

PRODUÇÃO DE SUCCINOGLUCANA POR *AGROBACTERIUM RADIOBACTER* NBRC 12665 UTILIZANDO DIFERENTES SUBSTRATOS

Kamila Byanca Baldin Wessel (PIBIC/Fundação Araucária/Uem), Suelen Pereira Ruiz, Graciette Matioli (Coorientadora) Cristiane Moriwaki (Orientadora), e-mail: cmoriwaki@uem.br

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências da Saúde / Departamento de Farmácia / Maringá, PR.

Ciência e Tecnologia de Alimentos, Ciência de Alimentos

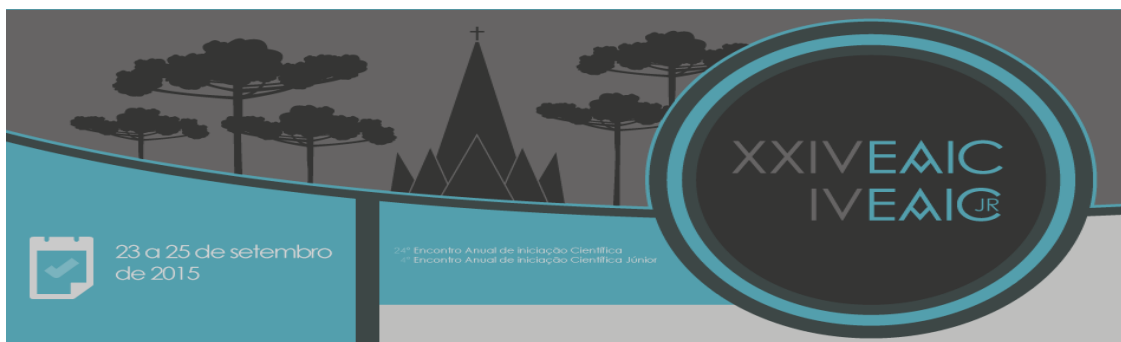
Palavras-chave: succinoglucana, biopolímero, imobilização.

Resumo:

Os exopolissacarídeos microbianos têm sido extensivamente utilizados na indústria alimentícia, devido ao seu forte impacto nas propriedades reológicas dos alimentos. A succinoglucana é um heteropolissacarídeo produzido por *Agrobacterium radiobacter* e apresenta amplo potencial de aplicação. Recursos para melhorar a produção de succinoglucana, como a imobilização de bactérias e o uso de substratos abundantes e de baixo custo, são interessantes. Assim, o objetivo desta pesquisa foi produzir succinoglucana em diferentes substratos utilizando células de *Agrobacterium radiobacter* NBRC 12665 livres e imobilizadas em esponja vegetal. Considerando que as gomas obtidas por processos microbiológicos vêm se destacando no mercado mundial, e importância do uso de materiais oriundos de fontes renováveis, espera-se com esta pesquisa colaborar com a substituição dos polímeros sintéticos pelos biopolímeros naturais.

Introdução

Os polissacarídeos estão sendo amplamente empregados na indústria de alimentos, como espessantes, estabilizantes, emulsificantes, coagulantes, formadores de filmes, gelificantes, mimetizadores de gordura, agentes de suspensão e dispersantes. Os exopolissacarídeos (EPSs) são polímeros excretados para o meio extracelular dos micro-organismos, o que faz com que sejam facilmente recuperados, e possuam propriedades físicas, estruturais e químicas bem homogêneas. O *Agrobacterium radiobacter* produz EPSs como a succinoglucana, que é uma β -glucana utilizada industrialmente (CALLIARI et al., 2011). As succinoglucanas são heteropolissacarídeos



ácidos compostos por unidades repetidas de octassacarídeos, de monômeros de galactose e glicose numa proporção molar 1:7. Apresentam estabilidade sob condições operacionais drásticas, como alta temperatura e pressão, pH extremo e altas taxas de cisalhamento (SIMSEK et al., 2009). A imobilização de células possui vantagens no processo de fermentação, como o uso repetido e prolongado das células, menor contaminação, fermentação contínua e facilidade de separação das células (JAMUNA e RAMAKRISHNA, 1992). O uso de matrizes como a esponja vegetal *Luffa cylindrica*, resistente às condições de operação e de baixo custo, assegura que a imobilização seja realizada com simplicidade, estabilidade e com um menor custo de produção (OGBONNA et al., 1996).

Considerando a importância do EPS succinoglucana e suas inúmeras aplicações industriais, a presente pesquisa teve por objetivo imobilizar a bactéria *Agrobacterium radiobacter* NBRC 12665 em esponja vegetal e avaliar diferentes fontes de carbono para a produção de succinoglucana.

Materiais e métodos

Micro-organismo e condições de cultivo

A linhagem bacteriana *Agrobacterium radiobacter* NBRC 12665 foi adquirida liofilizada do Nite Biological Resource Center (NBRC, Japão). A reativação do micro-organismo foi realizada com o meio de cultura (g/L): polipeptona (10), extrato de levedura (2), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (1). Após incubação a 30°C por 48 h em meio sólido, as colônias formadas foram liofilizadas. Para a nova reativação, 30 mg da bactéria foi incubada a 30°C e 180 rpm por 48 h.

Preparação da esponja vegetal para a imobilização

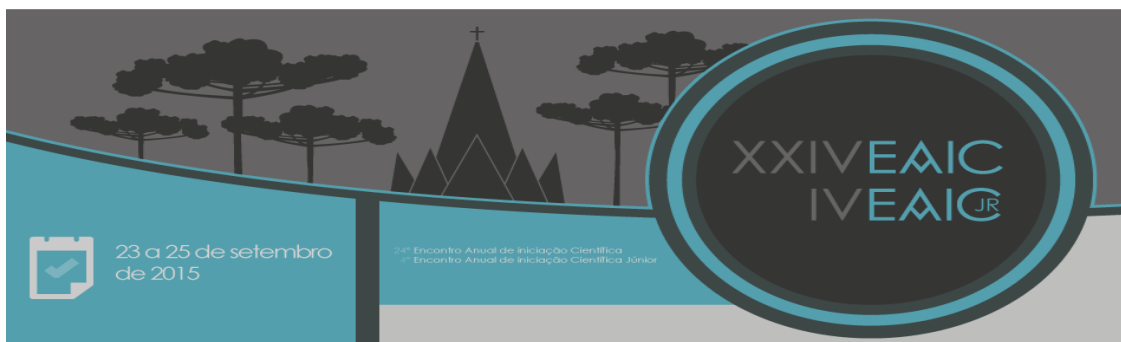
A esponja foi cortada em discos de cerca de 20-25 mm de diâmetro e 2-4 mm de espessura, que foram imersos em água fervente por 30 min, lavados com água de torneira e deixados por 24 h em água destilada, secos em estufa a 70°C e autoclavados a 121°C por 20 min.

Procedimento de imobilização

No processo de imobilização por adsorção em esponja vegetal foram adicionados 3 discos de esponja vegetal aos frascos contendo as células reativadas. Os frascos foram mantidos a 30°C e 180 rpm durante 72 h.

Produção e recuperação da succinoglucana

Os discos de esponja vegetal com o micro-organismo imobilizado foram transferidos para meios de produção contendo 100 mL do meio líquido (g/L): sacarose (100), KH_2PO_4 (1), $MgSO_4$ (0,25), $(NH_4)_2PO_4$ (1) e elementos traços (10 mL). A recuperação iniciou com a centrifugação do meio de



produção e remoção do precipitado. Ao sobrenadante foi adicionado etanol para precipitar o polissacarídeo, que foi recuperado por centrifugação.

Otimização da produção de succinoglucana em diferentes substratos

O meio padrão de produção do polímero utiliza a fonte de carbono sacarose. Neste trabalho foram avaliados os substratos glicose, lactose e melão de cana-de-açúcar como alternativas.

Resultados e Discussão

Avaliação da viabilidade do micro-organismo e liofilização das células

O micro-organismo foi inoculado e incubado conforme descrito na metodologia e foi verificado o crescimento da bactéria. Colônias do micro-organismo foram suspensas em solução salina 0,9% (p/V) e liofilizadas. Novamente foi avaliada a viabilidade da bactéria e constatado que o processo de liofilização não interferiu na sua capacidade de produção.

*Imobilização do *Agrobacterium radiobacter* NBRC 12665*

As esponjas vegetais, provenientes do fruto seco de *Luffa cylindrica*, foram devidamente tratadas. Após a reativação das células foi realizada a imobilização conforme já descrito na metodologia. Foi observado que a imobilização mostrou-se eficaz uma vez que houve aderência das células à esponja.

Produção e recuperação do polissacarídeo

Após o processo de imobilização, os discos de esponja vegetal com o micro-organismo imobilizado foram transferidos para meios de produção. Foi avaliada a produção e recuperação do EPS no seu substrato padrão, a sacarose, pelas células livres e pelas células imobilizadas. As células foram incubadas por um período de 10 dias, a 30°C sob agitação de 180 rpm, e de acordo com a Figura 1A, observa-se que o tempo de batelada que deveria ser usado para a máxima produção é de 8 dias, pois a partir deste momento a produção estabiliza-se. Para as células imobilizadas o rendimento foi de 5,25 g/L, já para as células livres de 4,05 g/L.

Produção do biopolímero em diferentes substratos

Para a produção de succinoglucana por células livres e imobilizadas foram utilizados como substratos sacarose, glicose, lactose e melão da cana de açúcar. Na Figura 1B observa-se que houve produção de succinoglucana em todos os substratos testados e a produção por células imobilizadas foi maior que a de células livres. O substrato onde foi notado maior rendimento foi o de melão de cana-de-açúcar, para ambas as formas de produção das células.

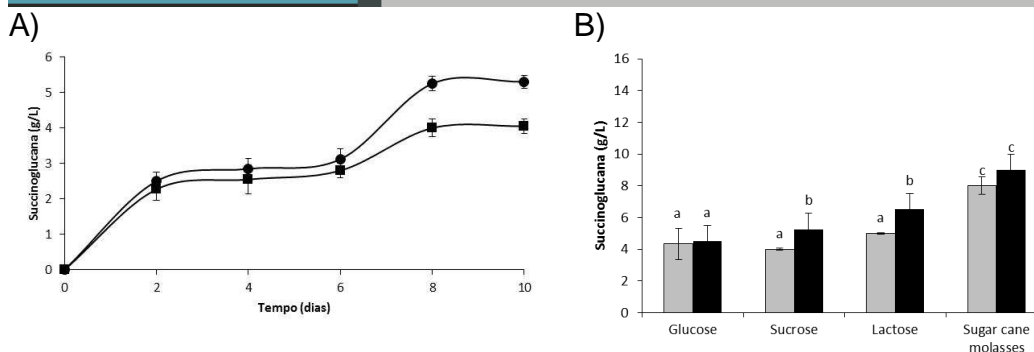
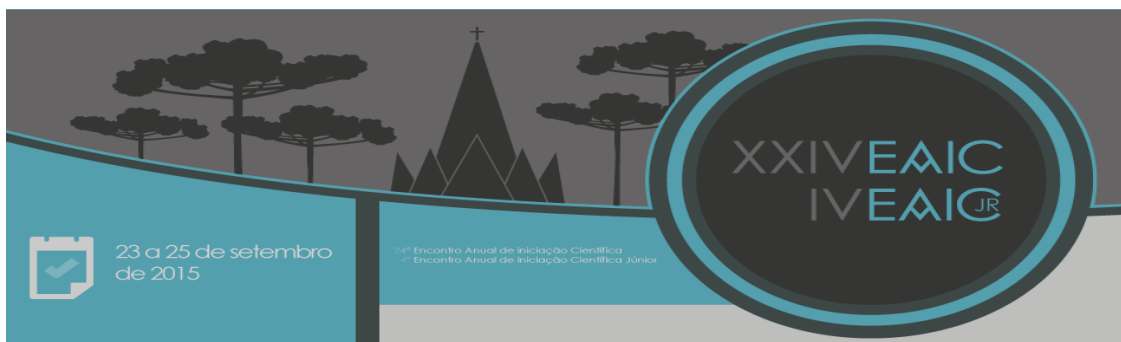


Figura 1 – Produção de succinoglicana por *Agrobacterium radiobacter*. A) com células livres (■) e imobilizadas (●) e substrato sacarose. B) com células livres (□) e imobilizadas (■) com diferentes fontes de carbono e 8 dias de incubação.

Conclusões

A técnica de imobilização de *Agrobacterium radiobacter* apresentou-se eficaz, uma vez que aumentou a produção de succinoglicana. Oito dias de fermentação foram suficientes para a sua produção. Dentre os substratos testados, o melão de cana de açúcar apresentou maior produção do exopolissacarídeo.

Agradecimentos

À Cristiane Moriwaki pela orientação e interesse. À profa. Graciete Matioli pela coorientação e incentivo. À doutoranda Suelen Ruiz pela colaboração para a execução do projeto. À Fundação Araucária pela concessão da bolsa.

Referências

- CALLIARI, C.M.; MAGNANI, M.; GÓMEZ, R.J.H.C. Produção, caracterização e propriedades tecnológicas de um biopolímero produzido por *Agrobacterium radiobacter* k84. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, p. 633-644, 2011.
- JAMUNA, R.; RAMAKRISHNA, S.V. Continuous synthesis of thermostable alpha-amylase by bacillus cells immobilized in calcium alginate. **Enzyme and Microbial Technology**, v.14, p. 36-41,1992.
- OGBONNA, J.C.; TOMIYAMA, S.; TANAKA, H. Development of a method for immobilization of non-flocculating cells in loofa (*Luffa cylindrica*) sponge. **Process Biochemistry**, v. 31, p. 737-744, 1996.
- SIMSEK, S.; MERT, B.; CAMPANELLA, O.H.; REUHS, B. Chemical and rheological properties of bacterial succinoglycan with distinct structural characteristics. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, p. 320-324, 2009.