

ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA DEXTRANA-SACARASE SINTETIZADA PELA LINHAGEM *Leuconostoc pseudomesenteroides* R2 ISOLADA DE REPOLHO COLETADO NA REGIÃO DO SEMI-ÁRIDO BAIANO

Ivelise Santiago Oliveira¹; Elinalva Maciel Paulo²; Sandra Assis³; Elke Dias Vilela⁴

1. Bolsista PIBIC, Graduanda em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: ivelisesantiago@hotmail.com
2. Orientador, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: elinalvamaciell@yahoo.com.br
3. Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana
4. Embrapa Meio ambiente, Jaguariúna, SP.

PALAVRAS-CHAVE: dextrana-sacarase, *Leuconostoc*, atividade enzimática

INTRODUÇÃO

Bactérias do gênero *Leuconostoc* normalmente sintetizam EPS do tipo dextrana. Este processo ocorre extracelularmente, pela enzima dextrana-sacarase (α -1,6-glucana 6- α -D-glucosiltransferase), que é excretada pela bactéria na presença do açúcar indutor, sendo o substrato transformado em polissacarídeo sem penetrar no interior da célula (Aquino, 2006). A dextrana-sacarase atua na molécula de sacarose, liberando a frutose, transferindo a molécula de glicose a uma molécula receptora para formar um polímero classificado como dextrana (Padmanabhan; Kim, 2002).

As dextranas e os seus derivados vêm adquirindo importância industrial devido às suas aplicações na indústria química, farmacêutica, alimentícia e petrolífera, e seus usos dependem de seu peso molecular (Paulo, 2010).

As dextranas podem ser produzidas durante o crescimento da bactéria, pela ação da enzima dextrana-sacarase extracelular lançada ao meio, denominado processo convencional, ou pela ação dessa enzima “in vitro”, na ausência das células. A atividade enzimática é expressa em termos de unidades de dextrana-sacarase (UDS), sendo 1 UDS a quantidade de enzima que converte 1 mg de sacarose em dextrana liberando mg de frutose nas condições do ensaio. A frutose é um açúcar redutor cuja quantificação é realizada pelo método de DNS (Miller, 1959).

Atualmente, a linhagem *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 é a mais utilizada em escala industrial para a produção de dextrana devido a sua capacidade produtiva e às propriedades da goma produzida, porém a dextrana-sacarase produzida por esta linhagem é uma enzima de baixa estabilidade e seu rendimento em dextrana de alto peso molecular é baixo. Assim, o presente trabalho teve como objetivo determinar a atividade enzimática da dextrana-sacarase sintetizada pela linhagem bacteriana nativa *Leuconostoc pseudomesenteroides* R2), visando a obtenção de novas linhagens produtoras desta enzima para utilização comercial.

MATERIAL E MÉTODOS

O micro-organismo utilizado para a determinação da atividade enzimática da dextrana-sacarase foi a linhagem nativa *Leuconostoc pseudomesenteroides* R2, isolada de repolho,

coletado em feiras livre da cidade de Feira de Santana. Esta linhagem produz dextrana de alta estabilidade e de alto peso molecular (Paulo, 2010).

Preparo do inóculo: alíquotas da cultura bacteriana congelada (em leite em pó desnatado reconstituído 20%) foram repicada em tubo de ensaio com 10 ml de MRS líquido estéril e incubado a 30° C/24h. Um mínimo de 3 repiques foi realizado até se obter o inóculo. Este procedimento foi feito para garantir a total reativação da linhagem que, quando conservada em baixas temperaturas, encontra-se em estado atividade metabólica extremamente reduzida.

Produção de enzima: foi realizado um ensaio para determinação da atividade enzimática do caldo centrifugado. O caldo foi obtido por meio de ensaios de fermentação conduzidos em frascos erlenmyer nas condições otimizadas por Paulo (2010) para a produção da dextrana , onde o meio era constituído por sacarose 100 g/l; extrato de levedura 20 g/l; fosfato de potássio dibásico 20 g/l; sulfato de magnésio 0,20 g/l; sulfato de manganês 0,01 g/l; sulfato ferroso 0,01 g/l; cloreto de cálcio 0,02 g/l; cloreto de sódio 0,01 g/l. com pH corrigido para 8,1, incubação a 28° C, sem aeração por 30h..

Determinação da atividade enzimática: alíquotas do caldo fermentativo foram retiradas a cada 3 horas para realizar o acompanhamento do crescimento bacteriano pela leitura da absorbância em espectrofotômetro UV a 600nm, para a determinação do pH do caldo fermentativo e para a determinação da atividade enzimática utilizando o método de Miller (1959). Este método consiste em reagir à amostra contendo os açúcares redutores com o reagente DNS (ácido dinitrossalissílico) a uma temperatura de 100°C, banho-maria, por 5 minutos. A proporção utilizada foi de 1 ml de DNS para 1 ml de amostra adicionados a tubos de ensaio. Após a reação, os tubos foram colocados em banho de gelo para resfriamento e diluídos com 10 ml de água destilada para a realização da leitura em espectrofotômetro a 540nm . A atividade foi determinada para enzima bruta (não purificada). Para a determinação da atividade enzimática, foi utilizado o sobrenadante do caldo fermentativo (centrifugação 10.000 rpm por 10 minutos a uma temperatura de 4°C). A unidade de atividade da dextrana-sacarase (UDS) é definida como a quantidade de enzima que converte 1,0 mg de sacarose em dextrana em uma hora, nas condições do ensaio (Hehre, 1955).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se a diminuição do pH do meio de cultivo à medida que ocorre o crescimento bacteriano (Figura 1). Esse resultado era esperado uma vez que a bactéria láctica possui metabolismo exclusivamente fermentativo, produzindo metabólitos ácidos, principalmente ácido lático. Esta diminuição do pH a níveis ótimo da atuação da dextrana-sacarase propicia a ativação desta enzima para atuar na degradação da sacarose. De acordo com Mibieli (2001) o pH ótimo para a ativação da dextrana sacarase é de 5.2.

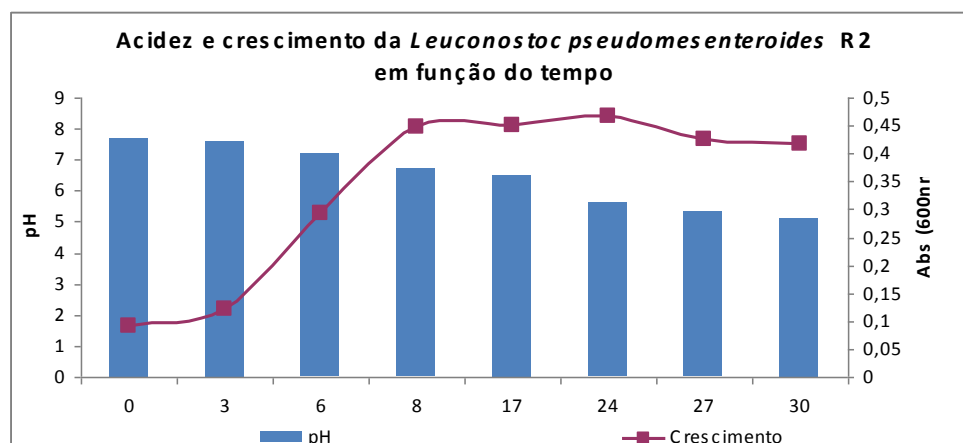
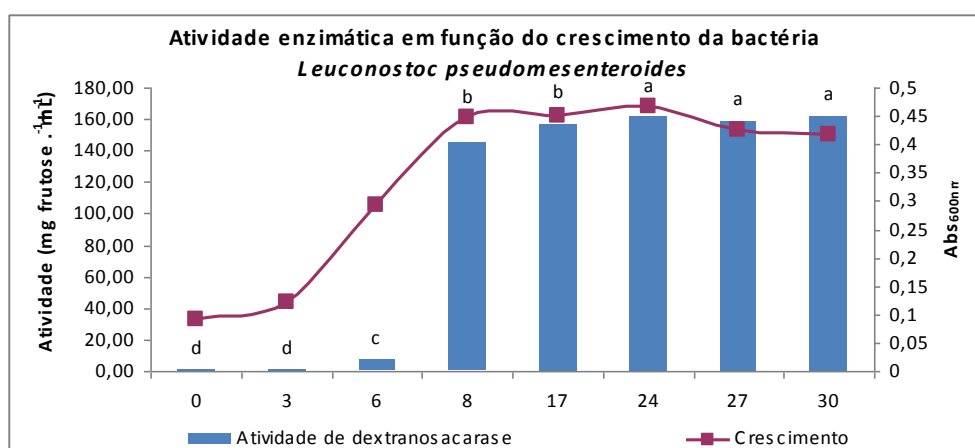


Figura 1. Acompanhamento da alteração do pH do meio de cultivo de *L. pseudomesenteroides* R2 versus o seu crescimento celular.

Observou-se que o pico da atividade enzimática ocorreu a partir das 8h, correspondendo ao início da fase estacionária de crescimento da bactéria. Sendo que o pico máximo da atividade foi com 24h, onde o caldo fermentativo atingiu um pH de 5,6 e uma atividade enzimática de 162,14 UDS (Figura 2), sendo maior do que a encontrada pela linhagem *Leuconostoc mesenteroides* B-512F que foi de 150,0 UDS (Motomitsu e Robty, 1999) e 66,0 UDS (Rodrigues, 2003) determinada nas mesmas condições de cultivo.

De acordo com os resultados das Figs. 1 e 2 nota-se que o crescimento celular com conseqüente diminuição do pH resulta no decréscimo da atividade enzimática, provavelmente devido a alta acidez do meio ocasionar a desnaturação da dextrana sacarase.



Letras iguais não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade, $R^2=0,9892$

Figura 2. Atividade enzimática da dextrana-sacarase sintetizada pelo *L. pseudomesenteroides* R2 em diferentes tempos de cultivo.

CONCLUSÃO

A linhagem *Leuconostoc pseudomesenteroides* R2 exibiu alta produção de enzima (162,14 UDS) quando comparada aos dados obtidos em literatura da linhagem de referência, *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. Indicando ser uma excelente linhagem para a obtenção desta enzima.

REFERÊNCIAS

- AQUINO, D.S. 2006. *Produção de dextrana por novas linhagens de bactérias isoladas de cana-de-ácucar*. Dissertação 74 f. (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de engenharia Química. Campinas, SP.
- MIBIELLI, G. M. 2001 *Síntese do Processo de Obtenção de Dextrana de Clínica e Frutose a partir de Sacarose*. Dissertação de Mestrado, Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- MILLER, G. L. 1959 Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugar, *Analytical Chemistry* 31(3): 426-428.
- MOTOMITSU, K. E ROBTY, J. F. 1999. Mechanism of the action of *Leuconostoc mesenteroides* 512 F dextranase. *Carbohydrate Research* 320:183-191.
- PADMANABHAN, P. C., KIM, D.S. 2002. Production of insoluble dextran using cell-bound dextranase of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-523. *Carbohydrate Research*, 337:1529-1533.
- PAULO, E. M. Produção de exopolissacarídeos (EPS) por bactérias lácticas visando encapsulação de *Lactobacillus acidophilus* La-5 pelo processo de Spray dring. Tese 220fl. (doutorado em Biotecnologia), Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana Bahis, 2010.
- RODRIGUES S, LONA L.M, FRANCO T.T. 2003. Efeito da concentração de fosfato na produção de dextranase por *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F. *Bioprocess Biosyst Eng.* 26: 57–62.