

CULTIVO DE BACTÉRIAS UTILIZANDO GLICERINA RESIDUAL PARA OBTENÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS

V.A. RIBEIRO¹, M. TEIXEIRA¹, C. A. V. BURKERT¹

¹ FURG, Universidade Federal do Rio Grande, Escola de Química e Alimentos
email: vanessa.amaralribeiro@gmail.com

RESUMO - Os exopolissacarídeos bacterianos (EPSs) são amplamente utilizados no setor industrial como agentes gelificantes, podendo ser sintetizados por bactérias como *Rhizobium* e *Mesorhizobium*. Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a produção de EPSs por diferentes bactérias do gênero *Rhizobium* e *Mesorhizobium* usando glicerina residual como fonte de carbono. Foram testadas 4 diferentes espécies de bactérias: *Rhizobium leguminosarum bv viciae* Semia 344, *Rhizobium tropici* Semia 4077, *Mesorhizobium loti* Semia 816 e *Mesorhizobium huakuii* Semia 4779. Os cultivos foram realizados em triplicata em frascos agitados a 30°C e 200 rpm utilizando meio de cultivo contendo glicerina residual, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, NaCl, extrato de levedura, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, sendo o pH ajustado para 7,0 acompanhando-se biomassa, pH e, ao término dos cultivos, a concentração de EPSs. A bactéria *Mesorhizobium loti* Semia 816 mostrou-se promissora para produção de EPSs, atingindo, em 96 h, biomassa, pH e concentração de EPSs de $2,39 \pm 0,05$ g/L, $5,27 \pm 0,01$ e $4,90 \pm 0,2$, respectivamente. Quanto à viscosidade, foi observado um comportamento pseudoplástico, com maior valor para a viscosidade inicial sendo observado para a bactéria *Rhizobium tropici* Semia 4077 (358 mPas em uma solução 5% m/v).

1. INTRODUÇÃO

Os exopolissacarídeos microbianos (EPSs), também conhecidos como gomas, são polissacarídeos extracelulares produzidos por micro-organismos e possuem a capacidade de formar géis e soluções viscosas em meio aquoso (Monteiro *et al.*, 2012). Essas gomas são amplamente utilizadas na indústria de alimentos como espessantes, estabilizantes e agentes gelificantes devido à estabilidade de seus géis em meio aquoso (Donot *et al.*, 2012).

Nos últimos anos, diversos micro-organismos produtores de exopolissacarídeos tem sido investigados. Dentre eles, as bactérias diazotróficas tem se destacado por produzirem quantidades consideráveis de exopolissacarídeos, como as do gêneros *Rhizobium*, *Mesorhizobium* e *Bazyrhizobium* (Monteiro *et al.*, 2012; Staudt *et al.*, 2012 ; Castellane e Lemos, 2007). Na maioria das vezes, os EPSs rizobianos produzidos são heteropolissacarídeos, compostos de diferentes tipos de monossacarídeos (Becker e Pühler, 1998 ; Castellane e Lemos, 2007). As bactérias diazotróficas são responsáveis pela fixação do nitrogênio molecular atmosférico (N_2) em íon amônio (NH_4^+), sendo

usado para a fixação do nitrogênio nas raízes de plantas leguminosas, processo que facilita a obtenção de nutrientes e fornece proteção ao ambiente (Monteiro *et al.*, 2012).

A produção de EPS é influenciada principalmente pelas condições do meio de cultivo, sendo a fonte de carbono um importante fator de influencia no processo de biossíntese de EPS (Ruas-Madiedo e de Los Reyes, 2005; Gharzouli *et al.*, 2012). Neste contexto, o presente trabalho teve como principal objetivo estudar o cultivo de diferentes bactérias diazotróficas dos gêneros *Rhizobium* e *Mesorhizobium* quanto à produção de EPSs usando a glicerina residual como principal fonte de carbono. Cabe salientar que são escassos estudos abordando a produção EPSs por bactérias diazotróficas com esta fonte de carbono.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Neste estudo, foram testadas 4 diferentes bactérias: *Rhizobium leguminosarum* bv vicae SEMIA 344, *Rhizobium tropici* SEMIA 4077, *Mesorhizobium loti* SEMIA 816 e *Mesorhizobium huakuii* SEMIA 4779, cedida pela FEPAGRO (Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária).

Como fonte de carbono foi utilizada a glicerina residual proveniente da síntese do biodiesel, fornecido pela empresa BS Bios Indústria e Comércio de Biodiesel Sul Brasil S/A, localizada em Passo Fundo - RS.

Para o preparo do inóculo, foi usado 1 tubo de cultura microbiana reativada, sendo raspadas com 10 mL de água peptonada 0,1% e transferida para cada Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio YMA (yeast manitol), ajustado a pH 7,0, conforme proposto por Dutra et al. (2004), sendo utilizado a glicerina residual como fonte de carbono. A suspensão foi incubada a 30°C em frascos agitados a 200 rpm e foi realizado o acompanhamento do crescimento celular por densidade óptica (DO) a 600nm.

Os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyers de 500 mL com volume inicial de 100 mL, resultante da adição do meio de cultivo e suspensão de bacteriana. O meio de cultivo foi preparado na forma concentrada a fim de resultar na seguinte composição (g/L) proposta por Dutra et al. (2004) com modificações: 10 glicerina residual; 0,4 KH₂PO₄; 0,1 K₂HPO₄; 0,2 MgSO₄.7H₂O; 0,1 NaCl; 0,4 extrato de leveduras; 0,12 MnCl₂.4H₂O; 0,15 CaCl₂. 2H₂O, pH ajustado em 7,0.

As amostras foram retiradas a cada 24 h e centrifugadas a 5000 x g por 30 min. No sobrenadante foi determinado o pH e foi adicionado álcool etílico 96% na proporção de 1:3 para precipitação da goma. Essa suspensão foi armazenada sob refrigeração a ± 4°C durante 24 h. Após a suspensão foi centrifugada a 5000 x g a 4°C por 15 minutos, sendo filtrada à vácuo para recuperação do exopolissacarídeo. O precipitado foi colocado em placas de Petri previamente pesadas e secando-se em estufa (45°C) por 24 h até a massa constante.

Já a sedimento foi lavado, novamente centrifugado a 5000 x g por 15 min e então ressuspenso em volume apropriado, para determinação da concentração de biomassa por densidade óptica a 600 nm em espectrofotômetro, convertendo-se em g/L a partir de uma curva padrão de biomassa para cada micro-organismo, conforme descrito por Messomo (2007).

A análise da viscosidade da solução aquosa dos ESPs produzido a 5% (m/v) foi realizada em um viscosímetro rotacional Brookfield modelo DV- III Ultra, com spindle 51 a 25°C.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

As variações da concentração de biomassa e do pH em relação ao tempo foram mostrada na Figura 1.

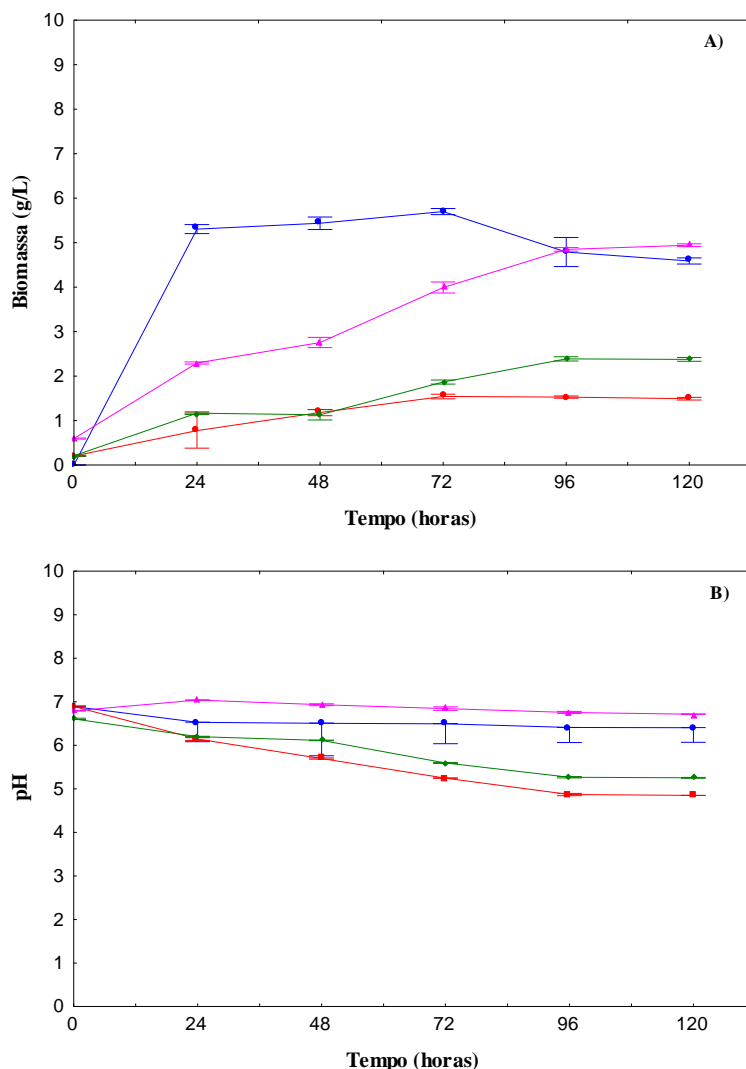


Figura 1- Concentração de biomassa (A) e pH (B) para as diferentes bactérias cultivadas em meio contendo glicerina residual. \square *Rhizobium tropici* Semia 4077, \square *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* Semia 344, \square *Mesorhizobium loti* Semia 816, \square *Mesorhizobium huakuii* Semia 4779.

As bacterias *Rhizobium tropici* Semia 4077 e *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* Semia 344, atingiram a concentração máxima de biomassa em 72h, respectivamente, $5,70 \pm 0,07$ e $1,54 \pm 0,05$ g/L. Já os micro-organismos *Mesorhizobium loti* Semia 816 e *Mesorhizobium huakuii* Semia 4779 alcançaram a concentração celular máxima em 96 e 120 h de cultivo, de $2,39 \pm 0,05$ e $4,94 \pm 0,03$ g/L respectivamente. Quanto ao pH, a variação mais pronunciada foi observada para as

bactérias *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* Semia 344 e *Mesorhizobium loti* Semia 816, atingindo, respectivamente, 4,85 e 4,93 (Figura 1B). Segundo Messomo (2007), a produção de EPSs não possui uma relação direta com o crescimento celular.

As concentrações de EPSs produzidos pelos micro-organismos estudados estão indicadas na Figura 2. As bactérias *Rhizobium tropici* Semia 4077 e *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* Semia 344 alcançaram a produção de EPSs máxima em 48 horas de cultivo, respectivamente $0,75 \pm 0,00$ e $2,32 \pm 0,44$ g/L, enquanto os *Mesorhizobium loti* Semia 816 e *Mesorhizobium huakuii* Semia 4779 a sua produção máxima de EPSs foi atingida em 96 horas de cultivo, com os valores de $4,90 \pm 0,21$ e $1,75 \pm 0,13$ g/L, respectivamente.

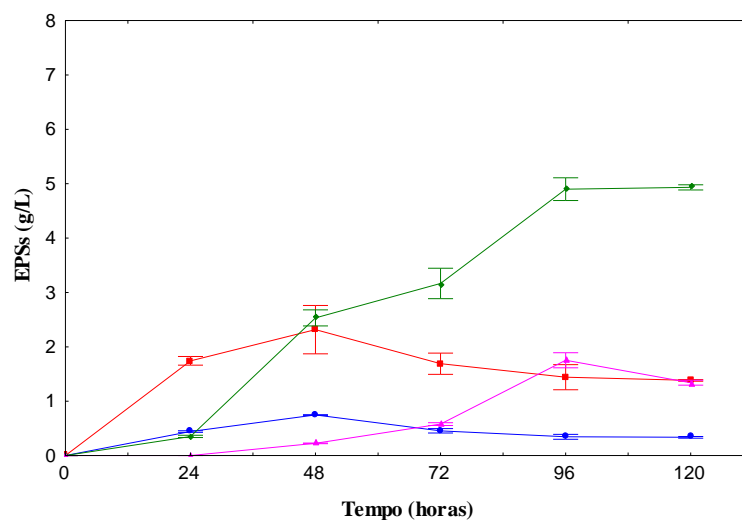


Figura 2- Produção de EPSs para as diferentes bactérias cultivadas em meio contendo glicerina residual. \square *Rhizobium tropici* Semia 4077, \square *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* Semia 344, \square *Mesorhizobium loti* Semia 816, \square *Mesorhizobium huakuii* Semia 4779.

Staudt *et al.* (2012) obteve uma produção de EPSs $4,08 \text{ g.L}^{-1}$ utilizando sacarose (10 g/L) como fonte de carbono no cultivo de *Rhizobium tropici* CIAT 899 seguindo uma relação de C/N de 20, enquanto Ghosh *et al.* (2005), em cultivo do *Rhizobium* sp. CIAT899 em um meio contendo 20 g/L de manitol atingiu uma produção de 1,89 g/L de EPSs com relação C/N de 20. Mandal *et al.* (2007) produziu 0,35 g/L de EPSs em um meio contendo 10 g/L de manitol adicionado com 3 g/L de asparagina no cultivo da *Rhizobium* sp. VMA301 com relação C/N de 3,3.

Kumari *et al.* (2009) estudou diferentes cepas da espécie *Indigofera viscosa*, obtendo uma concentração de EPS de 0,876 mg/g usando a glicerina como sua principal fonte de carbono.

Com os EPSs obtidos nos tempos de cultivo correspondentes à produção máxima, foi determinada a viscosidade de soluções aquosas a 5% m/v, conforme mostra a Figura 3.

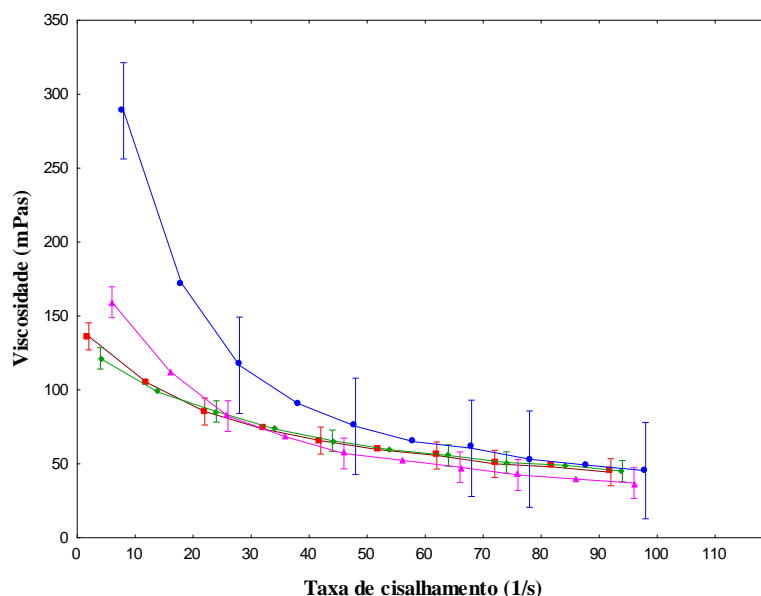


Figura 3 - Variação da viscosidade aparente em função da taxa de cisalhamento, em soluções aquosas de exopolissacarídeo (5% p/v) produzidos bactérias cultivadas em meio contendo glicerina residual. \square *Rhizobium tropici* Semia 4077, \square *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* Semia 344, ambos em 48 h de cultivo, \square *Mesorhizobium loti* Semia 816, \square *Mesorhizobium huakuii* Semia 4779 ambos em 96 h de cultivo.

De acordo com Figura 3, foi observado que as quatro soluções de EPSs produzidos pelos micro-organismos testado apresentaram comportamento não newtoniano, pseudoplástico. Um comportamento não newtoniano de fluido se caracteriza pela variação da viscosidade em função da taxa de cisalhamento e os fluidos pseudoplásticos são não newtoniano, em que o aumento da taxa de cisalhamento resulta em decréscimo da viscosidade (Fernandes *et al.*, 2010). Essa característica reológica pseudoplástica tem sido observada por inúmeros autores no estudo de EPSs produzidos por *Rhizobium* sp (Kaci *et al.*, 2005; Barreto, 2011; Aranda-Selverio *et al.*, 2010; Fernandes *et al.*, 2010) e em bactérias do gênero *Xanthomonas* (Rottava *et al.*, 2009). As bactérias *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* Semia 344, *Mesorhizobium loti* Semia 816, *Mesorhizobium huakuii* Semia 4779 apresentaram viscosidades semelhantes, porem diferente das *Rhizobium tropici* Semia 4077, indicando que essa solução aquosa apresentam menor resistência de escoamento. Almeida et al. (2009) encontrou uma viscosidade entorno de 150 mPas em solução aquosa 5%(m/v) do EPSs produzido por *Rhizobium* sp Isolado 53.5.

4. CONCLUSÕES

As bactérias diazotróficas testadas foram capazes de produzir EPSs a partir da glicerina residual como fonte de carbono no meio de cultivo destacando a *Mesorhizobium loti* Semia 816, com produção de $4,90 \pm 0,2$ g/L. Todos os EPSs produzidos apresentaram comportamento pseudoplástico em soluções aquosas de 5% m/v, com maior valor de viscosidade inicial (358 mPas) observado para a *Rhizobium tropici* Semia 4077.

5. AGRADECIMENTOS

CNPq, FAPERGS e FEPAGRO

6. REFERÊNCIA

ALMEIDA, J.P.S.; FERNANDES JÚNIOR, P.I., XAVIER, G.R.; RUNJANEK, N.G.; OLIVEIRA, P.J. Preparação e caracterização de exopolissacarídeos por síntese bacterias do gênero *Rhizobium* e sua aplicação como veículo de inoculação. Anais do VIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2009.

ARANDA-SELVERIO, G.; PENNA, A.L.B.; CAMPOS-SÁS, L.F.; SANTOS JÚNIOR, O.; VASCONCELOS, A.F.D.; SILVA, M. de L.C. da; LEMOS, E.G.M.; CAPANHARO, J.C.; SILVEIRA, J.L.M.S. Propriedades reológicas e efeito da adição de sal na viscosidade de exopolissacarídeos produzidos por bactérias do gênero *Rhizobium*. Química Nova, v. 33, p. 895-899, 2010.

BARRETO, M.C.S.; FIGUEIREDO, M.V.B.; BURITY, H.A. ; SILVA, M.L.R.B.; LIMA-FILHO, J.L. Produção e comportamento reológico de biopolímeros produzidos por rizóbios e caracterização genética. Revista Brasileira Agrociência, v. 17, p. 221-227, 2011.

BECKER, A.; PÜHLER, A. Production of exopolysaccharides. In: SPAINK, H.P.; KONDOROSI, A.; HOOYKAAS, J.J. (Ed.). The **Rhizobiaceae**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 97-118, 1998.

CASTELLANE, T.C.L. e LEMOS E.G.M. Composição de exopolissacarídeos produzidos por estirpes de rizóbios cultivados em diferentes fontes de carbono. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 42, p.1503-1506, 2007.

DONOT, F.; FONTANA, A.; BACCOU, J.C. GALINDO, S.S. Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. Carbohydrate Polymers, v. 87, p. 951– 962, 2012.

DUTRA, F.P; DA COSTA, A. C.A.; LOPES, L. M. A.; BARROS, A.; SÉRVULO, E.F. C.; FRANÇA, F. P. Effect of Process Parameters on Production of a Biopolymer by *Rhizobium* sp. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 114, p. 639-652, 2004.

FERNANDES JÚNIOR P.I.; ALMEIDA, J.P.S.; PASSOS, S. R. OLIVEIRA, P.J.; RUMJANEK, N.G. E XAVIER, G.R. Produção e comportamento reológico de exopolissacarídeo sintetizados por rizóbios isolados de guandu, Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.45, p.1465-1471, 2010.

GHARZOULI R.; BENAHMED A.; BENHIZIA Y.; BENGUEDOUAR, A. Influence of carbon source on the production of exopolysaccharides by *Rhizobium sultae* and on the nodulation of *Hedysarum coronarium* L. legume. African Journal of Microbiology Research, v. 6, p. 5940-5946, 2012.

GHOSH A. C.; GHOSH S.; BASU, P. S. Production of extracellular polysaccharide by a *Rhizobium* species from root nodules of the leguminous tree *Dalbergia lanceolaria*. Engineering Life Sciences, v. 5, p. 378–382, 2005.

KACI, Y.; HEYRAUD, A.; BARAKAT, M.; HEULIN, T. Isolation and identification of an EPS-producing *Rhizobium* strain from soil (Algeria): characterization of its EPS and the effect of inoculation on wheat rhizosphere soil structure. Research in Microbiology, v. 156, p. 522–531, 2005.

KUMARI, B. S.; RAM, M.R.; MALLAIAH, K.V. Studies on exopolysaccharide and indole acetic acid production by *Rhizobium* strains from *Indigofera*. African Journal of Microbiology Research, v. 3, p. 010-014, 2009.

MANDAL, S., RAY, B.; DEY, S.; PATI B. Production and composition of extracellular polysaccharide synthesized by a *Rhizobium* isolate of *Vigna mungo* (L) Hepper. Biotechnology Letter, v. 29, p. 1271–1275, 2007.

MESOMO, M. C. Produção de goma xantana em biorreator utilizando meio a base de soro de queijo. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. Centro Tecnológico de Uri. Campus de Erechim, Rio Grande do Sul. Erechim, 2007.

MONTEIRO, N. K.; ARANDA-SELVERINO, G.; EXPOSTI, D. T. D.; SILVA, M.L. C.; LEMOS, E.G.M.; CAMPANHARO, J.C.; SILVEIRA, J.L.M. Caracterização química dos géis produzidos pelas bactérias diazotróficas *Rhizobium tropici* e *Mesorhizobium* sp. Química Nova, v. 35, p. 705-708, 2012.

ROTTAVA, I.; BATESINI, G.; SILVA, M.F.; LERIN, L.; OLIVEIRA, D.; PADILHA, F.F.; TONIAZZO, G.; MOSSI, A.; CANSIAN, R.L.; DI LUCCIO, M.; TREICHEL, H. Xanthan gum production and rheological behavior using different strains of *Xanthomonas* sp. Carbohydrate Polymers, v. 77, p. 65–71, 2009.

RUAS-MADIEDO, P.; DE LOS REYES-GAVILÁN, C.G. Invited Review: Methods for the Screening, Isolation and Characterization of Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. Journal Dairy Science, v. 88, p. 843-856, 2005.

STAUDT, A.K.; WOLFE, L.G., SHROUT, J.D. Variations in exopolysaccharide production by *Rhizobium tropici*. Archives of Microbiology, v. 194, p. 197–206, 2012.