

AVALIAÇÃO DA FONTE DE NITROGÊNIO NA PRODUÇÃO DE CELULOSE BACTERIANA PELA CEPA *Gluconacetobacter hansenii* ATCC 1431 EM MEIO SINTÉTICO

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

Embrapa Agroindústria de Alimentos, 23020-470, Rio de Janeiro, Brasil
E-mail para contato: leda.fortes@embrapa.br

RESUMO – O presente trabalho teve por objetivo avaliar diferentes fontes de nitrogênio e a interação das mesmas na produção de celulose bacteriana (CB) pela cepa *G. hansenii* ATCC 1431. Inicialmente, foram avaliadas diferentes fontes de nitrogênio (extrato de levedura, milhocina, peptona, sulfato de amônio, nitrato de sódio e ureia) adicionando estas ao meio sintético, mantendo uma relação C/N fixa de 15,5 em todos os meios avaliados. Posteriormente, foi realizado um delineamento experimental a fim de verificar a interação entre fonte de origem orgânica e inorgânica. Os experimentos foram conduzidos por 7 dias em fermentação estática a 30°C e o pH inicial foi ajustado em 6,0. Os resultados obtidos na primeira etapa mostraram que a melhor fonte orgânica foi o extrato de levedura e que sulfato de amônio apresentou aparente interação positiva. Contudo, os resultados do planejamento experimental mostraram efeito negativo tanto do sulfato de amônio isolado quanto da interação dele com extrato de levedura, para a faixa de concentração de sulfato estudada. Assim, a maior produção de celulose bacteriana (0,856 g/L) foi obtida sem sulfato de amônio e com concentração de extrato de levedura maior ou igual a 12,5 g/L, não sendo observado aumento significativo na produção em concentrações maiores que 12,5 g/L.

1. INTRODUÇÃO

A celulose sintetizada por microrganismos, 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. Além desta característica, a CB vem atraindo a atenção do meio científico e tecnológico pelo fato de ser biocompatível, atóxica, não alergênica; apresentar alta porosidade, elevado grau de polimerização, baixa densidade e alta capacidade de absorção e retenção de água. Devido as 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 (Ross *et al.*, 1991).

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 CB obtida (Galas *et al.*, 1999). Nas condições de cultura estacionária, uma membrana espessa e gelatinosa de CB é acumulada na superfície do meio

de cultivo, ao passo que em condições de cultura agitada, a celulose pode ser produzida na forma de uma suspensão fibrosa, pellets ou esferas (Krystynowicz *et al.*, 2002).

Embora a celulose bacteriana esteja entre os biopolímeros de maior interesse, aspectos, como o tipo de substrato e condições de cultivo podem também influenciar o curso da biossíntese e conseqüentemente as propriedades do biopolímero obtido (Klemm *et al.*, 2009). 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. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar diferentes fontes de nitrogênio na produção da celulose pela cepa *G. hansenii* ATCC 1431 em meio sintético.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Produção da celulose

A cepa *G. hansenii* ATCC 1431, foi mantida em Agar manitol sob refrigeração. O pré-inoculo foi preparado com caldo manitol e incubado a 28°C por 48-72 horas. O inoculo 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 (YE), milhocina, peptona, sulfato de amônio, nitrato de sódio e ureia) mantendo uma relação C/N fixa de 15,5. 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. Depois de selecionadas as fontes de nitrogênio, foi feito um planejamento experimental do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2².

2.2. 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, foram 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 65-70°C até peso constante.

2.3. Determinação do açúcar redutor

A concentração de açúcares redutores foi determinada pelo método do DNS (Miller, 1959), utilizando glicose como padrão.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, as fontes de nitrogênio foram avaliadas puras e o extrato de levedura resultou numa maior produção da celulose bacteriana (0,405 ± 0,057g/L) seguido da milhocina (0,148 ± 0,059 g/L). Quando as fontes de fácil assimilação, como a peptona, o sulfato de amônio, o nitrato de sódio e a ureia, foram utilizados como única fonte de nitrogênio, não foi observada nem produção de celulose e nem consumo de glicose (Tabela 1). Como o meio HS tem uma fonte não repressora (YE) com uma fonte de fácil assimilação (peptona), foi avaliada a influência da ureia, sulfato de amônio e nitrato de sódio com YE,

mantendo a mesma relação C/N do meio HS. O resultado obtido com o sulfato de amônio foi praticamente igual ao obtido com o meio HS, mas o rendimento por substrato consumido foi um pouco superior (3,29%) quando comparado ao meio HS (2,42%) indicando que o metabolismo da bactéria neste meio favoreceu mais a produção da celulose.

Tabela 1 – Comparação dos resultados nos diferentes meios avaliados

	Açúcar redutor (g/L)	celulose (g/L)	pH	Açúcar consumido (g/L)	Y P/S
YE	2,65	0,405	4,71	17,35	2,34
Milhocina	4,18	0,148	3,33	15,82	0,93
Peptona	19,94	0,000	5,88	0,06	0,00
(NH ₄) ₂ SO ₄	20,38	0,000	5,80	0,00	0,00
NaNO ₃	20,18	0,000	5,90	0,00	0,00
Ureia	20,13	0,000	5,92	0,00	0,00
YE + Peptona (HS)	1,94	0,436	5,05	18,06	2,42
YE + Ureia	4,81	0,391	4,00	15,19	2,57
YE + (NH ₄) ₂ SO ₄	6,64	0,440	4,32	13,36	3,29
YE + Na NO ₃	8,77	0,064	3,41	11,23	0,57

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 2² 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 Tabela 2.

Tabela 2 – Planejamento fatorial 2² avaliando efeito da fonte de nitrogênio na produção de celulose bacteriana (CB).

Ensaio	Extrato de Levedo, X ₁ (%, m/v)	Sulfato de Amônio, X ₂ (%, 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

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. A diferença entre estes pontos de mínimo e máximo foram 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. 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 bactéria. O efeito da interação das duas fontes de nitrogênio também foi negativo, apesar de não ter sido 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:

$Y_1 = 0,189 + 0,074X_1 - 0,002X_1^2 - 0,068X_2 + 0,010X_2^2$, sendo X_1 , a concentração de extrato de levedo e X_2 , 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 ($R^2 = 0,96$).

4. CONCLUSÕES

Maior produção de celulose bacteriana (0,856 g/L) é obtida sem sulfato de amônio e com concentração de extrato de levedura maior ou igual a 12,5 g/L, não sendo observado aumento significativo na produção para concentrações maiores que 12,5 g/L no intervalo avaliado.

5. REFERÊNCIAS

- 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.
- HESTRIN, S.; SCHRAMM, M. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*: II. Preparation of freeze - dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. *Biochem. J.*, v. 58, p. 345-352, 1954.
- KLEMM, D.; SCHUMANN, D.; KRAMER, F.; HESSLER, N.; KOTH, D.; SULTANOVA, B. Nanocellulose Materials - Different Cellulose, Different Functionality. *Macromolecular Symposia*, v. 280, p. 60-71, 2009.
- 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.
- MILLER G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.*, v. 31, p. 426-428, 1959.
- ROSS, P.; MAYER, R.; BENZIMAN, M. Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiol Rev.*, v. 55(1), p. 35-58, 1991.