a partir de Resíduos Industriais. 2010. 36fls. (Dissertação) Mestrado em Materiais Derivados de Recursos Renováveis, – Universidade de Aveiro. Portugal, 2010
- HESTRIN, S.; SCHRAMM, M. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. *Biochem. J* v. 58 (1954), 345-352.
- IAL - Instituto Adolf Lutz - Métodos físico-químicos para análises de alimentos – São Paulo, 2004.
- JOZALA, A.F., LOPES, A. M., NOVAES, L. C. de L.; PESSOA, A. J. Produção de Celulose Bacteriana: Uma Nova Tendência. *Micro. in foco*, v.14, p. 14-17, 2011.
- KONGRUANG, S. Bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* strains from agricultural waste products, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 148 (2008) 245–256.
- 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. *Carb. Polym.* v.76 p.333–335 (2009)
- MASAOKA, S. OHE T, SAKOTA, N. Production of cellulose from glucose by *Acetobacter xylinum*, *J. Ferment. Bioeng.* 75 (1993) 18–22.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analyt. Chem.*, 31 (1959), p. 426-428.