

forma ocorrem a soma dos efeitos antibiótico e de interação do antibiótico com as AgNPs. Há um efeito adicional da quitosana que também foi testada isolada.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a FAPEMIG (CEX –APQ-00061/09), UFJF, CNPq e a CAPES pelo suporte financeiro e apoio as pesquisas.

REFERÊNCIAS

1. FERNÁNDEZ-DELGADO, M. AND P. SUÁREZ, Multiple antibiotic resistances of enteric bacteria isolated from recreational coastal waters and oysters of the Caribbean Sea. *Annals of Microbiology*, v. 59, n. 3, p. 409-414, 2009.
2. MORONES, J.R.; ELECHIGUERRA, J.L.; CAMACHO, A.; HOLT, K.; KOURI, J.B.; RAMIREZ, J.T.; YACAMAN, M.J.; The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, v. 16, n. 10, p. 2346, 2005.
3. SHAHVERDI, A.R.; FAKHIMI, A.; SHAHVERDI, H.R.; MINAIAN, S.; Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*, v. 3, n. 2, p. 168-171, 2007.

AVALIAÇÃO DE DIFERENTES RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS PARA A PRODUÇÃO DA CELULOSE BACTERIANA POR *GLUCONACETOBACTER HANSENII*

*L.M.F. GOTTSCHALK, I.R. BARBOSA, E.F. SOUZA, A.I.S. BRIGIDA, E.M. PENHA,
E.M.M. OLIVEIRA

Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ.

*leda.fortes@embrapa.br

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

Resumo

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 presente trabalho teve por objetivo avaliar diferentes resíduos agroindustriais brutos e suplementados na produção da CB por *G. hansenii* ATCC 23769. Inicialmente, foram avaliadas diferentes fontes de nitrogênio (extrato de levedura, milhocina, peptona, sulfato de amônio, nitrato de sódio e ureia) adicionadas ao meio sintético, mantendo uma mesma relação C/N de 15,5. Posteriormente, os resíduos agroindustriais POME (palm oil mill effluent) e suco de sisal foram avaliados isoladamente e em conjunto com a fonte de nitrogênio selecionada. Os experimentos foram conduzidos por 7 dias em fermentação estática a 30 °C e o pH inicial foi ajustado em 5,0. Os resultados obtidos mostraram que a melhor fonte orgânica para a produção da CB foi o extrato de levedura (0,405 g/L) seguido da milhocina (0,148 g/L). O suco de sisal apresentou melhores resultados quando comparado com o POME, com uma produção de 0,88 g/L com o sisal puro e de 2,13 g/L com o sisal suplementado com extrato de levedura.

Palavras-chave: Celulose; *Gluconacetobacter*; Resíduos

EVALUATION OF DIFFERENT AGROINDUSTRIAL WASTE FOR THE PRODUCTION OF BACTERIAL CELLULOSE BY *GLUCONACETOBACTER HANSENII*

Abstract

The cellulose produced by microorganisms, known as bacterial cellulose (BC) is a biopolymer derived from the fermentation of saccharides means of rich culture. This study aimed to evaluate different industrial residues and production of CB supplemented by *G. hansenii* ATCC 23769. Initially, different nitrogen sources were evaluated (yeast extract, corn steep liquor, peptone, ammonium sulfate, sodium

nitrate and urea) and added to synthetic medium, maintaining the same C/N ratio of 15.5. Subsequently, the organic residues POME (palm oil mill effluent) and sisal juice were evaluated alone and in conjunction with the nitrogen source selected. The experiments were conducted for 7 days in static 30°C and the initial fermentation pH was adjusted at 5.0. The results showed that the best organic source for the production of CB was yeast extract (0,405 g/L) followed by corn step liquor (0,148 g/L). The sisal juice had better results when compared with POME, with a production of 0.88 g/L with pure sisal and 2.13 g/L with sisal supplemented with yeast extract.

Keywords: Cellulose; *Gluconacetobacter*; Waste

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 (Keshk et al, 2006). Além dessa característica, a CB vem atraindo a atenção do meio científico e tecnológico pelo fato de não promover reações tóxicas ou imunológicas quando inseridas ou em contato com tecidos vivos, apresentar alta porosidade, elevado grau de polimerização, baixa densidade e alta capacidade de absorção e retenção de água. 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 (Ross et al., 1991). O primeiro uso da celulose bacteriana 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).

A biossíntese da CB está diretamente relacionada à capacidade de sobrevivência do microrganismo em condições não muito favoráveis. Ela o protege contra desidratação, serve de barreira, atua como fonte de carbono e energia e permite ao microrganismo permanecer em uma interface ar/líquido para obter oxigênio com maior facilidade para seu crescimento. (Berwanger et al, 2005; Donini et al, 2010). A espécie *Gluconacetobacter 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 (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 consequentemente 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.

Contudo, o custo de produção deste biopolímero ainda é caro comparado ao da celulose vegetal (El-Saied et al, 2008). 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 (Carreira et al, 2010). Por isso há grande interesse no uso de substratos alternativos de baixo custo como os resíduos agroindustriais (Berwanger et al, 2005).

A importância do desenvolvimento de tecnologias que revertam as fontes renováveis em matérias-primas para a elaboração de novos materiais vem aumentando cada vez mais, visto que além da ampliação do mercado, pela disponibilização e valorização destes, o desenvolvimento de novos usos de produtos agropecuários e de tecnologias que revertam o conceito de resíduo para de matéria-prima é imprescindível, a fim de otimizar a eficiência do agronegócio reduzindo, também, o impacto ambiental causado pelo descarte inadequado de resíduos agroindustriais (Rosa et al, 2011).

O POME é um resíduo rico em carbono obtido durante a produção do óleo de palma. Este é um líquido espesso e acastanhado que contém alto teor de sólidos, óleos e graxas, DQO e DBO (Rupani et al 2010). Na produção de artesanatos com fibras de sisal há o descarte do suco de sisal, material rico em açúcar. A planta do sisal é de origem mexicana, porém o Brasil é o principal produtor dessa fibra, cuja cadeia produtiva gera 80 milhões de divisas e meio milhão de empregos (Lima et al, 2013). Ambos

os resíduos apresentam possíveis aplicabilidades na produção de celulose bacteriana como substrato para bactérias do gênero *Gluconacetobacter*. O presente trabalho teve como objetivo avaliar estes dois resíduos na produção da celulose pela cepa *G. hansenii* ATCC 23769.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Produção da celulose

A cepa *G. hansenii* ATCC 23769, 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 (extrato de levedura, 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. Posteriormente a eficácia do POME e do sisal foi avaliada em diferentes concentrações (puro e 2%) com ou sem extrato de levedura e milhocina na concentração de 0,75%.

2.2 Purificação da celulose bacteriana

As películas obtidas na superfície dos meios de cultivos 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 1M a 80°C por 30min, e então lavadas com água deionizada várias vezes. Por fim, as películas foram lavadas 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

3.1 Avaliação de diferentes fontes de nitrogênio em meio sintético HS

Os resultados de produção de celulose, açúcares redutores final e consumido e o pH final com as diferentes fontes de nitrogênio (extrato de levedura, milhocina, peptona, sulfato de amônio, nitrato de sódio e ureia) estão apresentados na Tabela 1. A concentração de açúcar redutor inicial era de 20 g/L em todos os meios. Quando as fontes de nitrogênio foram avaliadas isoladamente, o YE resultou numa maior produção da celulose bacteriana (0,405 g/L) seguido da milhocina (0,148 g/L). As fontes de fácil assimilação como a peptona, o sulfato de amônio, o nitrato de sódio e a ureia quando utilizadas como única fonte de nitrogênio, não apresentaram nem produção de celulose, nem consumo de glicose e também nenhuma alteração de pH indicando que apesar da presença de glicose, a *Gluconacetobacter* não foi capaz de crescer nestas fontes.

Tabela 1. Produção de celulose, açúcar redutor e pH com diferentes fontes de nitrogênio em meio sintético modificado HS

Fonte de nitrogênio	Celulose (g/L)	Açúcar redutor final (g/L)	Açúcar redutor consumido (g/L)	pH
Extrato de levedura	0,405 ± 0,32	2,65	17,35	4,71
Milhocina	0,148 ± 0,24	4,18	15,82	3,33
Peptona	0	19,94	0,06	5,88
(NH ₄) ₂ SO ₄	0	20,38	0	5,80

Fonte de nitrogênio	Celulose (g/L)	Açúcar redutor final (g/L)	Açúcar redutor consumido (g/L)	pH
NaNO ₃	0	20,18	0	5,90
Ureia	0	20,13	0	5,92

3.2 Avaliação dos resíduos agroindustriais para a produção de CB

Os resultados de produção de celulose, açúcares redutores final e consumido e o pH final com os diferentes resíduos agroindustriais suplementados ou não com extrato de levedura e milhocina estão apresentados na Tabela 2.

A fonte de nitrogênio e de carbono utilizadas que proporcionaram maior produção de celulose bacteriana foi o suco de sisal suplementado com extrato de levedura ($2,133 \pm 0,52$ g/L), seguido do suco de sisal suplementado com milhocina ($1,650 \pm 0,36$). Quanto ao uso do POME como fonte de carbono, observou-se uma baixa produção de celulose bacteriana em todos os meios, com maior produção para o POME puro ($0,413 \pm 0,19$ g/L), não havendo grande diferença entre o uso de extrato de levedura e milhocina.

Tabela 2. Produção de celulose, açúcar redutor e pH com diferentes resíduos agroindustriais

Meio utilizado	Celulose (g/L)	Açúcar redutor final (g/L)	Açúcar redutor consumido (g/L)	pH
Sisal puro	0,879 $\pm$ 0,23	13.88	12.38	6.21
Sisal + EL	2,133 $\pm$ 0,52	12.25	17.94	6.82
Sisal + milhocina	1,650 $\pm$ 0,36	13.01	15.69	6.68
POME puro	0,413 $\pm$ 0,19	8.46	8.04	5.77
POME + EL	0,359 $\pm$ 0,13	8.4	7.93	5.83
POME + milhocina	0,336 $\pm$ 0,18	7.21	9.21	6.37

No suco de sisal a concentração inicial de açúcar redutor era de aproximadamente 25 g/L e pode-se observar que mesmo após 7 dias de fermentação, a bactéria só tinha consumido metade do açúcar inicialmente presente. O caso do POME que possuía uma concentração inicial de açúcar redutor de aproximadamente 16 g/L e também foi observado o mesmo comportamento. Em relação ao pH, pode-se observar um aumento quando o suco de sisal foi utilizado, comportamento diferente de quando a glicose (meio sintético HS) é utilizada, onde se observa uma diminuição do pH. Já com o POME, substrato bastante heterogêneo, a bactéria não cresceu muito e a membrana foi produzida em menor quantidade e apresentou-se bem mais frágil do que a membrana produzida com sisal. Desta forma, não foi observada alteração significativa no pH do meio fermentado.

4 CONCLUSÃO

A melhor fonte de nitrogênio foi o extrato de levedura e os resíduos agroindustriais utilizados demonstraram possibilidade de uso como substrato para produção de celulose bacteriana. No caso do sisal, a produção de CB pode ser incrementada quando uma fonte de nitrogênio orgânica, em especial o extrato de levedura, foi adicionada ao meio fermentativo. Em relação ao POME não foi observado nenhum aumento na produção da CB com adição de outras fontes de nitrogênio.

REFERÊNCIAS

BERWANGER, A.L.S. Produção e caracterização de biopolímero sintetizado por *Sphingomonas capsulata*. 2005. 96 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Rio Grande do Sul.

- CARREIRA, P.M.C. Produção de celulose bacteriana a partir de resíduos industriais. 2010. 72 p. Tese (Mestrado em Matérias Derivadas de Recursos Renováveis) – Universidade de Aveiro, Aveiro.
- 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.
- DONINI, Í.A.N.; DE SALVI, D.T.B.; FUKUMOTO, F.K.; LUSTRI, W.R.; BARUD, H.S.; MARCHETTO, R.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S.J.L. Biossíntese e recentes avanços na produção de celulose bacteriana. *Eclética Química*, v. 35, n. 4, p. 165-178, 2010.
- EL-SAIED, H.; EL-DIWANY, A.; BASTA, A. H.; ATWA, N. A.; EL-GHWAS, D. E. Production and characterization of economical bacterial cellulose. *BioResources*, v.3, n.4, p. 1196-1217, 2008.
- GALAS, E.; KRYSZYŃOWICZ, 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.
- 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.
- KLEMM, D.; SCHUMANN, D.; KRAMER, F.; HESSLER, N.; KOTH, D.; SULTANOVA, B. Nano-cellulose Materials - Different Cellulose, Different Functionality. *Macromolecular Symposia*, v. 280, p. 60-71, 2009.
- KRYSZYŃOWICZ, A.; CZAJA, W.; WIKTOROWSKA-JEZIERSKA, A.; M GONC ALVES-MISKIEWICZ, M TURKIEWICZ AND S BIELECKI. Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, v. 29, p. 189-195, 2002.
- LIMA, H. S. L.; NASCIMENTO, E.; BRÍGIDA, A. I.; ANDRADE, F. K.; ROSA, M. F.; BORGES, M. F. Produção de celulose bacteriana utilizando suco de sisal como substrato. In: VII Workshop de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio. 2013.
- 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.
- ROSA, M. F.; SOUZA FILHO, M. S. M.; FIGUEIREDO, M. C. B.; MORAIS, J. P. S.; SANTAELLA, S.T.; LEITÃO, R.C. Valorização de resíduos da agroindústria. In: II Simpósio Internacional sobre gerenciamento de resíduos agropecuários e agroindustriais, 2011, Foz do Iguaçu. Anais. Foz do Iguaçu: Sbera, 2011, p. 98-105.
- ROSS, P.; MAYER, R.; BENZIMAN, M. Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiol Rev.*, v. 55, n. 1, p. 35-58, 1991.
- RUPANI, P. F.; SINGH, R. P.; IBRAHIM, M. H.; ESA, N. Review of Current Palm Oil Mill Effluent (POME) Treatment Methods: Vermicomposting as a Sustainable Practice. *World Applied Sciences Journal*, v. 11, n. 1, p. 70-81, 2010.