

EFEITO DE COMPONENTES DE MEIO DE CULTURA SOBRE A RECUPERAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS

*Pintado^{*1}, A.I.E.; Ferreira², J.A.; Pintado¹, M.E.; Coimbra², M.A. e Malcata¹, F.X.*

¹ Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa, Rua Dr. António Bernardino de Almeida, P-4200-072 Porto

² Universidade de Aveiro, P-3810-193 Aveiro

*E-mail: aipintado@mail.esb.ucp.pt, Tel: 225580045, Fax: 225090351

Palavras-chave: Polissacarídeos extracelulares, interferentes, açúcares, lactose, xantana

Resumo: Os exopolissacarídeos (EPS) são polissacarídeos microbianos, que podem ser produzidos por diferentes microrganismos – incluindo as bactérias lácticas. Ao longo dos últimos anos, têm sido desenvolvidos diferentes métodos de análise de EPS – os quais tipicamente envolvem a combinação de técnicas de isolamento (ou recuperação), purificação e quantificação (em meios de cultura). Os meios de crescimento podem ser quimicamente definidos ou semi-definidos aos quais são muitas vezes adicionadas fontes de lactose como potenciadores de crescimento. A lactose pode no entanto surgir como interferente na quantificação dos EPS recolhidos, mesmo após processos de diálise.

Com o objectivo de avaliar até que ponto um meio quimicamente definido pode interferir na recuperação de EPS e na determinação da sua composição em açúcares, foram testadas diferentes soluções – modelo, tendo como base o meio MRS Broth. A influência da adição de lactose ao meio foi igualmente avaliada. Para aferir a eficácia das técnicas utilizadas na recuperação de EPS, foi também adicionado aos diferentes meios estudados um EPS modelo, a goma xantana a 0.1% (m/v). Todas as amostras foram submetidas a dois métodos de precipitação de proteínas: tratamento com ácido tricloroacético (TCA) e com ácido sulfo-salicílico e os polissacarídeos presentes no material solúvel foram precipitados com etanol. A eficiência de ambos os procedimentos no que diz respeito à recuperação de polissacarídeos foi avaliada por análise da composição em açúcares das fracções precipitadas em etanol e dos respectivos sobrenadantes. Os monossacarídeos neutros foram determinados por cromatografia em fase gasosa após hidrólise das ligações glicosídicas com ácido sulfúrico e os ácidos urónicos foram determinados colorimetricamente. A técnica de precipitação com TCA demonstrou ser mais eficiente na eliminação de interferentes, praticamente em todas as condições testadas. Verificou-se igualmente que no caso da combinação de meio MRS com lactose e xantana, ambas as técnicas se revelaram pouco eficazes na eliminação de interferentes. Neste caso a perda de xantana para os sobrenadantes da precipitação em etanol é superior ao das outras amostras.

1. INTRODUÇÃO

Os polissacarídeos são compostos constituintes de todos os microrganismos, podendo ser produzidos por uma grande variedade de microrganismos – de entre os quais as bactérias lácticas (BL). Podem ser utilizados como aditivos na indústria alimentar, e encontram uma vasta gama de aplicações como agentes espessantes, estabilizantes, emulsionantes e gelificantes. Os polissacarídeos extracelulares, ou exopolissacarídeos (EPS), podem ser excretados directamente para o meio de cultura sob a forma de muco, ou então encontrar-se na forma de camada aderente à volta da parede celular a qual se denomina de cápsula [6]. A quantidade de EPS produzidos pelas BL está intimamente relacionada com as condições específicas de crescimento da cultura bacteriana, e igualmente com a composição do meio de cultura. Meios de cultura sintéticos – tais como Man Rogosa Sharpe (MRS), All Purpose Tween (ATP), e alguns meios complexos enriquecidos com leite ou soro de leite, são habitualmente usados em estudos de produção de EPS. Muitos desses meios contêm extracto de levedura, extracto de carne, peptonas, proteínas ou lactose (entre outros nutrientes), os

quais, individualmente e em conjunto, podem interferir na composição da estrutura dos EPS [1, 4, 5]. Um estudo recente, cujo objectivo era melhorar as metodologias de quantificação, confirmou que açúcares de baixo peso molecular (p.ex. lactose e glucose) podem interferir na solubilidade dos EPS em etanol – conduzindo, como consequência a erros na sua quantificação [3].

O principal objectivo deste trabalho foi assim o de avaliar de que forma o meio MRS e a lactose podem interferir na recuperação e quantificação dos EPS.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Preparação de soluções modelo

Foram testadas diversas soluções modelo, tendo como base o meio de cultura MRS, uma solução de lactose a 1.5% (m/v) e uma solução de xantana a 0.1% (m/v). Estas soluções foram tratadas por duas técnicas distintas de precipitação de proteínas, combinadas de acordo com o seguinte plano experimental:

- Meio de cultura MRS; meio de cultura MRS enriquecido com 1.5% (m/v) de lactose (MRS+L); meio de cultura MRS enriquecido com 0.1% de xantana (m/v) (MRS+X); e meio de cultura MRS enriquecido com 1.5% (m/v) de lactose e 0.1% (m/v) de xantana (MRS+X+L).

- Solução aquosa com 1.5% (m/v) de lactose (L), e solução aquosa de 0.1% (m/v) de xantana e 1.5% (m/v) de lactose (X+L).

- Solução aquosa de 0.1% (m/v) de xantana (X).

Foram preparados 100 mL de cada uma das soluções acima descritas; a última solução foi também analisada sem recorrer às técnicas de precipitação e isolamento com etanol descritas em 2.2.

2.2. Métodos de precipitação das proteínas e isolamento do exopolissacarídeo

Foram medidos rigorosamente 10 mL (em duplicado) das soluções anteriormente descritas, as quais foram tratadas por dois processos diferentes, com o intuito de precipitar proteínas contidas nas referidas soluções. Um dos tratamentos consistiu na adição de 100 µL de Pronase E a 5% (m/v) a cada alíquota de solução, sendo então colocadas num banho a 37 °C durante 1 h; seguidamente, foi adicionado 1 volume de TCA a 20% (m/v), e as amostras foram mantidas à temperatura ambiente durante 1 h. O outro tratamento consistiu da adição de 0.2 g de ácido sulfo-salicílico (2% m/v) a cada alíquota de solução, sendo colocadas durante uma 1 h a 4 °C. De seguida, todas as amostras, foram centrifugadas (a 4000 r.p.m., durante 20 minutos a 4° C). Os sobrenadantes foram submetidos a um novo processo de precipitação com três volumes de etanol frio e armazenados durante a noite a 4 °C. As amostras foram de novo centrifugadas (a 4000 r.p.m., durante 20 minutos a 4° C), tendo-se recolhido os precipitados e os respectivos sobrenadantes para posterior análise de açúcares.

2.3 Análise de açúcares

As amostras foram inicialmente dispersas em água, e dialisadas usando uma membrana com exclusão de peso molecular de 12 kDa. Os monossacarídeos neutros foram determinados por cromatografia em fase gasosa após hidrólise com ácido sulfúrico e conversão aos seus acetatos de alditol, num cromatógrafo de gás Carlo-Erba 6000, equipado com um detector FID; foi utilizada uma coluna DB-225 (J&W) com 30 m de comprimento, 0.25 mm de diâmetro interno e 0.15 µm de espessura do filme, usando o seguinte programa de temperaturas: 220 °C durante 5 min e rampa de 20 °C/min até 230 °C, mantendo-se esta

temperatura durante 6 min; o caudal do gás de arraste (H_2) foi de 1 mL/min. O injectador encontrava-se à temperatura de 220 °C, e o detector a 230 °C; a injeção (2 μ L) foi efectuada em modo *split*, com uma razão de 1:60.

Os ácidos urónicos foram determinados colorimetricamente conforme o método descrito por Coimbra *et al.* [2]. As amostras foram preparadas por hidrólise em H_2SO_4 a 72% (m/v) durante 3 h a 20 °C, seguida de 1 h a 100 °C sob exposição a 1M H_2SO_4 . Foi construída uma curva de calibração, utilizando ácido galacturónico como padrão.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 mostra a contribuição do meio MRS, MRS+L, MRS+X e MRS+X+L para os açúcares encontrados nos precipitados e sobrenadantes de etanol de material tratado com TCA e ácido sulfo-salicílico. Nestes cálculos a contribuição da xantana nos meios onde estava presente foi descontada pois apenas se pretendia avaliar o efeito da sua presença na quantidade de interferentes obtidos. Pela inspecção da Figura 1, conclui-se que no caso dos meios MRS, MRS+L e MRS+X o método de precipitação com TCA é o mais eficiente na minimização de açúcares interferentes. Este facto evidencia-se pela menor quantidade de açúcares recuperados nas fracções de TCA quando comparadas com as de ácido sulfo-salicílico. Estes interferentes devem-se principalmente à glucose – uma vez que o meio MRS contém 2% (m/v) deste açúcar. No meio MRS+X+L, observou-se que a quantidade total de açúcares interferentes após os tratamentos quer com TCA quer com ácido sulfo-salicílico é superior quando comparada com os outros casos. É possível que haja uma co-precipitação em simultâneo da lactose com a xantana, o que poderá contribuir para um aumento dos açúcares verificado nos precipitados. Conclui-se desta forma que embora o tratamento com TCA se apresente como mais eficiente na supressão de contaminantes em sistemas onde existe apenas meio e xantana, a presença de lactose torna indiferente a utilização de qualquer um dos métodos, sendo ambos pouco eficientes.

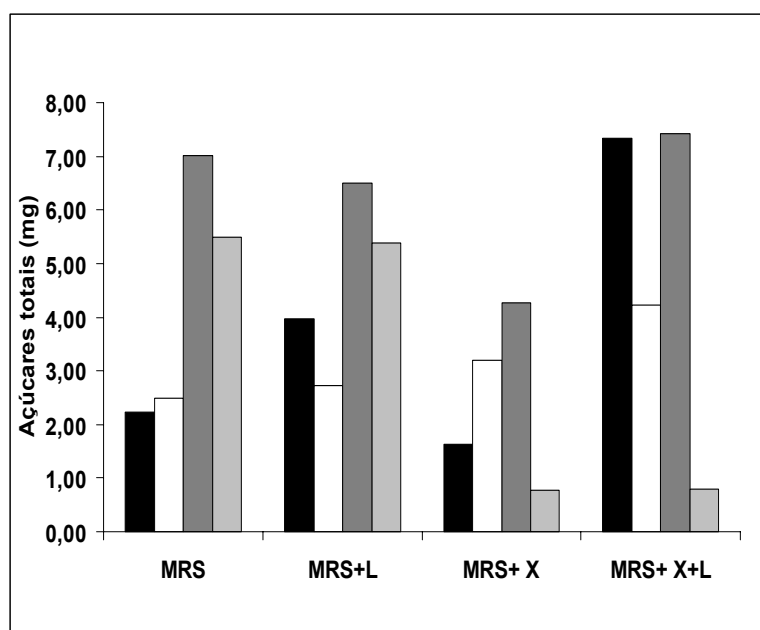


Figura 1- Teor de açúcares totais, relativos aos açúcares interferentes (excluindo a xantana), das soluções modelo: **MRS** (meio de cultura MRS); **MRS+L** (meio de cultura MRS enriquecido com 1,5% (m/v) de lactose); **MRS+X** (meio de cultura MRS enriquecido com 0,1% (m/v) de xantana); e **MRS+X+L** (meio de cultura MRS broth enriquecido com 1,5% de lactose e 0,1% de xantana). ■ - precipitado resultante do tratamento com TCA; □ - sobrenadante resultante do tratamento com TCA; ■ - precipitado resultante do tratamento com ácido sulfo-salicílico; e ■ - sobrenadante resultante do tratamento com ácido sulfo-salicílico.

A análise do EPS xantana revelou que a precipitação por TCA promove uma maior recuperação de polissacarídeo em relação ao tratamento com ácido sulfo-salicílico (Figura 2). A presença de lactose não parece influenciar significativamente os resultados observados

apenas com o EPS. Com a utilização de meio MRS e MRS+L observa-se uma diminuição da quantidade de xantana recuperada. A percentagem de recuperação da xantana a partir de meio MRS e MRS com adição de lactose foi de 21,8% para ambas as condições sob precipitação com TCA. Para a precipitação com ácido sulfo-salicílico estes valores foram de 5,0% para o meio MRS com xantana e 12,4% para o meio MRS com xantana e lactose, valores bastante inferiores aos obtidos usando TCA. A utilização de TCA assume-se assim como o melhor método para a recuperação deste EPS. Para além deste efeito observa-se, com a presença de MRS (MRS+X) e MRS+X+L, uma diminuição significativa da xantana precipitada em etanol. Esta permanece neste caso em solução, explicando assim a maior quantidade de açúcares encontrados nos sobrenadantes em relação aos precipitados. O conjunto dos resultados obtidos indicia que a lactose dos meios de cultura é recolhida de forma significativa juntamente com os EPS após tratamento com TCA e ácido sulfo-salicílico. Conclui-se ainda que a técnica de precipitação de proteínas com TCA revelou ser mais eficiente na obtenção de EPS para a maioria das situações testadas.

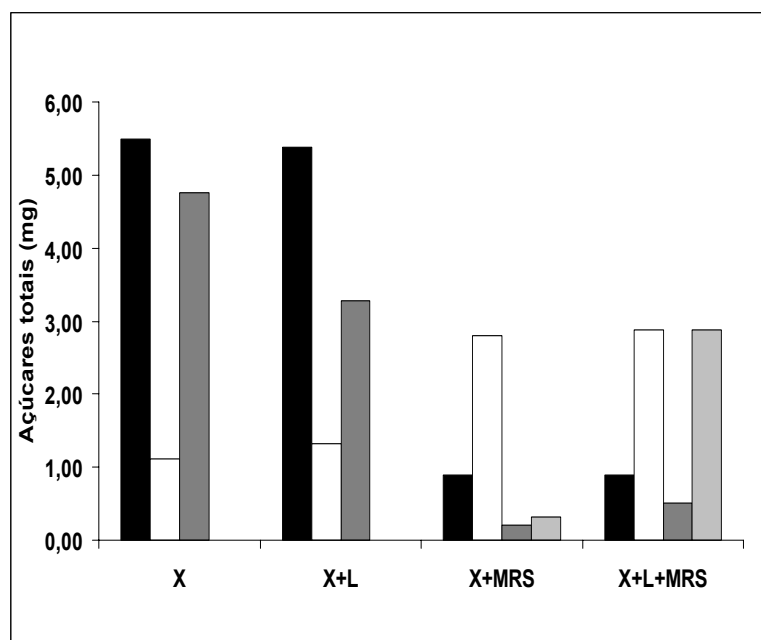


Figura 2- Teor de açúcares totais, relativos ao EPS xantana, das soluções modelo: **MRS** (meio de cultura MRS); **MRS+L** (meio de cultura MRS enriquecido com 1,5% (m/v) de lactose); **MRS+X** (meio de cultura MRS enriquecido com 0,1% (m/v) de xantana); e **MRS+X+L** (meio de cultura MRS enriquecido com 1,5% (m/v) de lactose e 0,1% (m/v) de xantana). ■ - precipitado resultante do tratamento com TCA; □ - sobrenadante resultante do tratamento com TCA; ■ - precipitado resultante do tratamento com ácido sulfo-salicílico; ■ - sobrenadante resultante do tratamento com ácido sulfo-salicílico.

4. REFERÊNCIAS

- [1] Degeest, B.; Vaningelge m; F., Laws, A. and De Vuyst, L. 2001 UDP-N-acetylglucosamine 4-epimerase activity indicates the presence of N-acetylgalactosamine in exopolysaccharides of *Streptococcus thermophilus* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 3976–3984.
- [2] Coimbra, M. A.; Delgadillo, I.; Waldron, K.W.; Selvendran, R.R.. In H. F. Linskens and J.F. Jackson (eds.), *Modern Methods of Plant Analysis* Vol. 17, pp. 19-44. (Berlin, Springer-Verlag.) (1996).
- [3] GOH K.; HAISMAN D.; ARCHER R. AND SINGH H. 2005 Evaluation and modification of existing methods for the quantification of exopolysaccharides in milk-based media. *Food Research International*, 38: 605-613.
- [4] KIMMEL, S. A. AND ROBERTS, R. F. 1998 Development of a growth medium suitable for exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* RR. *International Journal of Food Microbiology*, 40: 87-92.
- [5] LAWS, A.; GU, Y. AND MARSHALL, V. 2001. Biosynthesis, characterisation, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Biotechnology Advances*, 19: 597-625
- [6] SUTHERLAND, I. W. 1972. Bacterial exopolysaccharides. *Advances in Microbiology and Physiology*, 8: 143-213