



Imobilização de células de *Erwinia* sp. D12 em polissacarídeos de algaroba (*Prosopis juliflora*) para conversão de sacarose em isomaltulose

Isabela Pereira¹, Weysser Felipe Cândido de Souza¹, Ruann Janser Soares de Castro¹ e Hélia Harumi Sato¹

¹ Laboratório de Bioquímica de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

Resumo

A isomaltulose é um açúcar alternativo de baixo potencial cariogênico e que possui aplicações em alimentos. A isomaltulose é obtida a partir de sacarose utilizando-se bactérias produtoras de glicosiltransferases. Foi estudado o efeito do meio de cultivo na produção de glicosiltransferase pela linhagem *Erwinia* sp. D12. Entre os meios de cultivos M1, M2 e M3 testados para a fermentação, as células de *Erwinia* sp. D12 apresentaram melhor taxa de conversão de sacarose em isomaltulose (78,02%) quando cultivadas em meio de cultura M2 composto de melaço de cana de açúcar (150 g/L), água de maceração de milho (20 g/L) (Milhocina®) e extrato de levedura (15 g/L) (Prodex Lac SD®), com pH ajustado para 7,5. No estudo da cinética de crescimento em reator de 6,6 L contendo 3 L de meio de cultura observou-se que 16 horas de fermentação foi o período suficiente para obtenção de células com alta capacidade de conversão de sacarose em isomaltulose (83,48%). Foi estudado o efeito da substituição parcial de alginato de sódio por galactomananas extraídas de vagens de algaroba (*Prosopis juliflora*) na imobilização por gelificação iônica de células de *Erwinia* sp. D12. A imobilização de células de *Erwinia* sp. D12 utilizando-se a combinação de 1,5% de alginato + 1,5% de galactomananas de algaroba proporcionou a conversão de 92,39% de sacarose em isomaltulose, não diferindo estatisticamente ($p > 0,05$) da formulação contendo apenas alginato (3%), que apresentou 95,45% de conversão, demonstrando que a substituição de 50% do alginato por galactomananas de algaroba proporciona uma alta conversão de sacarose em isomaltulose e que pode diminuir os custos de produção das partículas contendo os micro-organismos, em razão do alginato de sódio ser um reagente mais caro que as galactomananas.

Palavras-chave: Galactomananas, imobilização, isomaltulose.

1. OBJETIVO

Extrair os biopolímeros presentes nas sementes de vagens de algaroba (*Prosopis juliflora*), oriundas da região de Campina Grande - Paraíba e avaliar a sua capacidade na formação de gel em combinação com alginato de sódio, na presença de cloreto de cálcio, para a imobilização de células de *Erwinia* sp. D12, produtoras de glicosiltransferases, capazes de converter sacarose em isomaltulose.

2. DESCRIÇÃO DA PESQUISA

2.1. Micro-organismo

Foi utilizada a linhagem *Erwinia* sp. D12 produtora de glicosiltransferase, pertencente à coleção do Laboratório de Bioquímica de Alimentos (LBA), Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA) - UNICAMP. A cultura foi cultivada em tubos de ensaio contendo meio de cultivo inclinado, composto de 6,0% de sacarose (m/v), 4,0% de peptona (m/v), 0,4% de extrato de carne (m/v) e 2,0% de ágar (m/v), durante 15 horas, a 30°C, armazenada a 5°C.

2.2. Quantificação de isomaltulose

A quantificação de isomaltulose produzida pelas células de *Erwinia* sp. D12 livres e imobilizadas foi realizada em um cromatógrafo líquido DIONEX DX-600 (Dionex Corporation, 1228 Titan Way Sunnyvale, CA, EUA) equipado com bomba isocrática IP25 e detector eletroquímico de ouro ED50. A separação dos açúcares foi realizada utilizando-se coluna CarboPac™ PA 1 (4 mm x 250 mm), coluna de guarda CarboPac™ PA 1 (4 mm x 50 mm) e solução de hidróxido de sódio 220 mM como fase móvel, com fluxo de 1 mL/min, a 20 °C. Os carboidratos foram analisados pelo tempo de retenção, por comparação com padrões de isomaltulose e sacarose (Sigma Ultra®, St. Louis, MO, EUA).

2.3. Meio de Cultura

Para o cultivo da *Erwinia* sp. D12 e obtenção de massa celular foram testados três meios de cultura, M1, M2 e M3. O meio de cultura (M1) era composto de sacarose (60 g/L), peptona bacteriológica (40 g/L) e extrato de carne (4 g/L), M2 otimizado por Kawaguti *et al.* (2005), composto de melaço de cana-de-açúcar (150 g/L), água de maceração de milho - Milhocina® (20 g/L) e extrato de levedura (15 g/L), com pH ajustado para 7,5, e M3 otimizado por Orsi e Sato (2016), composto por melaço de cana-de-açúcar (40 g/L), peptona bacteriológica (15 g/L) e extrato de levedura (20 g/L).

O estudo da conversão de solução de sacarose em isomaltulose pelas células livres de *Erwinia* sp. D12 foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Kawaguti e Sato (2010), em processo de batelada, utilizando frascos sob agitação. A massa celular foi ressuspensa em uma solução de sacarose 35% (m/v), na proporção de 1:9 (m:v), incubadas a 35 °C e 50 rpm em incubador-agitador durante 20 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 9.600 x g, por 15 minutos, a 5 °C, para recuperação da massa celular e utilização em outra batelada. Os testes foram realizados em triplicata e a quantificação de isomaltulose foi determinada nos sobrenadantes de cada batelada, de acordo com o item 2.2.

2.4. Cinética

A cinética de crescimento de *Erwinia* sp. D12 foi realizada com o meio de cultura M2, definido como ideal no item 3.1, em biofermentador de 6,6 L New Brunswick Bioflo IIc (New Brunswick Scientific, Edison, NJ, EUA). Alíquotas do micro-organismo foram transferidas, com o auxílio de uma alça de platina, para 6 frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL de meio de cultivo, totalizando 300 mL de meio de cultivo, sendo em seguida incubados, sob agitação, a 30 °C, durante 15 horas, para obtenção do pré-inóculo.

Após o período de fermentação do pré-inóculo, este foi transferido asépticamente em capela de fluxo laminar, juntamente com 3 mL de anti-espumante Dow Corning® FG-10 (D'altomare Química, São Paulo, SP, BR) para um fermentador de 6,6 litros contendo 2.700 mL do meio de cultivo otimizado. O micro-organismo foi cultivado a 30 °C, 200 rpm e aeração mantida a 1 vvm (volume de ar/volume de meio de cultivo/minuto). A cinética de crescimento das células de *Erwinia* sp. D12 foi acompanhada durante 24 horas, sendo retirados 100 mL como alíquotas em diferentes tempos para verificar a taxa de conversão de sacarose em isomaltulose, em triplicata.

2.5. Extração das galactomananas

Os biopolímeros de vagens de algaroba (*Prosopis juliflora*), oriundas da região de Campina Grande - Paraíba, foram extraídos e purificados baseando-se nas metodologias propostas por López-Franco *et al.* (2013) e Vilaró *et al.* (2018), com algumas modificações. A farinha de algaroba foi suspensa em água destilada na proporção de 1:6 (m/v, pó:água), sob agitação e aquecimento a 50 °C por 1 hora, então o líquido foi filtrado e separado do resíduo. A parte líquida foi centrifugada a 10.000 x g, 5 °C, durante 15 minutos, para retirada das impurezas. O sobrenadante foi separado e precipitado com solvente na proporção de 1:2 (v/v),

sobrenadante/solvente) em acetona, etanol e isopropanol para verificar qual dos três apresenta o melhor rendimento. O material precipitado foi centrifugado novamente, nas mesmas condições citadas anteriormente, para a obtenção da galactomanana de algaroba, em forma de goma, que foi seca em estufa com circulação de ar a 50 °C durante 8 horas, triturada em moinho (TE-631/2 Tecnal, Brasil) e pesada.

O rendimento das galactomananas precipitadas pelos diferentes solventes orgânicos foi calculado utilizando a seguinte equação:

$$\text{Rendimento (\%)} = (\text{Massa de goma seca triturada} / \text{Massa de cápsulas moídas}) \times 100$$

2.6. Imobilização das células de *Erwinia* sp. D12 em alginato e galactomananas

As células de *Erwinia* sp. D12, obtidas a partir da fermentação em M2, foram incorporadas em soluções poliméricas de alginato nas concentrações de 2% e 3% e combinações de 1% de alginato + 1% de galactomananas de algaroba e 1,5% de alginato + 1,5% de galactomananas de algaroba. Todas as formulações foram imobilizadas na proporção de 1:2 (m/m, massa celular/polímeros), pelo método de gelificação iônica, onde suspensões celulares contendo 40% de células úmidas de *Erwinia* sp. D12 foram adicionadas as soluções dos polímeros e a mistura foi gotejada, com o auxílio de uma bomba peristáltica, em solução de cloreto de cálcio (2%) para formação de pequenos grânulos. Os grânulos produzidos foram mantidos na solução de cloreto de cálcio, em temperatura de refrigeração (8 °C), por 12 horas. Após esse período, foram adicionados 10 g dos grânulos em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de solução de sacarose 35% (m/v) e incubados em agitador-incubador, a 35 °C, durante 12 horas. O procedimento foi realizado em triplicata, por quatro bateladas consecutivas. As soluções foram recolhidas ao final de cada batelada para determinar a quantidade de isomaltulose produzida de acordo com o item 2.2.

3. Resultados e discussão

3.1. Definição do melhor meio de cultivo para as células de *Erwinia* sp. D12

A Tabela 1, a seguir, demonstra o percentual de conversão de sacarose em isomaltulose pelas células livres de *Erwinia* sp. D12 obtidas a partir de fermentação em meios de cultivo M1, M2 e M3.

Tabela 1. Percentual de conversão de sacarose em isomaltulose pelas células livres de *Erwinia* sp. D12

Meio de cultivo	% Conversão de sacarose em isomaltulose	
	Batelada 1	Batelada 2
M1	-	-
M2	78,02 ± 2,41	69,70 ± 3,16
M3	85,18 ± 0,49	47,08 ± 6,86

*Médias (n=3) seguidas de desvio padrão

As células livres de *Erwinia* sp. D12 não foram capazes de converter sacarose em isomaltulose quando cultivadas em M1. O meio M3 apresentou uma taxa de conversão um pouco superior a M2 na primeira batelada, no entanto, houve uma maior diminuição na produção de isomaltulose logo na segunda batelada (47,08%), diferente do comportamento observado em M2, que apresentou 78,02% de conversão na primeira batelada, havendo baixa perda de atividade na segunda batelada, com 69,70% de isomaltulose produzida. Sendo assim, o meio M2 apresentou maior estabilidade na conversão de sacarose em isomaltulose e foi escolhido como mais eficiente para o cultivo das células de *Erwinia* sp. D12.

3.2. Cinética de crescimento de *Erwinia* sp. D12 e conversão de sacarose em isomaltulose

A Figura 1, a seguir, demonstra a taxa de conversão de sacarose em isomaltulose pelas células de *Erwinia* sp. D12 em função do seu tempo crescimento.

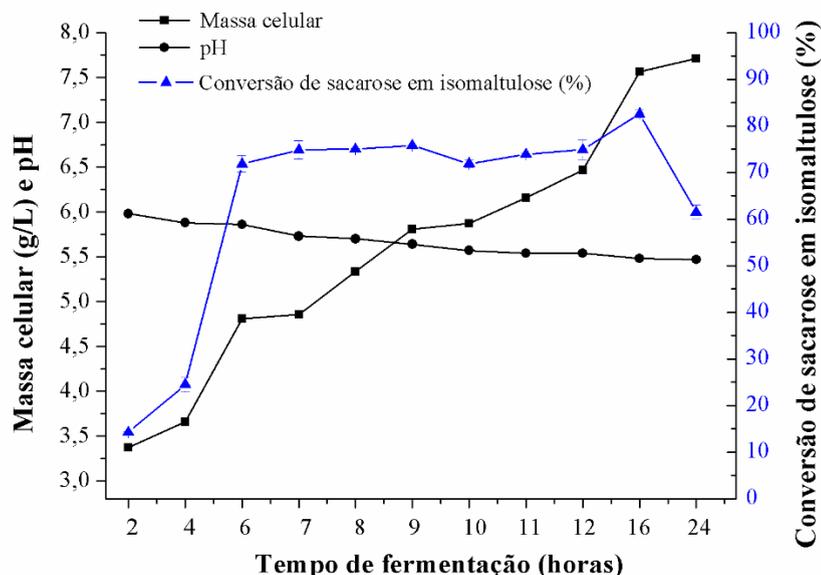


Figura 1. Percentual de conversão de sacarose em isomaltulose produzido pelas células de *Erwinia* sp. D12 durante a fermentação em biofermentador de 6,6 L.

Após 6, 12 e 16 horas de fermentação foram obtidos 4,81, 6,5 e 7,5 g/L de massa celular, respectivamente. As amostras de massa celular obtidas no período entre 6 e 12 horas de fermentação apresentaram taxas de conversão de sacarose em isomaltulose na faixa de 71,84% a 75,80% indicando que é possível obter massa celular de *Erwinia* sp. D12 com uma alta taxa de conversão de sacarose em isomaltulose em um período curto de fermentação, o que é interessante considerando uma redução nos custos de produção. A massa celular obtida após 16 horas de fermentação apresentou a maior conversão de sacarose de isomaltulose (82,63% \pm 0,84).

3.3. Rendimento da extração das galactomananas de algaroba

Os valores de rendimento do processo de extração das galactomananas utilizando diferentes solventes são demonstrados na tabela 2, a seguir.

Tabela 2. Rendimento das galactomananas obtidas por precipitação com diferentes solventes.

Solvente	Rendimento (%)
Acetona	8,78
Etanol	10,14
Isopropanol	7,48

A precipitação utilizando diferentes solventes proporcionou valores de rendimento próximos. Entretanto, o etanol apresentou maior rendimento (10,14%) e maior eficiência para o processo de extração, além de ser o solvente com menor custo dentre os três utilizados. Sendo assim, este foi escolhido como o ideal para extração e obtenção das galactomananas.

3.4. Conversão de sacarose em isomaltulose pelas células imobilizadas de *Erwinia* sp. D12

Os resultados de conversão da sacarose em isomaltulose pelas células imobilizadas de *Erwinia* sp. D12 estão expressos nas Tabelas 3 a seguir.

Tabela 3. Conversão de sacarose em isomaltulose pelas células imobilizadas de *Erwinia* sp. D1

Formulação	% Conversão de sacarose em isomaltulose			
	Batelada 1	Batelada 2	Batelada 3	Batelada 4
2% Alginato	77,20 ^a \pm 3,45	73,04 ^a \pm 7,19	47,95 ^a \pm 7,10	5,74 ^b \pm 3,99
1% Algaroba + 1% Alginato	79,67 ^a \pm 5,32	80,66 ^a \pm 0,79	58,95 ^a \pm 2,02	14,79 ^a \pm 1,79
3% Alginato	95,45 ^a \pm 1,71	83,75 ^a \pm 0,99	27,48 ^a \pm 1,04	3,55 ^a \pm 1,02
1,5% Algaroba + 1,5% Alginato	92,39 ^a \pm 2,24	86,95 ^a \pm 1,44	17,65 ^b \pm 0,77	2,16 ^a \pm 0,32

*Letras iguais na mesma coluna, demonstram que não existe diferença estatística ($p > 0,05$) entre os materiais utilizados na imobilização.

**Médias seguidas de desvio padrão ($n = 3$).

As formulações com concentração final de 2% apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) no percentual de conversão de sacarose em isomaltulose apenas na quarta batelada, onde mistura 1% algaroba+1% alginato (14,79%) se mostrou mais eficiente que o alginato a 2%, com um percentual de 5,74%. Já para os biopolímeros com concentração final de 3%, a terceira batelada foi a única que apresentou diferença significativa ($p < 0,05$), onde a formulação composta apenas de alginato apresentou maior taxa de conversão (27,48%). A partir dos resultados, observou-se que é possível substituir 50% da concentração do alginato por galactomananas de algaroba, diminuindo assim os custos de produção sem comprometer as atividades de conversão mantendo-a semelhante e até superior, como ocorreu na quarta batelada quando utilizada 2% de concentração final dos biopolímeros.

4. CONCLUSÃO

O meio de cultivo M2, composto de melaço de cana-de-açúcar (150 g/L), água de maceração de milho - Milhocina® (20 g/L) e extrato de levedura (15 g/L), com pH ajustado para 7,5 e o tempo de 16 horas de fermentação são as condições ideais para o crescimento e obtenção de células de *Erwinia* sp. D12 com alta atividade de glicosiltransferases.

Dentre os solventes utilizados para extrair as galactomananas de algaroba, o etanol foi escolhido para o processo de imobilização, devido ao seu maior rendimento e baixo custo. Foi possível substituir 50% do alginato de sódio por galactomananas de algaroba no processo de imobilização de células de *Erwinia* sp. D12 para a conversão de sacarose em isomaltulose. Entre as formulações utilizadas na imobilização de células e conversão de sacarose em isomaltulose foi obtido melhor resultado utilizando-se a combinação de 1,5% de alginato de sódio + 1,5% de galactomananas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

KAWAGUTI, H. Y.; SATO, H. H. Isomaltulose production by free cells of *Serratia plymuthica* in a batch process. **Food Chemistry**, v. 120, p.789-793, 2010.

KAWAGUTI, H. Y.; MANRICH, E. ; FLEURI, L. F. ; SATO, Hélia Harumi . Production of glucosyltransferase by *Erwinia* sp. using experimental design and response surface methodology. **Brazilian Journal of Microbiology** (Impresso), v. 36, p. 227-234, 2005.

LÓPEZ-FRANCO, Y. L., CERVANTES-MONTAÑO, C. I., MARTÍNEZ-ROBINSON, K. G., LIZARDI-MENDONZA, J., ROBLES-OZUNA, L. E. Physicochemical characterization and functional properties of galactomannans from mesquite seeds (*Prosopis* spp.). **Food Hydrocolloids**, v. 30, n. 1, p.656-660, 2013.

ORSI, D. C., SATO, H. H. Isomaltulose production using free and immobilized *Serratia plymuthica* cells. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, n.1, p.835-842, 2016.

VILARÓ, P., BENNADJI, Z., BUDELLI, E., MOYNA, G., PANIZZOLO, L., FERREIRA, F. Isolation and characterization of galactomannans from *Prosopis affinis* as potential gum substitutes. **Food Hydrocolloids**, v. 77, n. 1, p.711-719, 2018.