

PRODUÇÃO DE SUCCINOGLUCANA A PARTIR DE AGROBACTERIUM RADIOBACTER NBRC 12665 UTILIZANDO COMO FONTE DE CARBONO SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS

Júlia Kaori Uguma Mizuta (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Tielees Carina de Oliveira Delani (coautora), Gislaine Franco de Moura Costa (Coorientadora), Graciette Mاتيoli (Orientadora), e-mail: gmatioli@uem.br.

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

Ciências da saúde / Farmácia

Palavras-chave: Succinoglucana, soro de leite em pó, *Rhizobium radiobacter* ATCC 4720.

Resumo:

A succinoglucana é um exopolissacarídeo sintetizado comumente por bactérias do solo. De acordo com os substratos e as espécies bacterianas utilizadas no processo fermentativo, as propriedades espessantes da succinoglucana podem ser diferentes e até mesmo melhoradas. Assim, o objetivo do presente projeto foi avaliar a produção de succinoglucana a partir de *Agrobacterium radiobacter* NBRC 12665 utilizando um substrato alternativo, o soro de leite em pó, como fonte de carbono. O microrganismo sugerido na pesquisa apresentou alterações significativas de produção de succinoglucana e foi substituído por uma nova cepa *Rhizobium radiobacter* ATCC 4720. Os ensaios foram desenvolvidos avaliando a influência da concentração do substrato (5%, 7,5% e 10%) num tempo de cultivo de 14 dias. O melhor resultado alcançado nesse ensaio foi encontrada na concentração de 10% de soro de leite em pó, o que acarretou uma produção média de succinoglucana de $13,45 \pm 0,8$ g/L no sexto dia. A partir desse dia a produção passou a cair gradativamente. Com os resultados obtidos pôde verificar que o soro de leite em pó é um substrato útil e vantajoso para a produção de succinoglucana, pois além de ser de baixo custo é altamente nutritivo.

Introdução

A succinoglucana é um exopolissacarídeo ácido, solúvel em água e foi isolada por meio de microrganismo de solo chamado de *Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes*. Outras espécies podem produzir a succinoglucana como *Agrobacterium tumefaciens*, *A. radiobacter*, *Rhizobium meliloti*, e algumas espécies de *Pseudomonas spp.* (BAKHTIYARI; MOOSAVI-NASAB; ASKARI, 2015; RUIZ et al., 2015). Quimicamente é composta por resíduos de galactose e glicose, unidos por ligações do tipo β numa proporção molar

de 1:7, e apresentando alguns substituintes não-carboidratos como piruvato, succinato e acetato. A succinoglucana possui propriedades reológicas similares às da xantana, sendo mais estável à temperatura, aos pHs ácidos e básicos e às condições salinas (AMEMURA; MOORI; HARADA, 1974; HALDER; BANERJEE; BANDOPADHYAY, 2017).

Devido ao alto custo das fontes de carbono, a produção de succinoglucana é limitada. Como uma alternativa, materiais agroindustriais podem ser utilizados como fontes de carbono de baixo custo para a produção de exopolissacarídeos, como para a produção de xantana, curdlana e succinoglucana (RUIZ, 2015). Várias fontes alternativas de carbono têm sido sugeridas nos últimos anos, tais como melaço de cana de açúcar, resíduos da indústria de soja, resíduos de malte da fabricação de cerveja, soro de leite, entre outros (ANDHARE et al., 2017; BAKHTIYARI; MOOSAVI-NASAB; ASKARI, 2015; RUIZ et al., 2015). Assim, a presente pesquisa teve como objetivo avaliar a produção de succinoglucana a partir de um substrato alternativo como fonte de carbono, o soro de leite em pó, e microrganismo adquirido da Fundação André Tosello (Coleção de culturas tropical – Campinas, SP).

Materiais e métodos

Microrganismo

O microrganismo, a princípio sugerido na pesquisa, apresentou alterações significativas, tornando-se necessário a troca por uma nova cepa bacteriana. Assim, foi adquirida da Fundação André Tosello (Coleção de culturas tropical – Campinas, SP) uma nova cepa produtora deste exopolissacarídeo, o *Rhizobium radiobacter* ATCC 4720, a qual passou a ser utilizada nos experimentos deste projeto. O soro do leite em pó foi doado pela empresa Alibra (Campinas, São Paulo, Brasil). Todos os produtos químicos utilizados no estudo foram de grau analítico. O teor de carboidratos no soro de leite foi determinado pela empresa fornecedora Alibra e a quantidade de lactose presente foi de aproximadamente 75%.

*Reativação e liofilização do *Rhizobium radiobacter* ATCC 4720*

A linhagem bacteriana foi reativada em meio de crescimento (MC), segundo as especificações do fornecedor e de acordo com a seguinte formulação: extrato de carne 3 g/L e polipeptona 5 g/L em pH 7,0. Após reativação, o microrganismo foi semeado em meio de crescimento sólido a fim de isolar culturas puras. Após cultivo, a 30 °C por 24 h foram coletadas 5 colônias isoladas e as mesmas foram transferidas para um tubo de ensaio contendo 5 mL do meio de crescimento e cultivada por mais 24 h a 30 °C. O conteúdo do tubo foi transferido para erlenmeyer contendo 50 mL de meio de crescimento e este ficou incubado por 24 h com agitação a 180 rpm. Uma alíquota de 100 µL deste meio foi inoculado em placas de petri, e incubados por 24 h a 30 °C. Após o crescimento, os microrganismos foram retirados das placas, transferidas para um meio salina 0,9%, congeladas e liofilizadas.

A células foram mantidas congeladas e posteriormente utilizadas nos ensaios de produção.

Produção da succinoglucana por Rhizobium radiobacter ATCC 4720

Esse protocolo foi desenvolvido segundo a metodologia de Ruiz et al. (2015), com modificações. A produção succinoglucana foi realizada utilizando 30 mg do microrganismo liofilizado em 100 mL de meio pré-inóculo, formulado da seguinte forma (g/L): extrato de carne (3) e peptona (5) em frasco erlenmeyer de 250 mL, o qual ficou por 24 h em meio de crescimento, à 30 °C e 180 rpm para sua reativação. Após a incubação, o meio foi centrifugado e as células foram transferidas para frascos erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio de produção, formulado como segue e variando a quantidade de fonte de carbono: soro de leite em pó (5%, 7,5% e 10%), KH_2PO_4 (1 g/L), MgSO_4 (0,25 g/L) em pH 7,0.

Otimização da produção da succinoglucana por Rhizobium radiobacter ATCC 4720

Neste estudo foi avaliado a influência da concentração do substrato (fonte de carbono – soro de leite em pó) na produção da succinoglucana. Os ensaios foram conduzidos conforme descrito no item acima de produção de succinoglucana, durante 14 dias consecutivos de cultivo. As concentrações de substrato avaliadas foram: 5%, 7,5% e 10%.

Resultados e Discussão

Como citado acima, o microrganismo sugerido na pesquisa apresentou alterações significativas na produção de succinoglucana e foi substituído nova cepa bacteriana adquirida da Fundação André Tosello (Coleção de culturas tropical – Campinas, SP), o *Rhizobium radiobacter* ATCC 4720, a qual passou a ser utilizada nos experimentos deste projeto.

O aumento da quantidade de soro de leite em pó utilizada no meio de fermentação proporcionou uma maior produção de succinoglucana. As quantidades produzidas variaram de acordo com a concentração da fonte de carbono, entretanto, no sexto dia todas as amostras atingiram o pico máximo de produção, seguido de decaimento. A Fig. 1 apresenta a produção nas diferentes concentrações de substrato soro de leite em pó, durante 14 dias consecutivos de cultivo.

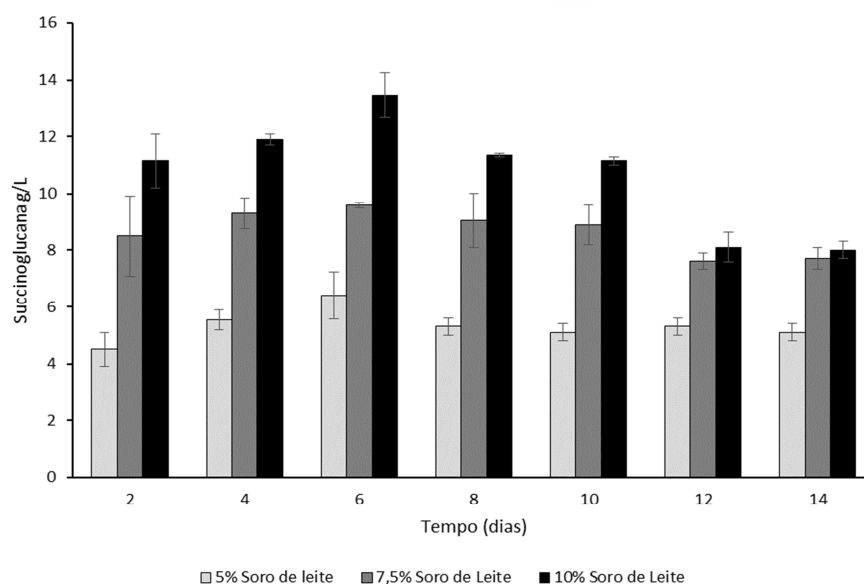


Figura 1 – Produção contínua de Succinoglucana por *Rhizobium radiobacter* ATCC 4720 a partir de soro de leite.

A maior produção obtida neste ensaio foi encontrada na concentração de 10% em soro de Leite em pó alcançando uma média de succinoglucana $13,45 \pm 0,8$ g/L no sexto dia. A produção do exopolissacarídeo até o tempo de sexto dia proporcionou um ganho de dois dias na etapa produtiva, fato importante para redução de custos de produção para um escalonamento industrial.

Pode-se observar que após o sexto dia do experimento também houve um decaimento gradativo. Este comportamento provavelmente ocorreu devido à exaustão do substrato utilizado como fonte de energia para ao microrganismo.

Conclusões

Apesar da succinoglucana ser pouco explorada quando comparada a outros exopolissacarídeos como a xantana, alguns pesquisadores têm obtido resultados positivos e animadores. Além disso, a partir dos resultados pôde-se verificar que o soro de leite em pó é um substrato útil e vantajoso para a produção de succinoglucana, pois, além de ser de baixo custo, é altamente nutritivo por conter em sua composição componentes que contribuem para o processo fermentativo, como proteínas, gorduras e sais minerais.

Agradecimentos

À professora Graciette Matioli pela orientação e incentivo. À professora Gislaine Franco de Moura Costa pela coorientação. À doutoranda Tielees Carina de Oliveira Delani pelo incentivo e colaboração para a execução do projeto. Ao CNPq pela concessão da bolsa.

Referências

AMEMURA, A.; MOORI, K.; HARADA, T. Purification and properties of a specific, inducible beta-glucanase, succinoglycan depolymerase from flavobacterium. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 334, p. 398–409, 1974.

ANDHARE, P. et al. Characterization and rheological behaviour analysis of the succinoglycan produced by Rhizobium radiobacter strain CAS from curd sample. **Food Hydrocolloids**, v. 64, p. 1–8, 2017.

BAKHTIYARI, M.; MOOSAVI-NASAB, M.; ASKARI, H. Optimization of succinoglycan hydrocolloid production by agrobacterium radiobacter grown in sugar beet molasses and investigation of its physicochemical characteristics. **Food Hydrocolloids**, v. 45, p. 18–29, 2015.

RUIZ, S. P. et al. Biosynthesis of succinoglycan by Agrobacterium radiobacter NBRC 12665 immobilized on loofa sponge and cultivated in sugar cane molasses. Structural and rheological characterization of biopolymer. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 122, p. 15–28, 2015.