

PURIFICAÇÃO DA ENZIMA DEXTRANA-SACARASE A PARTIR DE *Leuconostoc pseudomesenteroides*

Isabela Souza Coccoresse¹; Claudio Roberto Nobrega Amorim²

1. Bolsista PROBIC/UEFS, Graduando em Bacharelado em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: isabelauefs@hotmail.com
2. Claudio Roberto Nobrega Amorim, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: amorim@uefs.com.br

PALAVRAS-CHAVE: Purificação; Dextrana-sacarase; *Leuconostoc*.

INTRODUÇÃO

A Dextrana é um dos exopolissacarídeos de maior importância industrial, largamente utilizada como aditivo, espessante, estabilizante e emulsificante em produtos alimentícios, cosméticos, imobilizante em processos cromatográficos, e também na área médica, agindo como anticoagulante e extensor de plasma, 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., 2006); (Vettori et al., 2012). Assim, os estudos que se voltam para a dextrana-sacarase têm um papel fundamental neste processo, principalmente, os que focam na purificação da enzima, cujo emprego na produção do polissacarídeo livre de células é um promissor campo quase inexplorado da indústria (Fattah et al., 2012). 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). O objetivo deste trabalho foi isolar e purificar a enzima dextrana-sacarase a partir da linhagem nativa R2 de *Leuconostoc pseudomesenteroides*.

MATERIAL E MÉTODOS OU METODOLOGIA (ou equivalente)

As amostras bacterianas produtoras de exopolissacarídeos a partir da sacarose utilizadas neste estudo foram cedidas gentilmente pela Prof^a. 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 obtidos de produtores da região de Feira de Santana-BA.

As colônias da linhagem nativa R2 de *Leuconostoc pseudomesenteroides* foram cultivadas em meio MRS Agar modificado, suplementado com sacarose em vez de glicose (Goyal&Katiyar, 1996), com pH 6.7, sob temperatura de 23°C com agitação, durante 72 horas. Após, foi verificada a atividade metabólica das bactérias sobre o substrato em diferentes concentrações nos meios de cultura. Foram otimizadas as condições de cultivo, sendo em seguida retiradas alíquotas de 2ml do meio para

conservação do microorganismo em solução de glicerol a 20% e mantidas em freezer à 20°C, e outra parte foi crescida em meio otimizado para produção da dextrana-sacarase.

Após o crescimento da bactéria, o cultivo foi centrifugado a 4.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante coletado. Foi adicionado o polietilenoglicol (PEG) pré-arrefecido a 0°C a 200 ml do sobrenadante isento de células para se obter as concentrações finais de 20, 25, 33, 40 e 50 (% v/v). Estas frações foram analisadas quanto à concentração proteica e submetidas à diálise utilizando um filtro com porosidade de 5 kDa. (Contiero, 2004).

O material dialisado foi aplicado a uma coluna de cromatografia de 600 x 15 mm (Figura 1) utilizando a resina Sepharose CL-4B, eluída com tampão acetato de sódio 20mM, pH 6,7. Foram coletadas frações de 5 mL em tubos de ensaio, que foram lidas em espectrofotômetro num comprimento de onda de 280 nm para a detecção da proteína (Goldfarb et al., 1951) (Figura 2).



Figura 1 – Coluna de cromatografia em operação.

RESULTADOS E/OU DISCUSSÃO (ou Análise e discussão dos resultados)

Na primeira corrida aplicada na coluna de cromatografia foram coletados 25 tubos com as frações; na segunda, 15; e na terceira 24 tubos.

Os perfis de eluição mostraram o aparecimento de picos que se concentraram em duas regiões. A primeira região foi percebida claramente em todas as corridas, mas a terceira corrida (N) foi a que mostrou melhor as duas regiões de pico. A análise dos picos de eluição permite sugerir a presença de várias proteínas nas amostras, provavelmente a partir do extrato bruto do meio de cultura, as frações não eluíram separadamente,



Figura 2 - Eluição da solução concentrada através da coluna de Sepharose CL - 4B

refletindo um resultado de baixa resolução (Figura 3). A concentração de picos em duas regiões diferentes pode indicar a presença de dextrana-sacarase em pelo menos um deles.

A quantidade medida de proteína por UV 280 nm de comprimento de onda revelou absorvâncias com uma grande variação; as duas regiões apresentaram valores de 1,627 – 1,523 unidades de absorvância (UA) na primeira região e 0,025 - 0,033 UA na segunda região (Tabela 1).

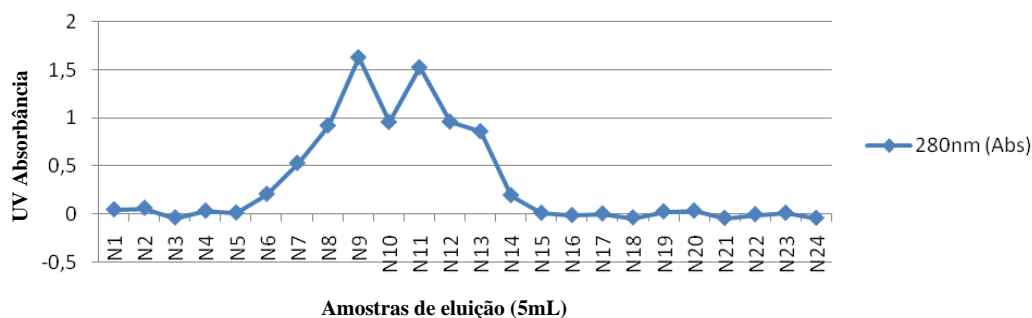


Figura 3 - Perfil de eluição de proteínas na coluna de Sepharose

Tabela 1. A absorbância de luz ultravioleta a um comprimento de onda de 280 nm nas amostras eluídas a partir de três passagens cromatográficas

Amostras	280nm (Abs)	Amostras	280nm (Abs)	Amostras	280nm (Abs)
L1	0,025	M1	0,022	N1	0,046
L2	0,128	M2	0,015	N2	0,062
L3	0,695	M3	0,015	N3	-0,038
L4	0,999	M4	0,134	N4	0,032
L5	1,402	M5	0,47	N5	0,013
L6	1,061	M6	0,798	N6	0,207
L7	0,964	M7	1,001	N7	0,529
L8	0,917	M8	1,045	N8	0,918
L9	0,07	M9	0,942	N9	1,627
L10	-0,023	M10	0,473	N10	0,955
L11	-0,014	M11	-0,017	N11	1,523
L12	-0,005	M12	-0,024	N12	0,959
L13	-0,015	M13	-0,025	N13	0,858
L14	-0,03	M14	-0,014	N14	0,194
L15	0,007	M15	-0,042	N15	0,01
L16	-0,028			N16	-0,014
L17	-0,004			N17	0,003
L18	-0,029			N18	-0,038
L19	-0,065			N19	0,025
L20	-0,021			N20	0,033
L21	-0,006			N21	-0,043
L22	-0,029			N22	-0,005
L23	-0,007			N23	0,01
L24	0,011			N24	-0,042
L25	0,001				

Legenda: L = primeira corrida cromatográfica de eluição realizada na coluna.

M = segunda corrida. N = terceira corrida.

CONSIDERAÇÕES FINAIS (ou Conclusão)

Os resultados obtidos na cromatografia não foram bons e espera-se que novos experimentos que avaliam outros métodos de concentração de meio de caldo, tais como liofilização, irão facilitar a obtenção da fração de proteína e reduzir as perdas de material durante o processo. Espera-se também que utilize outra resina de cromatografia, pois assim, com um campo de resolução diferente possa melhorar o perfil de separação.

REFERÊNCIAS

- BHAVANI, A. Lakshmi; NISHA, J. Dextran - The Polysaccharide With Versatile Uses. Int J Pharm Biol Sci, v. 1, n. 4, p. 569-573, 2010.
- CHIELLINI, Emo et al. Biomedical Polymers: Sustainable Polymer Science And Technology. ISBN 0-306-46652-X. 2001.
- CONTIERO, J. Estudo Da Produção De Dextrana sacarase Por *Leuconostoc mesenteroides* Ft 045 B, Tese de doutorado. Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro – São Paulo. 2004.
- FATTAH, Ahmed F. Abdel et al. Production And Properties Of Dextranucrase By Free And Immobilized Cells Of *Leuconostoc paramesenteroides*. Egypt Pharmaceut J, v. 11, n. 1, p. 42, 2012.
- GOLDFARB, A. Robert et al. The ultraviolet absorption spectra of proteins. J Biol Chem, v. 193, p. 397-404, 1951.
- GOYAL, A.; KATIYAR, S.S. Regulation Of Dextranucrase Productivity Of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F By The Maintenance Media. J. Gen. Appl. Microbiol., v. 42, n. 1, p. 81-85, 1996.
- JEANES, A. et al. Characterization And Classification Of Dextrans From Ninety-Six Strains Of Bacteria. J. Am. Chem. Soc., v. 76, n. 20, p. 5041-5052, 1954.
- NIGAM, M.; GOYAL, A.; KATIYAR, S.S. High Yield Purification Of Dextranucrase From *Leuconostoc mesenteroides* Nrrl B-512f By Phase Partitioning. J. Food. Biochem., v. 30, n. 1, p. 12-20, 2006.
- PAULO, E. M. et al. Na Alternative Method For Screening Lactic Acid Bacteria For The Production Of Exopolysaccharides With Rapid Confirmation. *Ciênc. Tecnol. Aliment. (Campinas)* v. 32, n. 4, 2012.
- PAULO, E. M. et al. Production, Extraction And Characterization Of Exopolysaccharides Produced By The Native *Leuconostoc pseudomesenteroides* R2 Strain. An. Acad. Bras. Ciênc. v.84 n. 2, 2012.
- ROBYT, John. F. Mechanism In The Glucanucrase Synthesis Of Polysaccharides And Oligosaccharides From Sucrose. Adv Carbohyd Chem Bi, San Diego, v. 51, p. 133-168, 1995.
- VETTORI, et al. Dextran: Effect Of Process Parameters On Production, Purification And Molecular Weight And Recent Applications. *Diálogos Ciênc.* 31, 171-186.2012.