

PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS BACTERIANOS EM DIFERENTES FONTES DE CARBONO

R. A. TRINDADE¹, A. P. MUNHOZ¹ e C. A. V. BURKERT¹

¹ Universidade Federal do Rio Grande, Escola de Química e Alimentos
E-mail para contato: rtrindade@furg.br

RESUMO – O objetivo do trabalho foi testar a sacarose (S), mistura de sacarose e glicerol residual (SGR) (1:1 m/m) e glicerol residual (GR) como fonte de carbono na produção de diferentes exopolissacarídeos (EPSs) bacterianos. Os cultivos foram realizados em frascos agitados (28°C/200 rpm). A bactéria *Xanthomonas campestris* apresentou concentração de EPSs em GR igual ou superior aos valores encontrados com S, de aproximadamente 4 g.L⁻¹. *Pseudomonas oleovorans* apresentou concentração também em torno de 4 g.L⁻¹ em SGR e GR, sendo a concentração encontrada em S (0,8 g.L⁻¹) inferior aos demais. *Sphingomonas capsulata* apresentou uma maior concentração em S e SGR em torno de 3,4 g.L⁻¹, sendo que em GR este valor caiu para 1,7 g.L⁻¹. Já *Zymomonas mobilis* apresentou um melhor resultado em meio SGR (1,3 g.L⁻¹), sendo que em S e GR estes valores caíram para 0,2 e 0,7 g.L⁻¹, respectivamente. Desta forma, pode-se concluir que a glicerina residual pode ser considerada uma alternativa em substituição à sacarose na produção de EPSs bacterianos.

1. INTRODUÇÃO

O petróleo é a principal fonte de energia no mundo, mas por se tratar de um combustível de origem fóssil, e com expectativa de diminuição das suas reservas no futuro próximo, pesquisas vêm sendo realizadas com o objetivo de desenvolver fontes de energia renováveis (Silva *et al.*, 2009). Uma alternativa é a utilização de biocombustíveis, como por exemplo, o biodiesel (Mota *et al.*, 2009), cujo processo de produção gera cerca de 10% de glicerol (Abad; Turon, 2012). Os biocombustíveis podem ser definidos como combustíveis produzidos a partir de biomassas agrícolas, portanto renováveis, pois reduzem a emissão de gases de efeito estufa em função da absorção do gás carbônico atmosférico que ocorre na produção da biomassa (Bonomi *et al.*, 2006).

Por outro lado, um alto potencial de aplicação nos mais diversos segmentos industriais tem surgido para biopolímeros microbianos, também chamados de exopolissacarídeos (EPSs), os quais são secretados pelas células, sendo produzidos por diferentes bactérias e usados em produtos alimentícios, farmacêuticos, químicos, entre outros (Luvielmo; Scamparini, 2009; Freitas *et al.*, 2011; Prasanna *et al.*, 2012). Os açúcares constituem as fontes de carbono mais comumente utilizadas para a produção de EPSs bacterianos. No entanto, substratos de baixo custo, tais como resíduos industriais, têm demonstrado serem adequados para a produção desses EPSs (Freitas *et al.*, 2011). Sendo assim, torna-se importante investigar o uso do glicerol residual como fonte de carbono em cultivos para produção de EPSs, de forma a permitir o aproveitamento do excedente gerado na produção do biodiesel, contribuindo assim para o desenvolvimento sustentável da cadeia produtiva do biodiesel,

além de diminuir custos do processo por aproveitar um coproduto de baixo custo e grande disponibilidade.

O presente trabalho propõe verificar a possibilidade de substituir total ou parcialmente a sacarose utilizada na produção de diferentes EPSs bacterianos, por glicerol residual.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Micro-organismo

A bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* IBSBF 1230 foi obtida da Coleção de Culturas de Fitobactérias do Instituto Biológico (IBSBF) – Campinas – SP, Brasil. As demais bactérias, *Pseudomonas oleovorans* NRRL B-14683, *Sphingomonas capsulata* NRRL B-4261 e *Zymomonas mobilis* subspécies *mobilis* NRRL B-4286, foram obtidas da ARS Culture Collection, Bacterial Foodborne Pathogens and Mycology Research Unit – National Center for Agricultural Utilization Research – Peoria, Estados Unidos.

2.2. Glicerol Residual

O glicerol residual proveniente da obtenção de biodiesel a partir do óleo de soja por via metanólica foi fornecido pela empresa BS Bios Indústria e Comércio de Biodiesel Sul Brasil S/A (Passo Fundo - RS). O glicerol residual continha 81,92% (m/m) de pureza, de acordo com laudo fornecido pela própria empresa, sendo que a quantidade adicionada nos meios levou em conta sua composição, a fim de resultar na concentração desejada do substrato (glicerol) nos meios de cultivo.

2.3 Re-hidratação das Culturas Liofilizadas

As culturas acondicionadas em ampolas de vidro foram rompidas em condições estéreis. Na ampola que continha a bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* IBSBF 1230 foram adicionadas 5 gotas do Caldo Nutriente, sendo após incubada a 28°C durante 60 min. Transcorrido esse tempo, a suspensão foi transferida para placas de Petri contendo Ágar Nutriente (5 g.L⁻¹ peptona; 6 g.L⁻¹ NaCl; 1,5 g.L⁻¹ extrato de carne; 1,5 g.L⁻¹ extrato de levedura; 15 g.L⁻¹ ágar) e incubadas a 28°C por 48 h (IBSBF, 2013). Para as bactérias *Pseudomonas oleovorans* NRRL B-14683 e *Sphingomonas capsulata* NRRL B-4261 foi realizado o mesmo procedimento, sendo utilizado o meio TGY (5 g.L⁻¹ triptona; 5 g.L⁻¹ extrato de levedura; 1 g.L⁻¹ glicose; 1 g.L⁻¹ K₂HPO₄; 10 g.L⁻¹ ágar). Já para a bactéria *Zymomonas mobilis* NRRL B-4286 o meio utilizado para a reativação foi o YP (20 g.L⁻¹ peptona; 10 g.L⁻¹ extrato de levedura; 20 g.L⁻¹ glicose; 20 g.L⁻¹ ágar).

2.4 Manutenção das Culturas Microbianas

A partir das culturas re-hidratadas foram realizados repiques sucessivos, sendo utilizado para *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* 1230 o meio YM (3 g.L⁻¹ extrato de levedura; 3 g.L⁻¹ extrato de malte; 5 g.L⁻¹ peptona; 20 g.L⁻¹ glicose; 10 g.L⁻¹ ágar), pH 7,2 (MESOMO, 2007). Para as bactérias *Pseudomonas oleovorans* NRRL B-14683 e *Sphingomonas*

capsulata NRRL B-4261 foi utilizado o meio contendo: 20 g.L⁻¹ glicose; 5 g.L⁻¹ peptona; 3 g.L⁻¹ extrato de levedura; 5 g.L⁻¹ cloreto de sódio; 20 g.L⁻¹ ágar; água destilada q.s.p., pH 6,8-7,0 (Bajaj *et al.*, 2006). Já para a bactéria *Zymomonas mobilis* NRRL B-4286 o meio utilizado continha: 20 g.L⁻¹ sacarose; 2,5 g.L⁻¹ extrato de levedura; 1 g.L⁻¹ KH₂PO₄; 1 g.L⁻¹ (NH₄)₂SO₄; 0,5 g.L⁻¹ MgSO₄.(7H₂O); 20 g.L⁻¹ ágar (Oliveira *et al.*, 2007).

Todas as bactérias foram incubadas para crescimento celular em estufa com temperatura controlada (28 °C) por 48 h. As cepas foram mantidas refrigeradas, sendo realizados repiques mensais.

2.5 Preparo do Inóculo

O inóculo foi preparado partindo de um tubo contendo a cultura microbiana reativada, sendo raspada com 10 mL de água peptonada 0,1 %, a fim de resultar em uma suspensão de células. Esta foi transferida para 90 mL de meio apropriado contido em frasco Erlenmeyer de 500 mL. Os frascos foram mantidos em incubadora refrigerada com agitação orbital (Tecnal TE - 424, Brasil) a 28 °C e 150 rpm, até atingir uma densidade ótica (DO 560 nm) estabelecida (1,9 - 2,1).

2.6 Cultivos em Frascos Agitados

Foram realizados cultivos em frascos Erlenmeyer de 500 mL. Suspensão microbiana correspondente a 10 % do volume total (10 mL), foi transferida para 90 mL de meio de cultivo, a fim de totalizar 100 mL de meio. Os frascos foram mantidos em incubadora refrigerada com agitação orbital (Tecnal TE-424, Brasil), na temperatura de 28 °C e 200 rpm de agitação.

Nesta etapa, foram utilizados meios de produção específicos para cada micro-organismo, conforme descrito na Tabela 1. Como fontes de carbono foram testadas a sacarose (S), o glicerol residual (GR), considerando sua composição a fim de resultar na concentração desejada do substrato, e uma mistura de ambos na proporção de 1:1 (m/m), totalizando a concentração indicada (SGR), como sugerido por Reis *et al.* (2010), já que a sacarose é a fonte de carbono usual na produção dos EPSs estudados.

Para determinação dos EPSs, os cultivos foram conduzidos por 48 h, sendo que todo o conteúdo dos frascos (100 mL) foi centrifugado sob refrigeração, para determinações analíticas no sobrenadante (concentrações de EPSs) e no sedimento (biomassa), conforme métodos descritos no item 2.7. Todos os cultivos foram realizados em triplicata. Os resultados foram analisados por análise de variância e teste de Tukey (Montgomery, 2004), a fim de verificar a existência de diferenças significativas entre os meios estudados para um mesmo micro-organismo, a 95% de confiança ($p \leq 0,05$).

Tabela 1 - Composição dos meios de produção de EPSs

Micro-organismo	Composição do meio (g.L ⁻¹)*	Referência
<i>Xanthomonas campestris</i>	50 fonte de carbono; 2,5 NH ₄ H ₂ PO ₄ ; 5,0 K ₂ HPO ₄ ; 0,006 H ₃ BO ₃ ; 2 (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 0,0024 FeCl ₃ ; 0,002 CaCl ₂ .2H ₂ O; 0,002 ZnSO ₄ ; pH 7,0.	Reis <i>et al.</i> (2010)
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	25 fonte de carbono; 3,3 (NH ₄) ₂ HPO ₄ ; 5,8 K ₂ HPO ₄ ; 3,7 KH ₂ PO ₄ ; 10 mL de solução de MgSO ₄ 100 mM; 1 mL de solução de micronutrientes**; pH 7,0.	Freitas <i>et al.</i> (2010)
<i>Sphingomonas capsulata</i>	20 fonte de carbono; 10 Na ₂ HPO ₄ ; 1 K ₂ SO ₄ ; 1 NaCl; 0,15 (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 0,2 MgSO ₄ .7H ₂ O; 0,01 CaCl ₂ .2H ₂ O; 0,001 FeSO ₄ .7H ₂ O; 0,5 extrato de levedura; pH 6,8-7,0.	Bajaj <i>et al.</i> (2006)
<i>Zymomonas mobilis</i>	20 fonte de carbono; 2,5 extrato de levedura; 1 KH ₂ PO ₄ ; 1 (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 0,5 MgSO ₄ .7H ₂ O; pH 7,0.	Oliveira <i>et al.</i> (2007)

* Como fontes de carbono foram usadas sacarose, glicerina residual e a mistura de ambos na mesma proporção mássica (1:1), resultando na concentração indicada.

**Solução de micronutrientes (em g.L⁻¹ de HCl 1N): 2,78 FeSO₄.7H₂O; 1,98 MnCl₂.4H₂O; 2,81 CoSO₄.7H₂O; 1,67 CaCl₂.2H₂O; 0,17 CuCl₂.2H₂O; 0,29 ZnSO₄.7H₂O.

2.7 Determinação da Biomassa e Concentração dos EPSs

A recuperação dos EPSs do meio de cultivo foi realizada através da centrifugação do meio a 3400 g por 30 min a 4°C, para remoção de células, seguido de precipitação do EPS pela adição de etanol 96,4 °GL (1:4 v/v), repouso por 24 h a 4°C, sendo novamente centrifugado por 30 min, sob refrigeração (4°C). A concentração dos EPSs foi determinada por gravimetria, secando em estufa a 50°C até peso constante, relacionando ao volume de amostra (Mesomo, 2007).

O crescimento celular foi monitorado por medida da absorvância a 560 nm, baseado no procedimento descrito por Prieto *et al.* (2008). A concentração de biomassa foi expressa em peso seco (g.L⁻¹), obtido a partir de uma curva de calibração previamente determinada para cada micro-organismo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Biomassa e EPS Utilizando Diferentes Fontes de Carbono

A Tabela 2 apresenta os resultados referentes à produção de EPSs e biomassa em 48h pelas bactérias *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* IBSBF 1230, *Pseudomonas oleovorans* NRRL B-14683, *Sphingomonas capsulata* NRRL B-4261 e *Zymomonas mobilis* NRRL B-4286.

Tabela 2 - Resultados da produção de EPS e biomassa em 48h de cultivo.

EPS (g.L ⁻¹)				
	<i>X. campestris</i>	<i>P. oleovorans</i>	<i>S. capsulata</i>	<i>Z. mobilis</i>
S	4,55 ± 0,37 ^{a,b}	0,84 ± 0,05 ^b	3,44 ± 0,22 ^a	0,27 ± 0,03 ^c
SGR	4,07 ± 0,14 ^b	4,11 ± 0,13 ^a	3,51 ± 0,14 ^a	1,42 ± 0,16 ^a
GR	4,98 ± 0,36 ^a	3,99 ± 0,20 ^a	1,87 ± 0,19 ^b	0,77 ± 0,09 ^b
Biomassa (g.L ⁻¹)				
	<i>X. campestris</i>	<i>P. oleovorans</i>	<i>S. capsulata</i>	<i>Z. mobilis</i>
S	0,15 ± 0,01 ^b	4,06 ± 0,04 ^b	0,87 ± 0,05 ^a	0,83 ± 0,02 ^a
SGR	0,19 ± 0,01 ^a	3,99 ± 0,05 ^b	0,86 ± 0,01 ^a	0,68 ± 0,01 ^b
GR	0,16 ± 0,01 ^b	4,30 ± 0,04 ^a	0,86 ± 0,02 ^a	0,22 ± 0,01 ^c

*Letras minúsculas diferentes indicam que há diferença significativa para as duas respostas ($p < 0,05$).

Pode-se observar que foi encontrada uma produção de EPS de 4,98 g.L⁻¹ para a bactéria *X. campestris* quando GR foi utilizado como fonte de carbono, não diferindo significativamente do EPS produzido com S (4,55 g.L⁻¹). Ainda, o meio contendo somente S não diferiu significativamente do meio contendo SGR (4,07 g.L⁻¹). A maior concentração de biomassa foi encontrada com SGR (0,19 g.L⁻¹), diferindo significativamente ($p < 0,05$) das demais fontes de carbono. Moreira *et al.* (2001) avaliaram a produção da goma xantana por dezoito cepas da bactéria *X. campestris* pv *pruni*, utilizando a sacarose como fonte de carbono, sendo incubadas a 28°C e 200 rpm de agitação, obtendo concentrações da goma variando de 2,3 até 8,3 g.L⁻¹ após 72 h de cultivo.

Para a bactéria *P. oleovorans* pode-se perceber que foi encontrada uma maior concentração de EPSs com SGR (4,11 g.L⁻¹) e GR (3,99 g.L⁻¹), que não diferiram significativamente entre si. A concentração de EPSs em meio com S foi bastante inferior, diferindo significativamente das demais. Já a concentração de biomassa foi maior em meio com GR (4,30 g.L⁻¹), diferindo significativamente dos demais meios. Hiliou *et al.* (2009), utilizando a mesma cepa, como fonte de carbono o glicerol (25 g.L⁻¹) e como fonte de nitrogênio o (NH₄)₂HPO₄ (3,3 g.L⁻¹), obtiveram 13,3 g.L⁻¹ de EPSs, sendo o pH 6,75-6,85 e a aeração 0,125 vvm. Este valor foi encontrado em sete dias de cultivo, utilizando biorreator de 10 L, onde as condições de aeração e agitação são muito mais eficientes.

Pode-se perceber que a maior concentração de EPS para a bactéria *S. capsulata* foi de 3,44 g.L⁻¹ e 3,51 g.L⁻¹, quando utilizadas a S e GR como fonte de carbono, não diferindo entre si, sendo a concentração encontrada, quando utilizado o GR como fonte de carbono, bastante inferior (1,87 g.L⁻¹). As concentrações de biomassa para as três fontes de carbono não diferiram significativamente, ficando em torno de 0,90 g.L⁻¹. Bajaj *et al.* (2006) encontraram para bactéria *S. paucimobilis* em meio contendo S como fonte de carbono uma concentração de biomassa em torno de 0,25 g.L⁻¹, sendo a maior concentração de biomassa encontrada quando amido solúvel foi utilizado como fonte de carbono (0,46 g.L⁻¹).

Para a bactéria *Z. mobilis* pode-se perceber que houve uma maior concentração de EPSs em meio contendo a mistura SGR (1,42 g.L⁻¹), seguido pelo GR (0,77 g.L⁻¹) e S (0,27 g.L⁻¹). A concentração de biomassa foi maior em meio com S (0,83 g.L⁻¹), seguido por SGR (0,68 g.L⁻¹) e

GR (0,22 g.L⁻¹). Oliveira *et al.* (2007), utilizando 250 g.L⁻¹ de sacarose (fonte de carbono), em 24 h de cultivo, encontraram uma concentração de biomassa de 0,85 g.L⁻¹, resultado similar ao encontrado neste trabalho (0,83 g.L⁻¹) quando S foi usada.

4. CONCLUSÃO

Ao comparar as bactérias *X. campestris* pv. *mangiferaeindicae* IBSBF 1230, *P. oleovorans* NRRL B-14683, *S. capsulata* NRRL B-4261 e *Z. mobilis* NRRL B-4286, todas foram capazes crescer e produzir EPSs em meio contendo somente GR como fonte de carbono, em 48 h de cultivo, sendo que as bactérias *X. campestris* e *P. oleovorans* foram capazes de produzir iguais ou maiores concentrações de EPSs quando utilizado somente GR como fonte de carbono em relação às demais fontes, não havendo uma relação definida entre concentração de biomassa e produção de EPSs. Desta forma, foi demonstrado que o GR pode ser uma boa alternativa de fonte de carbono, em substituição à sacarose, no cultivo de algumas bactérias produtoras de EPSs.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPERGS e CNPq pelo apoio financeiro, e à CAPES pela concessão de bolsa.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAD, S.; TURON, X. Valorization of biodiesel derived glycerol as a carbon source to obtain added-value metabolites: Focus on polyunsaturated fatty acids. *Biotechnol. Adv.*, v. 30, p. 733-740, 2012.
- BAJAJ, I. B.; SAUDAGAR, P.S.; SINGHAL, R.S.; PANDEY, A. Statistical approach to optimization of fermentative production of gellan gum from *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461. *J. Biosci. Bioeng.*, v. 102, n. 3, p. 150-156, 2006.
- BONOMI, A.; POÇO, J.G.; TRIELLI, M.A. Biocombustíveis – a solução brasileira para uma matriz energética sustentável. *Rev. Bras. Eng. Quím.*, v. 22, p. 16-21, 2006.
- FREITAS, F.; ALVES, V.D.; PAIS, J.; CARVALHEIRA, M.; COSTA, N.; OLIVEIRA, R.; REIS, M.A.M. Production of a new exopolysaccharide (EPS) by *Pseudomonas oleovorans* NRRL B-14682 grown on glycerol. *Process. Biochem.*, v. 45, p. 297-305, 2010.
- FREITAS, F.; ALVES, V.D.; REIS, M.A.M. Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. *Trends Biotechnol.*, v. 29, p. 388-398, 2011.
- HILLIOU, L.; FREITAS, F.; OLIVEIRA, R.; REIS, M.A.M.; LESPINEUX, D.; GRANDFILS, C.; ALVES, V.D. Solution properties of an exopolysaccharide from a *Pseudomonas* strain obtained using glycerol as sole carbon source. *Carbohydr. Polym.*, v. 78, p. 526-532, 2009.

IBSBF – Coleção de Cultura de Fitobactérias do Instituto Biológico. Instruções para re-hidratação das culturas. Campinas, São Paulo, 2013.

LUVIELMO, M.M.; SCAMPARINI, A.R.P. Goma xantana: produção, recuperação, propriedades e aplicação. *Estudos Tecnológicos*, v. 5, p. 50–67, 2009.

MESOMO, M.C. Produção de goma xantana em biorreator utilizando meio à base de soro de queijo. 2007. 81 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade do Alto Uruguai e das Missões (URI), Erechim.

MONTGOMERY, D.C. *Introdução ao controle estatístico de qualidade*. 4º Edição. Rio de Janeiro: Editora LTC, 2004.

MOREIRA, A.S.; VENDRUSCOLO, J.L.S.; GIL-TURNES, C.; VENDRUSCOLO, C.T. Screening among 18 novel strains of *Xanthomonas campestris* pv *pruni*. *Food Hydrocolloid.*, v. 15, p. 469-474, 2001.

MOTA, C.J.; SILVA, C.X.A.; GONÇALVES, V.L.C. Gliceroquímica: novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel. *Quim. Nova*, v. 32, n. 3, p. 639-648, 2009.

OLIVEIRA, M.R.; SILVA, R.S.S.F.; BUZATO, J.B.; CELLIGOI, M.A.P.C. Study of levam production by *Zymomonas mobilis* using regional low-cost carbohydrate sources. *Biochem. Eng. J.*, v. 37, p. 177-183, 2007.

PRASANNA,P.H.P.; BELL, A.; GRANDISON, A.S.; CHARALAMPOPOULOS, D. Emulsifying, rheological and physicochemical properties of exopolysaccharide produced by *Bifidobacterium longum* subsp. *Infantis* CCUG 52486 and *Bifidobacterium infantis* NCIMB 702205. *Carbohydr. Polym.*, v. 90, p. 533-540, 2012.

PRIETO, L. M.; MICHELON, M.; BURKERT, J.F.M.; KALIL, S.J.; BURKERT, C.A.V. The production of rhamnolipid by a *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from a southern coastal zone in Brazil. *Chemosphere*, v. 71, p. 1781-1785, 2008.

REIS, E.C.; ALMEIDA, M.; CARDOSO, J.C.; PEREIRA, M.A.; OLIVEIRA, C.B.Z.; VENCESCAU, E.M.; DRUZIAN, J.I.; MARIANO, R.; PADILHA, F.F. Biopolymer synthesized by strains of *Xanthomonas* sp isolate from Brazil using biodiesel-waste. *Macromol. Symp.*, v. 296, p. 347-353, 2010.

SILVA, G. P.; MACK, M.; CONTIERO, J. Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnol. Adv.*, v. 27, p. 30–39, 2009.