

# **AVALIAÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS TANTO PARA OCRESCIMENTO BACTERIANO COMO PARA PRODUÇÃO DA DEXTRANA-SACARASE A PARTIR DE *Leuconostoc pseudomesenteroides***

**Tainah Reis de Souza Teixeira<sup>1</sup>; Cláudio Roberto Nobrega Amorim**<sup>2</sup>;

1. Bolsista PROBIC/UEFS, Graduando em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: tainahreis.bio@outlook.com

2. Orientador, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: amorim71@ig.com.br

**PALAVRAS-CHAVE:** *Leuconostoc*, Dextrana-Sacarase, meio de cultura.

## **Introdução:**

A diversidade estrutural dos exopolissacarídeos aliada à baixa toxicidade e biodegradabilidade explica o seu enorme potencial biotecnológico (KUMAR, 2007), mais especificamente os produzidos por bactérias são vantajosos devido à alta produtividade, invariabilidade sazonal e geográfica, e condições controláveis da produção, além de serem mais estáveis e passíveis de modificação, por exemplo, através da engenharia genética (SOUZA & GARCIA-CRUZ 2004); (KULSHRESHTHA, 2013).

Exopolissacarídeos de origem bacteriana têm despertado o interesse das mais variadas indústrias podendo ser utilizados pra várias especialidades. A dextrana é um dos exopolissacarídeos produzida por bactérias dos gêneros *Leuconostoc*, *Lactobacillus* e *Streptococcus*, pela ação da enzima dextrana-sacarase, que é ativada pela sacarose (com exceção das espécies do gênero *Streptococcus*). A enzima utiliza a sacarose como substrato e polimeriza a dextrana. Este homopolissacarídeo possui alta massa molecular (107 a 108 kDa), é formado por resíduos de D-glicose conectados por ligações glicosídicas ( $\alpha$ -1,6) na cadeia linear, e nas ramificações ligações do tipo  $\alpha$ -(1,2),  $\alpha$ -(1,3) e  $\alpha$ -(1,4) (SANDFORD, 1979). A Dextrana tem grade importância industrial e é largamente utilizada como aditivo, espessante, estabilizante e emulsificante em produtos alimentícios, cosméticos, fabricação de tintas, imobilizante em processos cromatográficos e também na área médica, agindo como anticoagulante e extensor de plasma, biossensor, antitrombótico, dentre outros (BHAVANI & NISHA, 2010).

Muito empenho tem sido aplicado ao longo dos anos para desenvolver metodologias eficazes, rápidas e com menor custo para a produção das dextranas (NIGAM et al., 2005); (VETTORI et al., 2012); (NAESSENS et al., 2005). Assim, os estudos que se voltam para a dextrana-sacarase têm um papel fundamental neste processo. Dentre os benefícios desta abordagem, pode-se frisar a redução com gastos para manter a colônia, facilidade na separação final do produto com alto grau de pureza, além da possibilidade de reaproveitamento da enzima nas etapas da produção (CHIELLINI et al., 2001). Dessa maneira, o presente estudo se justifica, portanto, em otimizar as condições de produção da dextrana-sacarase através das bactérias lácticas produtoras de exopolissacarídeos isoladas da região, afim de verificar qual o melhor meio a ser utilizado e as condições mais favoráveis

para que estas cresçam mais rapidamente consequentemente obtendo eficiência na aquisição deste exopolissacarídeo de grande interesse industrial.

### **Materiais de Métodos:**

Foram utilizadas neste trabalho amostras bacterianas de *Leuconostoc* fornecidas pela Prof<sup>a</sup>. Dra. Elinalva Maciel Paulo, Coordenadora do LAMASP - Laboratório de Microbiologia Aplicada à Saúde Pública da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS). Tais amostras foram triadas e isoladas conforme a metodologia descrita por PAULO et al. (2012), a partir de produtos alimentícios industrializados (laticínios) e vegetais. As amostras foram cultivadas em treze meios diferentes testadas em diferentes pH (5,0; 5,5; 6,0; 6,5) e diferentes temperaturas (25°C; 30°C; 35°C).

A atividade da enzima dextrana-sacarase foi detectada indiretamente, através da medição da taxa de produção do açúcar redutor D-frutose a partir da sacarose. O ensaio da dextrana foi realizado em 1 ml de uma mistura de reação em tampão de acetato de sódio 20 mM, pH 5,4, contendo 146 mM de sacarose (5%) e utilizando o sobrenadante livre de células (10 a 20 µl) como fonte de enzimas. A mistura da reação será incubada a 30° C durante 15 min. A atividade enzimática foi mensurada através da estimativa do açúcar redutor libertado, pelo método do DNS (3,5 DinitroSalicilato). Alíquotas (0,2 ml), a partir da mistura de reação foram analisadas para a concentração do açúcar redutor. A absorbância foi medida na faixa de 500 nm, utilizando um espectrofotômetro de UV visível contra um padrão de D-frutose. Uma unidade (U) de atividade da dextrana-sacarase definida será a quantidade de enzima que libera 1µmol de açúcar redutor por min a 30° C em tampão de acetato de sódio 20 mM, pH 5,4. O teor total da proteína do sobrenadante livre de células foi estimado pelo método de Lowry e colaboradores (1951), utilizando a albumina bovina sérica como padrão (SUMNER, 1935); (CONTIERO, 2004).

### **Resultados e Discussão:**

Neste estudo as amostras bacterianas na forma liofilizada de *Leuconostoc pseudomesenteroides* R2, fornecidas pela Dr. Elinalva Maciel, foram reativadas num procedimento de três passos, que consistiu em i) a inoculação de 15 ml de solução salina (10% cloreto de sódio); ii) a inoculação em 5 mL de meio de cultura MRS (suplementado com sacarose) e iii) a inoculação em 10 mL de MRS. Estes passos foram realizados sequencialmente a 28° C com a duração de 24 horas cada um. As amostras bacterianas reativadas foram inoculadas para teste em 13 diferentes composições de meios de cultura em diferentes pH (5,0; 5,5; 6,0; 6,5) e diferentes temperaturas (25°C; 30°C; 35°C). A Tabela 1 mostra os resultados da análise da atividade enzimática utilizando-se o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) baseado no método de Miller (1959). Para a determinação do conteúdo protéico total foi utilizado o método Bradford (1976) utilizando-se o soro albumina bovina como padrão. As leituras foram efetuadas no espectrofotômetro UV/VIS modelo Varian, no comprimento de onda 595 nm obtendo os valores tabelados abaixo:

**Tabela 1.** Quantidade de enzima produzida a 25°C, 30°C e 35°C, em U/ml

	pH 5,0			pH 5,5			pH 6,0			pH 6,5		
	25°C	30°C	35°C	25°C	30°C	35°C	25°C	30°C	35°C	25°C	30°C	35°C
MEIO1	79,4	78,5	71,2	73,7	73,4	70,9	69,1	67,5	62,3	89,5	86,3	80,7
MEIO2	87,6	86,4	83,5	81,4	82	81,7	64,8	63,6	64,6	97,3	90,6	85,5
MEIO3	89,6	84,7	88,4	72,6	72,6	78,3	67,9	66,4	65,2	91,5	94,9	90,3
MEIO4	76,2	66,7	64,0	69,5	64,9	62,5	63,7	63,2	67,1	85,6	83,7	83,3
MEIO5	97,4	82,8	77,3	77,8	72,5	70,7	71,1	69,6	66,9	89,2	92,8	88,2
MEIO6	83,2	82,7	81,5	80	78,6	63,6	69,3	65,9	62,4	93,9	92,8	91,4
MEIO7	76,2	74,9	70,7	66,4	67,9	79,7	65,7	63,7	64,6	82,6	80,7	89,1
MEIO8	94,7	90,7	86,3	87,1	82,9	65,5	80,3	79,3	70,2	<b>109,2</b>	<b>103,3</b>	<b>101,8</b>
MEIO9	76,1	75,6	64,8	64,7	67,2	73,9	67,3	65,6	66,8	100,3	99,5	100
MEIO10	86,1	84,4	81,7	73,9	70,7	65,9	79,5	78,9	70,3	102,7	100,6	93,9
MEIO11	70,7	68,6	64,9	65,3	66,4	66,8	<b>63,7</b>	<b>63,1</b>	<b>62,2</b>	97,4	95,7	90,4
MEIO12	71,2	73,7	77,5	67,9	63,8	64,8	67,9	64,7	62,4	95,8	94,7	89,7
MEIO13	71,7	69,2	68,2	71	70	71,9	70,8	68,4	64,8	97,3	96,8	93,1

Baseado nos resultados obtidos as condições otimizadas para a atividade enzimática foram as que o pH corresponde a 6,5 em condições de temperatura a 25°C e a menos favoráveis em pH 6,0 e temperatura a 35°C.

A avaliação enzimática mostrou altos valores que variam entre 62,2 - 109,2 U.mg<sup>-1</sup>, que demonstram a grande expressão de dextrana-sacarase por *L. pseudomesenteroides*. Dentre os 13 meios avaliados, podemos observar que o meio 8 obteve-se o número mais elevado de enzima produzida (109,2 U.mg<sup>-1</sup>) sob as condições de temperatura a 25°C e pH a 6,5. Em contrapartida, houve baixa produção enzimática no meio 11 (62,2 U.mg<sup>-1</sup>) sob as condições de produção enzimática com temperatura aos 35°C e pH em 6,0. A tendência de produção de dextrana-sacarase ocorre em valores de pH e de temperatura mais baixa em comparação com a produção de dextrana por estudos com a enzima a partir de outras fontes como o trabalho de M. Nigam, A. Goyal, and S.S. Katiyar (2005). Resultados mais semelhantes foram encontrados em dextrana-sacarases de *Weissella cibaria* e *L. mesenteroides* NRRL B-650, que é utilizado respectivamente pH 6,9 e pH 7,0 e temperatura de 24 °C e 23 °C.

### CONCLUSÃO:

Baseado nos dados obtidos conclui-se que o meio 8 composto de 4,0 gramas de sacarose, 2,0 gramas de extrato de levedura, 0,001 gramas de NaCl, MnSO<sub>4</sub> e FeSO<sub>4</sub>, 0,002

gramas de CaCl<sub>2</sub>, 0,02 gramas de MgSO<sub>4</sub>e 2,0 gramas de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> foi o melhor para a obtenção de uma elevada atividade enzimática e as condições otimizadas para essa atividade foram nas quais o pH corresponde a 6,5 em condições de temperatura a 25°C.

### **Referências:**

BHAVANI, A.LAKSHMI; NISHA, J. Dextran - The Polysaccharide With Versatile Uses. International Journal Of Pharma And Bio Sciences. 2010.

CHIELLINI, EMO ET AL. Biomedical Polymers: Sustainable Polymer Science And Technology. ISBN 0-306-46652-X. 2001.

CONTIERO, J. Estudo Da Produção De Dextranasacarase Por Leuconostoc Mesenteroides Ft 045 B, Tese de doutorado. Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro – São Paulo. 2004.

KULSHRESHTHA, SHWETA. Genetically Engineered Microorganisms: A Problem Solving Approach For Bioremediation. Bioremediation & Biodegradat. V. 4 Is. 4. 2013.

KUMAR, A.S., MODY, K, JHA, B. Bacterial Exopolysaccharides - A Perception. J Basic Microb. 47:103–117. 2007.

M. Nigam, A. Goyal, and S.S. Katiyar: “High yield purification of dextransucrase from Leuconostocmesenteroides NRRL B-512 by phase partitioning.” vol. 30, no. 2006, pp. 12–20, 2005.

NAESSENS, M.; WIM SOETAERTAND, A. C. , VANDAMM E. J. eLeuconostoc Dextransucrase And Dextran: Production, Properties And Applications. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 80, 845-860. 2005.

NIGAM, M.; GOYAL, A.; KATIYAR, S.S. High Yield Purification Of Dextransucrase From LeuconostocMesenteroidesNrnl B-512f By Phase Partitioning .2005.

SANDFORD. Advances In Carbohydrhe Chemistry And Biochemistry, Vol. 36 Exocellular, Microbial Polysaccharides. 1979

SOUZA & GARCIA-CRUZ. Fermentative Production Of Exocellular Polysaccharides By Bacteria SeminaCiênc. Agrar.,25, 331. 2004.

VETTORI ET AL. Dextran: Effect Of Process Parameters On Production, Purification And Molecular Weight And Recent Applications. Diálogos&Ciência. 31, 171-186. 2012.