

---

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA APLICADA  
(DOUTORADO)

---

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEO (EPS) BACTERIANO

GUILHERME DEOMEDESSE MINARI

Dissertação/tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutorado em Microbiologia Aplicada.

**Fevereiro - 2022**

---

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA APLICADA  
(DOUTORADO)

---

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEO (EPS) BACTERIANO

GUILHERME DEOMEDESSE MINARI

Dissertação/tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutorado em Microbiologia Aplicada.

**Rio Claro – SP  
2022**

M663p

Minari, Guilherme Deomedesse

Produção e caracterização de Exopolissacarídeo (EPS) bacteriano /  
Guilherme Deomedesse Minari. -- Rio Claro, 2022  
80 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),  
Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientadora: Jonas Contiero

Coorientadora: Daiane Sass

1. Polímero Extracelular. 2. Glicose. 3. Manose. 4. Galactose;  
Lactobacillus.. 5. Arabinose; Biodegradáveis. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de  
Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.




CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEO (EPS) BACTERIANO

**AUTOR: GUILHERME DEOMEDESSE MINARI**


**ORIENTADOR: JONAS CONTIERO**

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), área: Microbiologia Aplicada pela Comissão Examinadora:

  
Prof. Dr. JONAS CONTIERO (Participação Virtual)  
Departamento de Biologia Geral e Aplicada / IB Rio Claro

  
Prof. Dra. SUSAN MICHELZ BEITEL (Participação Virtual)  
Departamento de Biologia / Universidade Estadual do Centro-Oeste

  
Prof. Dra. IOLANDA CRISTINA SILVEIRA DUARTE (Participação Virtual)  
Departamento de Biologia / Universidade Federal de São Carlos - UFSCar - Sorocaba

  
Documento assinado digitalmente  
Alex Fernando de Almeida  
Data: 08/02/2022 13:07:46-0300  
Verifique em <https://verifical.br>

Prof. Dr. ALEX FERNANDO DE ALMEIDA (Participação Virtual)  
Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia / Universidade Federal do Tocantins

  
Prof. Dr. GUILHERME GARCIA DA SILVEIRA (Participação Virtual)  
Instituto de Ciências Exatas e Naturais do Pontal / Universidade Federal de Uberlândia

Rio Claro, 08 de fevereiro de 2022

Título alterado para: "Produção e Caracterização de Exopolissacarídeo (EPS) Bacteriano"

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**Guilherme Deomedesse Minari** – nascido em Jaboticabal, estado de São Paulo, em 21 de novembro de 1991. Ingressou no curso de Tecnologia em Biocombustíveis em março de 2010 pelo Centro Paula Souza – Faculdade de Tecnologia (FATEC) de Jaboticabal, Jaboticabal – SP, obtendo o título de Tecnólogo em Biocombustíveis em dezembro de 2012. Durante sua graduação foi estagiário dos Laboratórios de Nematologia e Saneamento Ambiental, Departamentos de Fitossanidade e Engenharia Rural, respectivamente, ambos da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP-Jaboticabal. Seu trabalho de conclusão de curso foi realizado no laboratório de microbiologia da FATEC Jaboticabal, tendo como objetivo avaliar o controle de contaminantes bacterianos na fermentação etanólica, adotando como antimicrobianos naturais óleo de orégano e extrato de lúpulo. Em agosto de 2013 ingressou no programa de Pós-Graduação, curso de Mestrado em Microbiologia Agropecuária, pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP Câmpus de Jaboticabal (FCAV/UNESP), sob orientação das Professoras Dra. Lucia Maria Carareto Alves e Dra. Luciana Maria Saran, ambas do Departamento de Tecnologia, obtendo o título de mestre em microbiologia agropecuária em 2016. Em 2016 ingressou no curso de doutorado em microbiologia aplicada pelo Instituto de Biociências – Câmpus Rio Claro, sob orientação do prof. Dr. Jonas Contiero e da profa. Dra. Daiane Cristina Sass, ambos do departamento de Microbiologia e Bioquímica.

“As nuvens mudam sempre de posição, mas são sempre nuvens no céu. Assim devemos ser todo dia, mutantes, porém leais com o que pensamos e sonhamos; lembre-se, tudo se desmancha no ar, menos os pensamentos”.

Paulo Beleki

Aos meus pais, Cristiano e Liliane, por me apoiarem e acreditarem em mim.

**Dedico**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, em primeiro lugar, pois em todos os momentos Ele esteve ao meu lado, me capacitando.

Aos meus pais, Cristiano e Liliane, por confiarem e acreditarem em mim.

Ao meu orientador Prof. Dr. Jonas Contiero, pela orientação, apoio e transferência de conhecimentos.

À coorientadora Profa. Dra. Daiane Cristina Sass, pelos ensinamentos, dedicação e acima de tudo pela amizade.

Aos parceiros prof Dr. Moacir do instituto de química da UFSCAR, aos seus alunos, João e Marília pelo apoio nas análises.

À equipe do departamento de química da UNESP – Araraquara, principalmente ao Dr. Rodolfo pela compreensão e ajuda nas análises desenvolvidas.

Ao prof. Dr. Michel pelo apoio e ensinamentos e a sua aluna Caroline.

Aos meus colegas do Laboratório de Fermentação Industrial e IPBEN.

A toda minha família.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq., pela concessão da bolsa de estudos.

E por fim, a todos que de alguma forma fizeram parte deste trabalho.

**A vocês, meu singelo agradecimento!**



## Resumo

Os EPS são polímeros naturais, não tóxicos, biodegradáveis e desempenham um papel importante em uma variedade de mecanismos biológicos. São macromoléculas secretadas por microrganismos compostas por resíduos de monossacarídeos e derivados de açúcares divididos em dois grupos de acordo com sua composição: homopolissacarídeos e heteropolissacarídeos, sendo a diferença entre estes dois grupos os tipos de açúcares que os compõem.

A produção de EPS via *Lactobacillus* tem basicamente glicose e lactose como fontes de carbono e, neste estudo, foi demonstrada a possibilidade de utilizar resíduos como melão de cana-de-açúcar e glicerol como fonte de carbono para produção deste polímero. Para tal, um screening entre 22 cepas de *Lactobacillus* foi realizado a fim de se determinar a cepa que apresentasse a maior produção, com base no peso seco a 37 °C, de EPS produzido a partir da composição do meio contendo glicerol como principal fonte de carbono. O processo fermentativo para produção de EPS foi realizado em triplicata em 3 L de meio semi definido (SDM) modificado em bioreator (Zeta). O EPS obtido foi extraído, dialisado, liofilizado e purificado. A quantidade de EPS foi mensurada através da concentração de açúcares totais presente nas amostras por meio do método do fenol ácido sulfúrico e o teor de proteínas foi quantificado de acordo com o método de Lowry. O *Lactobacillus casei* foi capaz de crescer em meios utilizando fontes de carbono alternativas e capaz de produzir EPS. A caracterização da molécula foi realizada em HPLC, cromatografia por exclusão de tamanho, GC-MS, FT-IR e RMN  $^1\text{H}^{13}\text{C}$ . Os resultados obtidos sugerem que o EPS obtido utilizando glicerol e glicose como fonte de carbono é classificado como heteropolissacarídeo composto por glicose e manose com  $106 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , e 39,4% de carboidratos e 18% de proteínas, enquanto o EPS obtido utilizando melão como fonte de carbono é caracterizado como heteropolissacarídeo composto por glicose, galactose e arabinose com  $81 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , 52,9% de carboidratos e 11,69% de proteínas. A existência dos polissacarídeos foi comprovada pelas análises de FT-IR e RMN.

**Palavras chave:** polímero extracelular, glicose, manose, galactose, arabinose, biodegradáveis, *Lactobacillus*.

## Abstract

EPS are natural, non-toxic, biodegradable polymers and play an important role in a variety of biological mechanisms. They are macromolecules secreted by microorganisms composed of monosaccharide residues and sugar derivatives divided into two groups according to their composition: homopolysaccharides and heteropolysaccharides, the difference between these two groups being the types of sugars that compose them.

The production of EPS via *Lactobacillus* basically has glucose and lactose as carbon sources and, in this study, the possibility of using residues such as sugarcane molasses and glycerol as a carbon source for the production of this polymer was demonstrated. For this, a screening between 22 strains of *Lactobacillus* was carried out in order to determine the strain that presented the highest production, based on dry weight at 37 °C, of EPS produced from the composition of the medium containing glycerol as the main carbon source. The fermentation process for the production of EPS was carried out in triplicate in 3 L of semi-defined medium (SDM) modified in a bioreactor (Zeta). The EPS obtained was extracted, dialyzed, lyophilized and purified. The amount of EPS was measured through the concentration of total sugars present in the samples using the phenol sulfuric acid method and the protein content was quantified according to the Lowry method. *Lactobacillus casei* was able to grow in media using alternative carbon sources and was able to produce EPS. The characterization of the molecule was performed using HPLC, size exclusion chromatography, GC-MS, FT-IR and <sup>1</sup>H<sup>13</sup>C NMR. The results obtained suggest that the EPS obtained using glycerol and glucose as carbon source is classified as a heteropolysaccharide composed of glucose and mannose with 106 g.mol<sup>-1</sup>, and 39.4% of carbohydrates and 18% of proteins, while the EPS obtained using molasses as a carbon source is characterized as a heteropolysaccharide composed of glucose, galactose and arabinose with 81 g.mol<sup>-1</sup>, 52.9% of carbohydrates and 11.69% of proteins. The existence of polysaccharides was confirmed by FT-IR and NMR analyses.

**Keywords:** Extracellular polymer, glucose, mannose, galactose, arabinose, biodegradable, *Lactobacillus*.

## SUMÁRIO

	Página
SUMÁRIO.....	i
LISTA DE TABELAS .....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE ABREVIACÕES.....	v
1. Considerações Gerais.....	9
1.1. Introdução.....	9
1.2. REVISÃO DE LITERATURA.....	11
1.2.1. Exopolissacarídeo (EPS).....	11
1.2.2. Função fisiológica dos EPS nos microrganismos .....	12
1.2.3. Composição dos EPS.....	13
1.2.4. Carboidratos e proteínas .....	13
1.2.5. DNA extracelular, Biosurfactantes e Lipídeos.....	16
1.2.6. Produção de EPS .....	17
1.2.7. Bactérias produtoras de ácido láctico .....	17
1.2.8. Fatores químicos, físicos e genéticos relacionados a síntese de EPS.....	18
1.2.9. Técnicas de extração, purificação e caracterização de EPS.....	21
1.2.10. Aplicação do EPS.....	23
1.2.11. Fontes de carbono promissora em biotecnologia .....	25
1.2.11.1. Glicerol .....	25
1.2.11.2. Melaço .....	26
1.3. Objetivos.....	28
1.3.1. Objetivos gerais .....	28
1.3.2. Objetivos específicos.....	28
2. UTILIZAÇÃO DE GLICEROL ASSOCIADO COM GLICOSE E MELAÇO PURO PARA PRODUÇÃO DE EPS A PARTIR DE <i>LACTOBACILLUS CASEI</i> .....	29
2.1. Introdução.....	29
2.2. Material e métodos.....	31

2.2.1	Screening de bactérias potencialmente produtoras de EPS.....	31
2.2.2	Microrganismo .....	33
2.2.3	Meios de cultura.....	34
2.2.3.1	MRS.....	34
2.2.3.2	SDM (Meio Semi Definido) .....	34
2.2.4	Processo fermentativo .....	34
2.2.5	Métodos analíticos .....	35
2.2.5.1	Processamento das amostras .....	35
2.2.6	Avaliação da produção de EPS.....	35
2.2.7	Extração de EPS.....	35
2.2.8	Isolamento e purificação do EPS .....	36
2.2.9	Caracterização do EPS .....	36
2.2.9.1	Análise do EPS por HPLC .....	36
2.2.10	Cromatografia por exclusão de tamanho .....	36
2.2.11	Análise do EPS por CG-MG .....	37
2.2.12	Análise do EPS por FT-IR .....	38
2.2.13	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) unidimensional $^1\text{H}^{13}\text{C}$ ..	39
2.3	Resultados e discussão .....	39
2.3.3.1	Variação do pH durante o processo fermentativo em erlenmeyer.....	39
2.3.3.2	Seleção de microrganismos com potencial para a produção de EPS.....	41
2.3.3.3	Determinação de açúcares totais .....	43
2.3.3.4	Fermentação do isolado Ke8 ( <i>L. casei</i> ) em batch utilizando frascos erlenmeyers	45
2.3.3.5	Cinética de crescimento e produção .....	47
2.3.3.6	Extração e purificação do EPS .....	52
2.3.3.7	Análise do EPS produzido a partir de glicerol/glicose e melão por HPLC.....	54
2.3.3.8	Cromatografia por exclusão.....	56
2.3.3.9	Composição monossacarídea do EPS, análise CG-MS .....	58

2.3.3.10	Análise do EPS obtido por FT-IR.....	60
2.3.3.11	Análise do EPS por RMN.....	63
2.3	Conclusão.....	65
3	Considerações Finais.....	67
4	Referências .....	68

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Micro-organismos utilizados para estudo da produção de EPS .....	32
Tabela 2. Parâmetros utilizado no CG-MS .....	38
Tabela 3. Resultados das análises obtidos nas coletas de hora 0 e hora 20.....	44

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas químicas de alguns EPS .....	15
Figura 2. Valores iniciais e finais de pH no processo fermentativo para obtenção de EPS...40	
Figura 3. <i>Screening</i> da produção de EPS por bactérias potencialmente produtoras de EPS em meio contendo glicerol como fonte de carbono.....41	
Figura 4. Produção ( $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) de EPS entre os isolados utilizando-se xilose como fonte de carbono.....42	
Figura 5. Teores de açúcares totais ( $\text{Abs}_{485\text{nm}}$ ) no EPS. ....43	
Figura 6.: Curva de calibração e equação da reta ( $\text{Abs}_{485\text{nm}} = 0,0088\cdot[\text{açúcares}] + 0,1959$ ). 45	
Figura 7. Monitoramento do crescimento (A) e do processo fermentativo, em erlenmeyer, para produção de EPS por <i>Lactobacillus casei</i> Ke8 (B), sob 130 rpm, 37 °C e pH de 6.6....47	
Figura 8. Correlação entre crescimento bacteriano e produção de EPS em meio SDM durante 128 h de fermentação a 37 °C sob agitação de 130 rpm em meio contendo glicerol e glicose como fonte de carbono. ....49	
Figura 9. Correlação entre crescimento bacteriano e produção de EPS durante 120 h de fermentação a 37 °C sob agitação de 130 rpm em meio contendo melaço como fonte de carbono.....52	
Figura 10. Curva de calibração para obtenção dos valores de carboidratos contidos na amostra ( $\text{Abs}_{485\text{nm}} = 89,98\cdot[\text{açúcares}] - 3,2143$ ) .....53	
Figura 11. Curva de Calibração para obtenção dos valores de proteínas contidas na amostra ( $\text{Abs}_{600\text{nm}} = 2,0178 [\text{proteínas}] - 0,004$ ).....54	
Figura 12. Cromatograma de HPLC mostrando a composição de monossacarídeo de EPS hidrolisado. O pico em 10,416 corresponde à glicose e o pico em 10,800 representa manose. ....55	
Figura 13. Cromatograma de HPLC mostrando a composição de monossacarídeo de EPS hidrolisado. O pico em 10,416 corresponde à glicose e o pico em 10,800 representa manose. ....56	
Figura 14. Cromatograma por técnica de cromatografia de exclusão mostrando a massa do EPS obtido a partir de glicerol e glicose como fonte de carbono utilizando coluna <i>Showa denko sb 806</i> . ....57	
Figura 15. Cromatograma por técnica de cromatografia de exclusão mostrando a massa do EPS obtido a partir de melaço como fonte de carbono utilizando coluna <i>Showa denko sb 806</i> . ....58	
Figura 16. Perfil de fragmentação dos acetatos de alditóis após derivatização química da molécula de EPS obtido por <i>L. casei</i> . ....60	

Figura 17. Espectro na região do infravermelho com transformada de <i>Fourier</i> (FT-IR) do exopolissacarídeo produzido por <i>L. casei</i> utilizando glicerol e glicose como fonte de carbono. ....	62
Figura 18. Espectro na região do infravermelho com transformada de <i>Fourier</i> (FT-IR) do exopolissacarídeo produzido por <i>L. casei</i> utilizando melão como fonte de carbono.....	63
Figura 19. Espectro de RMN de prótons de EPS produzido por <i>L. casei</i> utilizando glicerol e glicose como fonte de carbono. ....	64
Figura 20. Espectro de RMN de prótons de EPS produzido por <i>L. casei</i> utilizando melão como fonte de carbono.....	65



## LISTA DE ABREVIações E SÍMBOLOS

**LAB:** Bactérias produtoras de ácido láctico

**pH:** potencial hidrogeniônico

**EPS:** exopolissacarídeo

**GRAS:** geralmente reconhecido como seguro “*generally recognized as safe*”

**MRS:** De Man, Rogosa e Sharpe

**mm:** milímetro

**C:** carbono

**N:** nitrogênio

**DNA:** ácido desoxirribonucleico

**NaCl:** cloreto de sódio

**RMN:** ressonância magnética nuclear

**GC-MS:** *Gas chromatography–mass spectrometry*

**Cr (VI):** cromo hexavalente

**Cu (II):** Cobre

**HPLC:** *High performance liquid chromatography*

**°C:** grau Celsius

**rpm:** rotação por minuto

**h:** horas

**mL:** mililitro

**min:** minuto

**QPS:** qualified presumption safety

**gt:** glicosiltransferase

**DEAE:** di-etilaminoetanol

**FT-IR:** espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

**v/v:** volume por volume

**SDM:** meio semi definido

**g.L<sup>-1</sup>:** gramas por litro

**MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O:** sulfato de magnésio heptaidratado

**KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:** dihidrogenofosfato

**mL L<sup>-1</sup>:** mililitros por litro

**NaOH:** hidróxio de sódio

**M:** molar

**L:** litros

**nm:** nanometro

**mg L<sup>-1</sup>:** miligramas por litro

**m/v:** massa por volume

**KDa:** quilo Daltons

**cm:** centímetro

**NaCl:** cloreto de sódio

**µL:** microlitro

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:** ácido sulfúrico

**N:** normalidade

**IR:** índice de refração

**mol L<sup>-1</sup>:** mol por litro

**g mol L<sup>-1</sup>:** grama por mol

**H:** hidrogênio

**ppm:** parte por milhão

**NaNO<sub>3</sub>:** nitrato de sódio

**NaBH<sub>4</sub>:** borohidreto de sódio

**CHCL<sub>3</sub>:** clorofórmio

**eV:** elétron volt

**MHz:** megahertz

**D<sub>2</sub>O:** água deuterada

**DO:** densidade ótica

**NIST:** *National Institute of Standards and Technology*

## 1. Considerações Gerais

### 1.1. Introdução

Bactérias produtoras de ácido lático (LAB), os *Lactobacillus sp*, são microrganismos considerados probióticos que podem ser aplicados em diversas áreas para a obtenção de metabólitos químicos como o ácido lático e são caracterizadas como GRAS (geralmente reconhecido como seguro) (DEO; DAVRAY; KULKARNI, 2019; HAMA *et al.*, 2015).

As LAB também estão entre as produtoras de exopolissacarídeos (EPS) e até o momento, cerca de 30 espécies de *Lactobacillus sp* foram identificadas como sintetizadoras de EPS, sendo as mais conhecidas: *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. curvatus*, *L. delbrurckii*, dentre outras (OLEKSY-SOBCZAK; KLEWICKA; PIEKARSKA-RADZIK, 2020).

Os EPS são polímeros naturais, não tóxicos e biodegradáveis, que desempenham um papel importante em uma variedade de mecanismos biológicos, por exemplo, na reserva de energia, na proteção da célula bacteriana contra condições ambientais adversas como na presença de compostos como antibiótico, enzima gástrica e pancreática, sais biliares e também estão relacionadas na modulação do sistema imunológico do hospedeiro (OLEKSY-SOBCZAK; KLEWICKA; PIEKARSKA-RADZIK, 2020; OLEKSY; KLEWICKA, 2018; TORINO; VALDEZ & MOZZI, 2015).

Por serem reconhecidos como prebióticos, podem ser utilizados na indústria de alimentos. Essas moléculas atuam nas propriedades reológicas do produto fermentado devido as suas propriedades viscosificantes, estabilizantes, emulsificantes ou gelificantes, essas moléculas atuam alterando a textura dos alimentos (PAIVA *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2015). Na indústria farmacêutica, EPS são comumente associados à efeito benéfico à saúde humana e a prevenção de doenças devido as suas atividades imunoestimuladoras, imunomodulatórias, antitumorais, antibiofilme, antioxidantes e redutor de colesterol (DILNA *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2015). Por fim, na indústria de cosméticos, o uso da celulose bacteriana é amplamente difundido como estabilizante de emulsões, como peles

artificiais para aplicação médica ou como membrana acústica (BADEL; BERNARDI; MICHAUD, 2011; HU *et al.*, 2019; VU *et al.*, 2009).

A síntese deste polímero extracelular está relacionada a composição do meio de cultivo (fonte de carbono e nitrogênio), condições de processo como pH, temperatura e aeração, além de genes específicos presentes em cada espécie (NOUHA *et al.*, 2018). Sabe-se que a concentração de carbono/nitrogênio (C/N) influencia diretamente na produção de EPS, pois, a quantidade destes substratos no meio determina sua taxa de utilização e, conseqüentemente, determina a taxa de produção do EPS (MORE *et al.*, 2014). Normalmente, moléculas de glicose, frutose, sacarose ou lactose são utilizadas como fonte de carbono para a produção de EPS (DILNA *et al.*, 2015; FONTANA *et al.*, 2019; OLEKSY-SOBCZAK; KLEWICKA; PIEKARSKA-RADZIK, 2020; WANG *et al.*, 2015; ZEHİR ŞENTÜRK *et al.*, 2020). Porém, outra alternativa é a utilização de fontes de carbono de baixo custo em processos biotecnológicos para a obtenção desses biopolímeros.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi produzir EPS usando *Lactobacillus casei* a partir de glicerol como parte da fonte de carbono para produção e também utilização de melão como fonte de carbono. Estudo preliminar utilizando xilose como fonte de carbono para a produção de EPS também foi realizado.

## 1.2. REVISÃO DE LITERATURA

### 1.2.1. Exopolissacarídeo (EPS)

Exopolissacarídeos (EPS) são macromoléculas secretadas por microrganismos compostas por resíduos de monossacarídeos e derivados de açúcares. São divididos em dois grupos de acordo com sua composição: homopolissacarídeos e heteropolissacarídeos, sendo a diferença entre estes dois grupos os tipos de açúcares que os compõem (MORE et al., 2014; WANG et al., 2015; DILNA et al., 2015).

Além da diferença na composição, os EPS's também diferem quanto a sua organização fora da parede celular e isto confere a estas macromoléculas tanto a capacidade de gerar cápsulas associadas covalentemente com a superfície da célula de maneira fraca, como também serem secretados para o exterior (DILNA et al, 2015; WANG et al, 2015). Fora da célula, o EPS pode desempenhar diferentes funções, como aderência às superfícies de substratos, formação de flocos e biofilmes, reconhecimento celular, barreira protetora para células, retenção de água, absorção de compostos orgânicos exógenos, absorção de íons inorgânicos, atividades enzimáticas e interação de polissacarídeos com enzimas. (MORE et al, 2014; RUAS-MADIEDO et al, 2002). EPS's são polímeros/biopolímeros naturais constituídos de moléculas orgânicas formadas através da polimerização de unidades de moléculas orgânicas semelhantes, idênticas e/ou repetidas (CASTELLANE *et al.*, 2015; SUTHERLAND, 2001a). Essas moléculas são amplamente distribuídas na natureza, sendo a sua ocorrência em animais, plantas, fungos e bactérias (BADEL; BERNARDI; MICHAUD, 2011).

Embora a produção dos EPSs sintetizados por bactérias seja baixa, sendo incapazes de competir com outros polissacarídeos produzidos por plantas e algas, os mesmos oferecem melhor qualidade e um maior grau de pureza. Como exemplo, a celulose bacteriana utilizada como estabilizante de emulsões na indústria cosmética e peles artificiais para aplicação médica ou como membrana acústica (BADEL; BERNARDI; MICHAUD, 2011).

Devido as suas propriedades físicas e fácil degradação, EPSs podem servir de alternativa aos produtos da indústria química, por serem não poluentes e não tóxicos (AMJRES *et al.*, 2015; MORE *et al.*, 2014; SUTHERLAND, 2001b; WANG *et al.*, 2015).

EPSs apresentam características como adsorção, biodegradação e hidrofobicidade estando estas características totalmente correlacionadas com as propriedades físicas, composição química e dinâmica (MORE *et al.*, 2014). A capacidade adsortiva do EPS está relacionada com a presença de grupos funcionais aniônicos como carboxila, hidroxila, grupo fosforil e fenólicos que permitem a complexação deste polímero com outras superfícies (HA *et al.*, 2010). Ademais, sua biodegradabilidade está relacionada à sua composição majoritariamente constituída por carboidratos e proteínas, o que também os tornam possíveis de serem assimilados como fonte de carbono por microrganismos (ZHANG; BISHOP, 2003; RIVARO *et al.*, 2021). Estes polímeros possuem grupos carregados como carboxil, fosfórico, sulfidril, fenólico e hidroxil e grupos polares como os aromáticos, alifáticos em proteínas e regiões hidrofóbicas em carboidratos, conferindo ao EPS características anfipáticas (MORE *et al.*, 2014).

### **1.2.2. Função fisiológica dos EPS nos microrganismos**

EPS são biopolímeros extracelulares complexos de alta massa molar que podem encapsular bactérias (adesão às células), conferindo resistência mecânica a esses organismos. Esses polímeros estão fortemente ligados à parede celular por ligações entre seus grupos carboxílicos e grupos hidroxila de lipopolissacarídeos ou até mesmo por ligações covalente através de fosfolípídeos e glicoproteínas (CARUSO *et al.*, 2018) podendo ser excretados no ambiente (matéria dissolvida) devido ao metabolismo microbiano (CARUSO *et al.*, 2018; DERTLI *et al.*, 2013; GUPTA; THAKUR, 2016). Mesmo que sua função fisiológica não seja tão compreendida, eles parecem estar associados à resistência a vários estresses ambientais, como: dessecação, bacteriófagos, compostos tóxicos como íons metálicos, antibióticos, enzimas hidrolíticas, sais biliares, altas concentrações de sal

e pH variável (DEO; DAVRAY; KULKARNI, 2019; DERTLI *et al.*, 2016; NGUYEN *et al.*, 2021).

EPS também estão relacionados à ligação de lactobacilos à células intestinais do organismo hospedeiro, o que impossibilita a ligação de patogênicos concorrentes com células hospedeiras, estimulando o crescimento de bactérias benéficas (DEO; DAVRAY; KULKARNI, 2019; RUSSO *et al.*, 2012). São assimilados como biofilme contendo de 50-90% de matéria orgânica e exercem papel importante à adesão e agregação microbiana beneficiando a formação e estabilidade da estrutura da comunidade de microrganismos (FLEMMING; WINGENDER, 2010; MORE *et al.*, 2014). Eles mantêm as células bacterianas próximas umas das outras, o que pode auxiliar na transferência de genes e no desenvolvimento de micro-consórcios sinérgicos (DEO; DAVRAY; KULKARNI, 2019; DERTLI *et al.*, 2016; FLEMMING; WINGENDER, 2010; MIAO *et al.*, 2018; MORE *et al.*, 2014).

### **1.2.3. Composição dos EPS**

Os EPS são compostos por diferentes grupos bioquímicos secretados pelos diversos microrganismos produtores (procariontes e eucariontes), sendo principalmente polissacarídeos/carboidratos, proteínas, lipídeos, fosfato, acetatos, succinatos, ácidos nucleicos e ácidos húmicos (MORE *et al.*, 2014).

### **1.2.4. Carboidratos e proteínas**

Carboidratos e proteínas são equivalentes a 90 e 75% da composição da molécula de EPS, respectivamente (MORE *et al.*, 2014; SHENG; YU; LI, 2010; ZHANG *et al.*, 2014). A secreção exógena de carboidratos contém principalmente hexose e ácidos urônicos (glucurônico, galacturônico e manurônico) e a presença deste último composto ou de acetato de etila, piruvato cetais, succinatos, fostatos e sulfatos podem influenciar na natureza do EPS; se neutros, aniônicos ou catiônicos (MORE *et al.*, 2014).

A composição química do EPS determinará sua classificação em homopolissacarídeos e heteropolissacarídeos (BIRCH *et al.*, 2019). Caso a cadeia

principal do polímero presente apenas um tipo de monossacarídeo, essa é classificada como homopolissacarídeo. No entanto, caso o EPS apresente monossacarídeos distintos em sua cadeia principal, esse é classificado como heteropolissacarídeos (BADEL; BERNARDI; MICHAUD, 2011; LYNCH; COFFEY; ARENDT, 2018).

Os homopolissacarídeos são geralmente neutros e compostos por D-glicose ou L-frutose (MORE *et al.*, 2014; VU *et al.*, 2009). Podem ser representados por dextrana, curdlana (goma composta por (1,3)- $\beta$ -d-glucano) e celulose (Figura 1). A unidade básica da dextrana é uma molécula de glicose ligada consecutivamente por  $\alpha$ (1-6), enquanto a curdlana é definida por um polissacarídeo linear composto de resíduos de glicose ligados por  $\beta$ (1-3). A celulose também é um biopolímero formado por unidades repetitivas de D-glicose ligadas por  $\beta$ (1-4) (MORE *et al.*, 2014; VU *et al.*, 2009).

Os heteropolissacarídeos como alginato, goma xantana, goma gelana, goma de benzol, ácido colânico e ácido hialurônico (Figura 1) são geralmente produzidos por bactérias do ácido lático e formados por repetidas unidades de monossacarídeos (D-glicose, D-galactose, L-frutose, L-rhamnose, ácido D-glucurônico, ácido L-gulurônico e ácido D-manurônico) (MORE *et al.*, 2014).



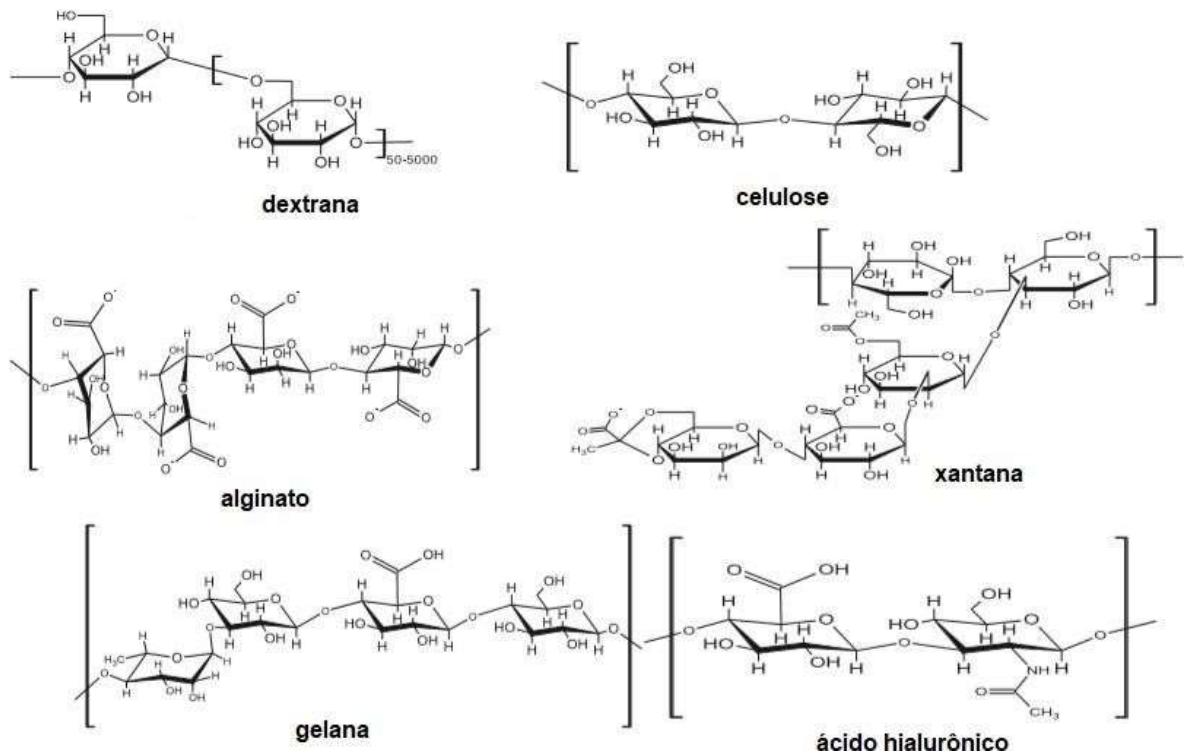


Figura 1. Estruturas químicas de alguns EPS

Fonte: MORE *et al.*, 2014.

O alginato é um heteropolímero de cadeia linear constituídos de monossacarídeos não repetitivos, ácido manurônico e gulurônico ligados por  $\beta(1-4)$ . A goma xantana é um heteropolímero ramificado com compostos de unidades de glicose em sua cadeia principal e trissacarídeos em sua cadeia ramificada ( $\alpha$ -D-manose com grupo acetil, ácido  $\beta$ -D-glucurônico e uma unidade terminal de  $\beta$ -D-manose ligada a um grupo piruvato). A goma gelana é um heteropolímero linear composta de unidade repetidas de tetrassacarídeos (duas moléculas de D-glicose, ácido D-glucurônico, L-rhamnose), enquanto o ácido hialurônico é composto por repetições de dissacarídeos, especificamente ácido glucurônico e N-acetilglucosamina, ligados em  $\beta(1-4)$  (MORE *et al.*, 2014; REHM, 2010; VU *et al.*, 2009).

As proteínas (enzimas e proteínas estruturais ou não enzimáticas) são compostos encontrados em maior quantidade no EPS e estão relacionadas à degradação do EPS e agem nos polímeros solúveis ou insolúveis e também em partículas orgânicas interagentes. Os substratos solúveis podem ser alguns

polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos, enquanto os insolúveis podem ser celulose, quitina e lipídeos.

Durante o período de morte do microrganismo pela falta de substrato, as enzimas secretadas podem favorecer a degradação das moléculas de EPS da própria bactéria ou até mesmo de outra espécie, visto serem fontes de energia (MORE *et al.*, 2014).

Já as proteínas não enzimáticas ou estruturais estão relacionadas a agregação entre a superfície bacteriana e a superfície extracelular, assim como as proteínas associadas à superfície celular e as proteínas de ligação a carboidratos extracelulares (FLEMMING; WINGENDER, 2010), por exemplo as lectinas auxiliam a agregação bacteriana e ajuda na formação de flocos em lodo ativado (PARK; NOVAK, 2009).

Outro exemplo encontrado, tanto em eucariotos quanto procariotos, é a classe de proteínas conhecida como glicoproteínas. Estas moléculas são sintetizadas apresentando uma ligação covalente entre açúcares e proteínas, e atuam desempenhando funções celulares como: integridade estrutural e comunicação intercelular (HUG; FELDMAN, 2011).

#### **1.2.5. DNA extracelular, Biossurfactantes e Lipídeos**

O DNA extracelular está presente na estrutura dos EPS sendo comumente mais encontrado em EPS de águas residuais e está associado à exportação de peptídeos sinalizadores, os quais ajudam na transferência entre genes (CZACZYK; MYSZKA, 2007; FLEMMING; WINGENDER, 2010).

Os biossurfactantes, outro composto presente na composição do EPS, são caracterizados como EPS de superfície ativa capazes de dispersar substâncias hidrofóbicas no meio, como exemplo os ramnolipídeos, sendo importantes na fixação e dispersão contra gotículas de óleo e também apresentam propriedades antibacterianas e antifúngicas (FLEMMING; WINGENDER, 2010; MORE *et al.*, 2014). Já os lipídeos presentes na estrutura do EPS ou lipopolissacarídeos estão relacionados a adesão deste exopolímero a outros compostos. Segundo Flemming & Wingender (2010) a característica hidrofílica está relacionada a proteínas e

moléculas de DNA, enquanto a característica hidrofóbica está relacionada a grupos metil e acetil ligados a polissacarídeos.

### **1.2.6. Produção de EPS**

Em 1930, originou-se o mercado nacional de polissacarídeos nos Estados Unidos através da produção de polissacarídeos como o amido, a celulose, a pectina, a galactomanana, o ágar e outros a partir de plantas superiores e algas (DONOT *et al.*, 2012). Atualmente, a produção destes compostos poliméricos também é realizada por diversos microrganismos durante processos metabólicos e apresentam diversas áreas de aplicação (HUANG *et al.*, 2020; ZEHİR ŞENTÜRK *et al.*, 2020; ZENG *et al.*, 2020). Os microrganismos mais utilizados para síntese de EPS são LAB e estas tem sido aplicada na indústria de alimentos fermentados desde a década de 30/40. Estas cepas também são usadas como probióticos devido a sua ação no hospedeiro e algumas delas possuem o status *Qualified Presumption of Safety* (QPS) ou *Generally Recognized As Safe* (GRAS) (TORINO; VALDEZ & MOZZI, 2015).

### **1.2.7. Bactérias produtoras de ácido láctico**

EPSs são o componente estrutural importante da parede celular de bactérias produtoras de ácido láctico. Os EPSs formam uma camada ao redor das células para protegê-las contra condições ambientais adversas, como desidratação, temperatura extrema, ácido, estresse osmótico, fagocitose, macrófagos e antibióticos (NGUYEN *et al.*, 2020). Para se adaptar às tensões ambientais, o LAB pode alterar sua superfície celular, produzindo mais EPSs (THANH *et al.*, 2014). O aumento da produção de EPSs resulta em paredes celulares mais espessas e firmes tendo também como resultado, o aumento da resistência de LAB às tensões externas (THANH *et al.*, 2014; NGUYEN *et al.*, 2020).

Estudos comprovam que EPS produzidos a partir de bactérias lácticas (LAB) têm induzido um interesse especial à comunidade científica, uma vez que são obtidos por microrganismos de classe alimentícia, GRAS (geralmente reconhecidas como seguras), podendo constituir uma nova geração de aditivos alimentares

naturais, inofensivos e prebióticos (BADEL; BERNARDI; MICHAUD, 2011; OLEKSY-SOBCZAK; KLEWICKA; PIEKARSKA-RADZIK, 2020).

Além da característica principal deste tipo de bactéria, que é a produção de ácido láctico a partir da fonte de carbono presente na matriz onde crescem, várias cepas de LAB formam outros compostos, como vitaminas, peptídeos bioativos, compostos antibacterianos, compostos de aroma, açúcares de baixa caloria e EPS. Todas essas características conferem atributos desejáveis a alimentos e produtos fermentados específicos (TORINO *et al.*, 2015).

Entretanto, os baixos rendimentos de produção destes polissacarídeos pela maioria das espécies de LAB é o principal motivo de sua exploração não comercial, mas, em contrapartida, sua vasta diversidade estrutural abre caminho para inovações (BADEL; BERNARDI; MICHAUD, 2011).

Algumas cepas de LAB produtoras de EPS foram isoladas de alimentos fermentados, como iogurte, queijo, salsichas, kefir, vinho e chucrute, sendo pertencentes às espécies de *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Lactococcus* e *Bifidobacterium* (WANG *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2014).

Dentre as espécies de *Lactobacillus*, a espécie *casei* e mais outras espécies deste mesmo gênero foram identificadas como sintetizadoras deste biopolímero (OLEKSY-SOBCZAK; KLEWICKA; PIEKARSKA-RADZIK, 2020). Entretanto, para a espécie *casei* não há muitas pesquisas sobre sua produção de EPS e o trabalho mais recente mostra que o biopolímero produzido por *L. casei* apresenta atividade imunomoduladora podendo melhorar a mucosa intestinal (REN *et al.*, 2020).

#### **1.2.8. Fatores químicos, físicos e genéticos relacionados a síntese de EPS**

A escolha dos processos de obtenção do EPS pode afetar as propriedades e a quantidade de produção do EPS (MORE *et al.*, 2014), visto que a produção em baixa escala está associada e pode sofrer influência de fatores como o processo de armazenamento das bactérias, o processo pré-fermentativo (obtenção do pré-inóculo), genótipo que afeta o metabolismo bacteriano, parâmetros químicos e físicos como temperatura e pH, respectivamente.

Para que sua síntese ocorra existem três etapas importantes envolvidas. A primeira está relacionada à assimilação de um substrato de carbono, a segunda com

sua síntese intracelular e a terceira e última com sua excreção para fora da célula (NOUHA *et al.*, 2018). Porém, estas etapas estão interligadas à espécie microbiana utilizada, como por exemplo, a composição do meio de cultivo (fonte de carbono e nitrogênio), condições de processo (como pH), temperatura e aeração, e os genes de síntese presentes na espécie (NOUHA *et al.*, 2018).

Os EPS são produzidos tanto associados ao crescimento bacteriano quanto parcialmente associados ou dissociados do crescimento. Quando há uma escassez de substrato, a bactéria produtora pode degradar o EPS e usá-lo como fonte de carbono e energia (MORE *et al.*, 2014).

A síntese da maioria dos EPS é beneficiada pelo desequilíbrio de nutrientes (proporção elevada entre a relação carbono (C) e nitrogênio (N)), pela faixa de temperatura de incubação (quando esta difere da temperatura ótima para o desenvolvimento do microrganismo) e também pelas condições de aeração (SUTHERLAND, 2001a).

Sabe-se que a concentração de substrato (C/N) influencia a produção de EPS, uma vez que a concentração de substrato no meio determina sua taxa de utilização e, conseqüentemente determina a taxa de produção do EPS (MORE *et al.*, 2014). A escassez de substrato no meio faz com que o EPS seja utilizado como fonte de energia e carbono (MORE *et al.*, 2014; PAVONI JL; TENNEY MW; ECHELBERGER, 1972). Por mais que a relação entre C/N seja crucial para a produção de EPS não há descrito na literatura uma relação favorável. Ye e colaboradores (2011) relatam que a relação ótima C/N é 20 e que o aumento para 100 e redução para 4 influenciou negativamente a floculação, sedimentação e desidratação dos flocos de lodo. A medida que a relação C/N foi reduzida, a concentração de carboidratos no EPS sofreu redução e os teores de proteínas aumentaram, enquanto a medida que aumentou a relação C/N ocorreu o inverso; a concentração de carboidratos no EPS aumentou e o conteúdo de proteína diminuiu. Foram encontrados EPS com elevados teores de proteínas e baixas concentrações de carboidratos em uma relação de C/N de 5, porém notaram que quando aumentaram a relação C/N houve uma redução acentuada para 40 dos teores de proteínas e um aumento da concentração de carboidratos (DURMAZ; SANIN, 2001), enquanto Bura e colaboradores (1998) e Liu & Fang (2002) encontraram EPS com

altos teores de proteínas e carboidratos em meio com baixa relação C/N. A composição do EPS pode variar de acordo com o microrganismo utilizado e também do meio usado na produção. Em *L. plantarum*, Wang *et al.* (2014) utilizaram meio contendo lactose e manose com uma relação entre carbono (C) e nitrogênio (N) de 7 obtendo homopolissacarídeo composto de resíduos de galactose. Para a produção de EPS a partir do microrganismo *L. plantarum*, crescido em meio contendo relação C/N de 5 Dilna *et al.* (2015) relataram obter EPS heteropolissacarídeo composto de resíduos de glicose e manose com atividade antitumoral e antioxidante, enquanto Di *et al.* (2017) utilizaram *L. casei*, e obteve duas amostras de EPS: uma composta principalmente por galactose, glicose e arabinose e outra composta principalmente por galactose, glicose e manose. Ambos os EPS's obtidos por Dilna *et al.* (2015) e Di *et al.* (2017) possuem atividade antitumoral, sendo que o *L. plantarum* também mostrou atividade antioxidante. Portanto, nota-se que a relação C/N pode ocasionar a produção de EPS com composições e propriedades diferentes.

Outro parâmetro que influencia a produção de EPS é o pH como relatado por More e colaboradores (2014). Índícios mostram que a regulação da via biossintética relacionada a produção de EPS pode depender do pH. Sabe-se que o pH ótimo para o meio de produção de EPS está na faixa de 5 a 7 e que o efeito do pH na produção de EPS pode variar de acordo com o microrganismo utilizado, condições operacionais e composição química do meio (MORE *et al.*, 2014; SHU; LUNG, 2004). Lee *et al.* (1999) corrobora com esta informação pois relatam que há microrganismos que produzem EPS na faixa de pH 5.5-6.5.

A temperatura é outro parâmetro físico importante na produção de EPS e, segundo Sutherland (2001) quando há redução na temperatura há também redução no crescimento e na síntese de polímeros capsulares.

Além dos fatores químicos e físicos supracitados, a biossíntese do EPS também está relacionada a genes, como por exemplo os homopolissacarídeos requerem menos enzimas que os heteropolissacarídeos e a biossíntese deste último ocorre pela via dependente de Wzy (grupo de genes) que regula todo o processo de síntese do EPS (DEO; DAVRAY; KULKARNI, 2019).

Essa via de biossíntese é constituída por agrupamentos de genes capazes de codificar proteínas que estão envolvidas na síntese e transporte do EPS (DEO;

DAVRAY; KULKARNI, 2019; SCHMID; SIEBER; REHM, 2015). O arranjo dos genes e as propriedades funcionais dos aglomerados de EPS foram estudados em alguns *Lactobacillus* e foram evidenciadas algumas características comuns dos *clusters* de genes do EPS: a presença de genes reguladores, a polimerização, os genes relacionados à exportação e glicosiltransferase (gt) (DEO; DAVRAY; KULKARNI, 2019; DERTLI *et al.*, 2013, 2016; LEE *et al.*, 2016; VASTANO *et al.*, 2016; ZEIDAN *et al.*, 2017; ZIVKOVIC *et al.*, 2015). Também foram relatadas algumas diferenças entre bactérias do gênero dos *Lactobacillus*, como por exemplo a presença de um único aglomerado de genes para um tipo de espécie, enquanto para outro tipo de espécie há múltiplos aglomerados (DERTLI *et al.*, 2016; VASTANO *et al.*, 2016).

### **1.2.9. Técnicas de extração, purificação e caracterização de EPS**

Para se realizar a análise estrutural de qualquer molécula de EPS é imprescindível o isolamento de polímeros puros. Para que haja pureza no EPS o mais importante é evitar a contaminação desta molécula com componentes do meio de cultivo microbiano, como por exemplos meios com extrato de levedura contendo manana (TORINO *et al.*, 2015).

Por se tratar de um polímero extracelular o método mais utilizado para a extração é o uso de etanol devido ser um solvente considerado bipolar com alto poder de dissolver substâncias orgânicas polares. Segundo D'Abzac e colaboradores (2010) ao compararem diversos métodos de extração de EPS concluíram que a extração usando etanol forneceu o maior teor de polímeros extraídos e, portanto, diversas pesquisas utilizam esse solvente como agente extrator (DILNA *et al.*, 2015; RIAZ RAJOKA *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2015; ZAROOUR *et al.*, 2017). Entretanto, alguns protocolos de isolamento de EPS como remoção de células por centrifugação ou filtração, precipitação do polímero contido no sobrenadante livre de células pela adição de etanol resfriado ou acetona (sendo que as quantidades necessárias para extração do EPS dependem do tipo de polímero liberado. Normalmente são utilizados dois ou três volumes de etanol ou acetona), diálise e secagem do polímero precipitado e, eventualmente, uma nova etapa de reprecipitação e diálise (RUAS-MADIEDO E DE LOS REYES -GAVILÁN, 2002; TORINO *et al.*, 2015).

A purificação da molécula de EPS requer a utilização de cromatografia em coluna di-etilaminoetanol (DEAE) – celulose em NaCl como fase móvel (HUANG *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2015), uma vez que essa técnica promove uma alta eficiência de separação de proteínas, um dos compostos em abundância na matriz do EPS (MAYHEW; HOWELL, 1971; MORE *et al.*, 2014). Outras técnicas como a filtração por membrana, cromatografia de troca aniônica e/ou permeação em gel também são empregadas. Em geral, o isolamento de EPS de meios de cultura com alto teor de proteína (por exemplo, meio com produtos lácteos), as proteínas são tipicamente removidas por precipitação com ácido tricloroacético, hidrólise com proteases ou uma combinação de ambos (TORINO *et al.*, 2015).

A concentração de exopolissacarídeos é estimada como teor de carboidratos presentes na molécula e é geralmente determinado pelo método do ácido fenol-sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1951) ou pela quantificação da matéria seca do polímero (VANINGELGEM *et al.*, 2004). Todavia, a concentração de EPS pode ser determinada por meio de cromatografia de exclusão de tamanho de alto desempenho acoplada com detecção de índice de refração (RI) (HPSEC-RI), sendo a concentração de EPS calculada pela integração do sinal RI usando curvas de calibração obtidas com dextrans de massa molecular (MW) conhecidos (SÁNCHEZ *et al.*, 2006). Polak-Berecka *et al.* (2013) presumiram em seu estudo que as forças centrífugas acima de 10.000 xg são muito altas, ocasionando uma provável perda do EPS quando descartado junto com o precipitado celular. Em relação a etapa de precipitação, os autores relatam que foram obtidos melhores resultados ao prolongar a incubação com etanol (24 h a 4 °C) sob agitação.

Após a extração e purificação da molécula de EPS, é necessário direcioná-la a sua aplicação no mercado biotecnológico. Para isso, é necessário saber qual a composição do polímero com algumas técnicas como cromatografia gasosa – GCMS, utilizada para determinar a massa do polímero; análise de ressonância magnética nuclear (RMN), utilizada para identificar hidrogênios e carbonos na estrutura do EPS e assim auxiliar na identificação da composição estrutural da molécula (se mono ou polimérica) (HUANG *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2015; ZAROOUR *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2020). Por exemplo, a composição do monômero EPS pode ser determinada por hidrólise ácida total seguida pela



detecção do monômero usando cromatografia de troca aniônica de alto desempenho (HPAEC) com detecção amperométrica pulsada (PAD) (TORINO, *et al.*, 2015). Uma outra alternativa é o emprego da técnica de metanólise e pertrimetilsililação o qual permite às amostras serem analisadas por cromatografia gasosa (GC). Além disso, a análise de monossacarídeos é utilizada para determinar o teor de carboidratos, verificando a pureza da amostra e a configuração D ou L dos resíduos de monossacarídeo pode ser estabelecida por GC.

O padrão de ligação dos constituintes do monossacarídeo é determinado após a metilação de todos os grupos hidroxila livres, seguida pela hidrólise do polímero e posterior redução dos monômeros a alditóis por borohidreto de sódio. A acetilação subsequente fornece acetatos de alditol parcialmente metilados deuterados que são analisados por GC juntamente MS (TORINO *et al.*, 2015). As porcentagens (proporção) das unidades terminais, internas e ramificadas de glicose, conforme determinado pela análise de metilação, fornecem uma ideia da estrutura do polímero. Informações adicionais sobre as características estruturais do EPS podem ser obtidas por  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  por espectroscopia de RMN. A espectroscopia de RMN de alta resolução é o método mais poderoso para a identificação de cadeias de carboidratos (DAMAGER *et al.*, 2010). Este método fornece informações sobre o tipo de monossacarídeos constituintes, tamanho do anel e configuração anomérica e a posição das ligações glicosídicas. Testes imunológicos, reológicos, adsortivos e redutores visando aplicação na indústria farmacêutica, alimentícia e ambiental, respectivamente (HUANG *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2015; ZAROOUR *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2020).

#### **1.2.10. Aplicação do EPS**

Sabe-se que bactérias produtoras de ácido láctico são capazes de sintetizar EPS aplicáveis na área alimentícia, farmacêutica e ambiental, pois podem compor uma nova geração de aditivos alimentares naturais, inofensivos e prebióticos (BADEL; BERNARDI; MICHAUD, 2011; BOTELHO *et al.*, 2014; GALLE; ARENDT, 2014; OLEKSY-SOBCZAK; KLEWICKA; PIEKARSKA-RADZIK, 2020; PAIVA *et al.*, 2016). Por apresentarem afinidades eletrostáticas podem servir de agentes adsortivos de metais pesados em processos de descontaminação e até mesmo

como redutores potenciais de elementos traços (HA *et al.*, 2010; ZENG *et al.*, 2020). De acordo com Guibaud *et al.* (2003) os EPS contêm cerca de 20-50% de ácidos urônicos e variados grupos carboxílico e hidroxílico ativos fazendo com que este tenha uma capacidade de ligação muito alta. Estudos mostraram a capacidade adsorviva ou de ligação entre EPS e íons metálicos. Zeng e colaboradores (2020) concluíram que EPS provindo de *Bacillus sp.* foi capaz de adsorver Cd(II), Cr(VI) e Cu(II). Ibrahim *et al.* (2020) relatam que os grupos ativos (hidroxila, amino e carbonila) presentes no EPS de *Halobacillus sp.* formam complexos com metais pesados e protegem a célula bacteriana contra a toxicidade destes íons metálicos, garantindo resistência da bactéria para estes compostos. Mathivanan e colaboradores (2020) analisaram a composição do EPS, encontrando uma composição heteropolissacarídica composta por manose, glicose, xilose e ramnose com atividade de emulsificação e floculação, e, por mostrar resistência a múltiplos metais pesados indicam a aplicação biotecnológica deste polímero para remoção de metais. Rajoka *et al.* (2020) relatam que novas pesquisas estão se concentrando em usar polissacarídeos como agente redutor e estabilizador de nanopartículas de metal.

Na indústria alimentícia o interesse recente está relacionado ao seu uso como aditivos alimentares naturais, pois devido aos seus atributos reológicos podem afetar as propriedades viscosificantes, estabilizantes, emulsificantes ou gelificantes, melhorando a textura e sensação na boca dos produtos fermentados como iogurte e queijo (AHMED *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2015; ZEHİR ŞENTÜRK *et al.*, 2020), além de suas propriedades térmicas favorecerem o seu uso durante processos térmicos (AHMED *et al.*, 2013). Wang e colaboradores (2015) relataram a obtenção de um EPS promissor para a indústria alimentícia, pois é composto por glicose e galactose, e apresentou maior viscosidade no leite desnatado em temperatura mais baixa e pH ácido, além de ter uma temperatura de degradação mais alta. Outro estudo realizado por Zehir Şentürk *et al.*, (2020) mostra que o EPS obtido é composto por sacarose e maltose, e apresenta propriedades estruturais, reológicas e térmicas favoráveis para a indústria de alimentos.

Devido às suas propriedades probióticas, o trabalho desenvolvido por Oleksy-Sobczak; Klewicka; Piekarska-Radzik, (2020) mostra uma abordagem inovadora

para o EPS obtido de *Lactobacillus*, isto é, seu uso na produção de nutracêuticos. Vários estudos mostraram que as cepas de *Lactobacillus* podem influenciar o ecossistema microbiano gastrointestinal humano e neutralizar alterações fisiológicas e imunológicas associadas a patologias (DALIU *et al.*, 2018; DALIU *et al.*, 2019).

Algumas propriedades pró-saúde foram inferidas como ação anticâncer, antioxidante, prebiótico, imunomodulador, redutor de colesterol e muitos outros benefícios (DILNA *et al.*, 2015; FREITAS; HU *et al.*, 2019; POLAK-BERECKA *et al.*, 2013; ZHU *et al.*, 2019). Huang e colaboradores (2020) relatam em seu trabalho que a análise estrutural do EPS mostrou ser composto por manose e glicose e que é capaz de inibir efetivamente a atividade da  $\alpha$ -amilase do pâncreas tendo aplicações potenciais na prevenção e alívio do diabetes *mellitus*. Dilna *et al.* (2015) relatam que o EPS obtido apresentou propriedade antioxidante comparável ao ácido ascórbico, capacidade de reduzir colesterol e inibir a enzima  $\alpha$ -amilase e capacidade de inibição de células de linhagens cancerígenas (efeito antiproliferativo) não sendo tóxico para linhagens de células normais.

### **1.2.11. Fontes de carbono promissora em biotecnologia**

#### **1.2.111. Glicerol**

Os biocombustíveis obtidos à partir de fontes sustentáveis/renováveis são considerados uma importante forma de progresso tecnológico, pois limitam as emissões de gases de efeito estufa e diminuem a poluição, melhorando a qualidade do ar. Seu custo final, cerca de 75 a 95%, é influenciado pelo custo da matéria-prima e isso o torna mais acessível, tanto em relação a sua obtenção quanto na questão financeira, quando comparadas com combustíveis a base de fontes não renováveis (QUISPE *et al.*, 2013).

Dentre os biocombustíveis, o biodiesel é um combustível biodegradável, renovável, não tóxico, com elevado ponto de fulgor, melhor viscosidade e poder calórico - semelhante aos combustíveis fósseis (KNOTHE *et al.*, 2005; QUISPE *et al.*, 2013). Tais características fizeram com que o biodiesel ganhasse credibilidade como combustível alternativo, aumentando sua demanda de uso (QUISPE *et al.*, 2013). Por exemplo, no Brasil, a adição de 2% de biodiesel (B2) é obrigatória desde

janeiro de 2008, passando para 5% (B5) em 2013, enquanto em 2021 este valor foi reduzido de 13 para 10% (BRASIL, 2021).

Em contrapartida, qualquer ciclo produtivo apresenta subprodutos e, neste caso, o glicerol é o subproduto obtido. Relata-se que cerca de 10% do volume total de biodiesel produzido é composto por glicerol. A produção crescente de biodiesel levará a grandes excedentes de glicerol.

O glicerol é abundante na natureza, sendo componente estrutural de muitos lipídios. É também um dos principais solutos compatíveis, sendo amplamente produzido em resposta à diminuição da atividade extracelular de água durante osmorregulação em leveduras (WANG *et al.*, 2001). Devido à sua ampla ocorrência na natureza, muitos microrganismos conhecidos podem utilizar naturalmente o glicerol como fonte de carbono e energia, podendo assim, substituir parcialmente os carboidratos tradicionais, como sacarose, glicose e amido em alguns processos de fermentação industrial. Além disso, mistura de glicose, glicerol e lactose têm mostrado resultados promissores para diversos produtos obtidos por meio de sistemas de autoindução (SILVA *et al.*, 2015).

Uma série de microrganismos são capazes de crescer anaerobicamente em glicerol como única fonte de carbono e energia, como *Citrobacter freundii* (SEIFERT *et al.*, 2001), *Klebsiella pneumoniae* (NÉMETH *et al.*, 2003, DA SILVA *et al.*, 2014, DA SILVA *et al.*, 2015, AVILA NETO *et al.*, 2017), *Clostridium pasteurianum* (BIEBL, 2001), *Clostridium butyricum* (COLIN *et al.*, 2001), *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter aerogenes* (ITO *et al.*, 2005) e *Lactobacillus reuteri* (TALARICO *et al.*, 1990).

#### **1.2.112. Melaço**

O melaço é um resíduo obtido após o refinamento do açúcar na indústria sucroenergética. Ele é denso, de coloração escura, rico em açúcares, matérias orgânicas como compostos fenólicos, são abundantes em minerais, vitaminas e compostos antioxidantes, podendo ser um ótimo nutriente de suporte para o desenvolvimento de microrganismos (SHAKURNIA *et al.*, 2019).

Alguns trabalhos empregaram melaço para a obtenção de diversos resultados. Valdez *et al.* (2019) produziram escleroglucano, EPS constituído de  $\beta$ -

glucana por *Sclerotium rolfsii*, e relatam não obter uma produção igual quando utilizaram amido como fonte de carbono, mas afirmam que o melaço pode ser considerado um subproduto agroindustrial promissor como fonte de carbono para microrganismos. Sampaio e colaboradores (2020) utilizaram melaço-sacarose como fonte de carbono para produção de EPS a partir de *Lactobacillus* e relataram obter um bom rendimento de produção de EPS (44,5 g.L<sup>-1</sup>) e que sua composição era de glicose e galactose. Farag *et al.* (2020) produziram EPS a partir de *Bacillus mycoides* empregando melaço e peptona como fonte de carbono e obtiveram EPS composto por galactose, manose, glicose e ácido glucurônico.

Portanto, devido as suas propriedades e características, o melaço vem sendo utilizado em pesquisas científicas como fonte de carbono para o crescimento de bactérias. Contudo, existe uma escassez de trabalhos científicos que utilizam este resíduo na produção de EPS a partir de cepas de *Lactobacillus* (SAMPAIO *et al.*, 2020; ASGHER *et al.*, 2021).

### **1.3 Objetivos**

#### **1.3.1 Objetivos gerais**

Produzir e pré caracterizar o EPS obtido através de bactéria láctica *Lactobacillus casei* utilizando fontes de carbono de baixo custo.

#### **1.3.2 Objetivos específicos**

Produzir EPS utilizando *Lactobacillus casei*.

Produzir EPS utilizando xilose, glicose/glicerol e melação de cana-de-açúcar como fonte de carbono.

Caracterizar o EPS produzido através de análises por HPLC, GC-MS, FTIR Cromatografia por exclusão molecular e ressonância magnética nuclear (RMN).

## **2. UTILIZAÇÃO DE GLICEROL ASSOCIADO COM GLICOSE E MELAÇO PURO PARA PRODUÇÃO DE EPS A PARTIR DE *LACTOBACILLUS CASEI***

### **2.1 Introdução**

A crescente demanda de polímeros naturais para várias aplicações industriais nos últimos anos ocasionou uma busca e um maior interesse na produção de exopolissacarídeos (EPS) de origens naturais (TRABELSI *et al.*, 2015). Estes EPS são biopolímeros naturais, extracelulares, biodegradáveis e não tóxicos que desempenham um papel importante em uma variedade de mecanismos biológicos (OLEKSY-SOBCZAK; KLEWICKA; PIEKARSKA-RADZIK, 2020). Essas moléculas são consideradas uma alternativa aos polímeros químicos convencionais devido à sua biodegradabilidade, alta eficiência, características não tóxicas e ausência de produção de resíduos (CARUSO *et al.*, 2018).

Estes polímeros se acumulam na superfície celular (KRISHNAMURTHY *et al.*, 2020) e sua estrutura pode ser composta por homopolímeros, constituídos por apenas um tipo de monômeros de açúcar como a celulose e a dextrana, ou heteropolímeros, dois ou mais tipos de monômeros de açúcar como a xantana (ZHOU *et al.*, 2019). Eles diferem de acordo com sua estrutura química, massa molecular e tipos de ligação, os quais modulam sua funcionalidade biológica e assim a sua aplicação (DERTLI *et al.*, 2013; OLEKSY- SOBCZAK; KLEWICKA; PIEKARSKA-RADZIK, 2020; ZAROOUR *et al.*, 2017).

Sua síntese ocorre a partir do processo metabólico de microrganismos como bactérias, fungos e algas verde-azuladas (AMJRES *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2015). Bactérias produtoras de ácido lático (LAB), *Lactobacillus* sp, são microrganismos gram-positivos amplamente utilizados em processos fermentativos e na preservação de alimentos por serem caracterizadas como GRAS (geralmente reconhecido como seguro) e probióticos (ZAROOUR *et al.*, 2017). Seu uso está sendo expandido na fabricação de alimentos funcionais (produção de ácido lático, compostos aromáticos, vitaminas, agentes antimicrobianos e EPS) (NURAIIDA *et al.*, 2015), como fábricas

de células microbianas eficientes para a produção de metabólitos industrialmente relevantes e também como probióticos (ZAROOUR *et al.*, 2017).

Até o momento, cerca de 30 espécies de *Lactobacillus* sp foram identificadas como sintetizadoras deste biopolímero, sendo as mais conhecidas: *Lb. casei*, *Lb. acidophilus*, *Lb. brevis*, *Lb. curvatus*, *Lb. delbrueckii*, dentre outras (OLEKSY-SOBCZAK; KLEWICKA; PIEKARSKA-RADZIK, 2020).

O conhecimento sobre os aspectos da produção de EPS é essencial para atividades de pesquisa e produção em escala industrial, uma vez que estão diretamente relacionados com sua produção; por exemplo a proporção entre fonte de carbono e nitrogênio (MORE *et al.*, 2014).

Por se tratar de uma substância promissora, o interesse na obtenção de uma quantidade elevada de EPS produzido a custo reduzido é objeto de pesquisa. Nos seres humanos, apresentam efeitos fisiológicos benéficos como ação antioxidante (DILNA *et al.*, 2015; ZHU *et al.*, 2019), antitumoral (WANG *et al.*, 2014; ZAROOUR *et al.*, 2017), imunomoduladoras (DILNA *et al.*, 2015; ZHU *et al.*, 2019), reduzindo colesterol e também como prebióticos para a microbiota intestinal (ZHU *et al.*, 2019).

EPS são normalmente constituídos de açúcares como glicose, frutose, sacarose ou lactose (DILNA *et al.*, 2015; FONTANA *et al.*, 2019; OLEKSY-SOBCZAK; KLEWICKA; PIEKARSKA-RADZIK, 2020; WANG *et al.*, 2015; ZEHIR ŞENTÜRK *et al.*, 2020). Corriqueiramente, utiliza-se como fonte de carbono para a produção de compostos metabólicos, açúcares como glicose (FONSECA *et al.*, 2016; CASTELLANE *et al.*, 2017). Entretanto, por apresentar um custo mais elevado por conta de seu processo de obtenção, têm-se utilizado outros tipos de açúcares como fonte de carbono e estes são: lactose, xilose e outros subprodutos agroindustriais também têm demonstrado ser adequados e promissores na produção de EPS bacteriano, como por exemplo o melão e soro de queijo (ASGHER *et al.*, 2021). A xilose pode ser obtida a partir de fontes renováveis como a madeira e a palha, conferindo maior rentabilidade na sua obtenção e, conseqüentemente, no seu emprego como fonte de carbono. O glicerol, resíduo oriundo da produção de biodiesel, pode substituir os carboidratos tradicionais, como sacarose, glicose e amido em alguns processos de fermentação industrial e tem sido usado como matéria-prima para fermentações (WANG *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2009) e até o



melaço. Por ser componente estrutural de muitos lipídeos, o glicerol é abundante na natureza e muitos microrganismos conhecidos podem utilizá-lo como fonte de carbono e energia (SILVA *et al.*, 2009). Contudo, não há até o momento trabalhos utilizando glicerol como única ou parte da fonte de carbono para a produção de EPS a partir de *Lactobacillus*. Mediante ao pressuposto, foram produzidos EPS a partir de *Lactobacillus* sp. (CH17), *Weissella paramesenteroides* (CH24, CC10, CC28, CC29), *Leuconostoc mesenteroides* (CH25, B512), *Pediococcus pentosaceus* (CCC3, Ke16, BSLM9), *Leuconostoc lactis* (CCC15, BSLM14), *Lactobacillus casei* (Ke2, Ke8, Ke11), *Lactobacillus paracasei* (Ke7), *Lactobacillus delbrueckii* (Y15C), *L. rhamnosus* (B103), *Bacillus coagulans* (ALE3, ALE4), *Sporolactobacillus nakayamae* (VINI6), em meio com xilose como única fonte de carbono, além de produzir e pré-caracterizar o EPS obtido de *Lactobacillus casei* em fermentação em reator, utilizando glicerol associado à glicose como fonte de carbono, bem como utilizar melaço como fonte de carbono.

## 2.2 Material e métodos

### 2.2.1 Screening de bactérias potencialmente produtoras de EPS

Para verificar e selecionar o microrganismo com maior potencial de produção de EPS, 22 isolados bacterianos contidos na biblioteca do Laboratório de Microbiologia e Fermentação Industrial (Tabela 1) foram submetidos a testes de produção. Os 22 isolados, estocados em glicerol 20% e armazenados em -80 °C foram reativados em meio MRS (v/v) (De Man, Rogosa e Sharpe) por 48 h e plaqueados para verificar a existências de colônias puras. Após serem reativados, um inóculo de 10% foi novamente inoculado em meio MRS e, após 18 h de fermentação, fase exponencial dos microrganismos, foram inoculados 10% em meio específico para produção de EPS.

Os cultivos permaneceram incubados por 40 h em agitação de 130 rpm a 37 °C (Marca Solab, mesa agitadora orbital, SL 180) para isolados aeróbicos e microrganismos anaeróbicos não foram submetidos a agitação.

O EPS produzido foi extraído do sobrenadante pela adição de 2 volumes de etanol gelado e estocado por 24 h à 4 °C e centrifugado (Marca Hitach, modelo

Himac CR 22G) (DILNA *et al.*, 2015). Após a extração, o pellet celular foi diluído em água destilada e seco em estufa à 35 °C por 96 h. A quantidade de EPS produzido foi estimado em g/mL.

Tabela 1. Micro-organismos utilizados para estudo da produção de EPS

	Isolados	Local de isolamento	Identificação
1	LMISM6	Lagoa de decantação de resíduos da indústria de farinha de mandioca – Indústria Plaza, situada na região de Sta. Maria-SP	<i>Lactobacillus plantarum</i>
2	CH17		<i>Lactobacillus sp.</i>
3	CH24	Chucrute	<i>Weissella paramesenteroides</i>
4	CH25		<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
5	CCC3		<i>Pediococcus pentosaceus</i>
6	CCC15		<i>Leuconostoc lactis</i>
7	CC10	Caldo de cana de açúcar	<i>Weissella paramesenteroides</i>
8	CC28		<i>Weissella paramesenteroides</i>
9	CC29		<i>Weissella paramesenteroides</i>
10	Ke2		<i>Lactobacillus casei</i>
11	Ke7		<i>Lactobacillus paracasei</i>
12	Ke8	Keffir	—
13	Ke11		<i>Lactobacillus casei</i>
14	Ke16		<i>Pediococcus pentosaceus</i>
15	BSLM9	Bagacilho fresco de cana de açúcar da usina	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
16	BSLM14	Sta. Lucia, situada na região de Araras-SP	<i>Leuconostoc lactis</i>
17	Y15C	Leite fermentado	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii</i>
18	B512	Universidade Estadual de Campinas(Faculdade de Engenharia de Alimentos)	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
19	B103	Cedido pela profa. Georgina Lourdes Michelena Alvarez,( Instituto Cubano de Investigaciones de la Caña de Azúcar (ICIDCA))	<i>L. rhamnosus</i>
20	ALE3		<i>Bacillus coagulans</i>
21	ALE4	Rizosfera de alecrim	<i>Bacillus coagulans</i>
(22	Vini6	Carrapicho ( <i>Cenchrus echinatus</i> )	<i>Sporolactobacillus nakayamae subsp. nakayamae</i>

As análises empregando xilose como fonte de carbono foram realizadas paralelamente aos ensaios preliminares que empregaram glicose com glicerol e melão como fontes de carbono alternativas para produção de EPS. Devido ao isolado Ke8 não ser tanto utilizado para a produção de EPS a partir de fontes de carbono alternativas, e apresentar capacidade de produção de EPS a partir da mistura de glicose e glicerol e também de melão bruto, nós optamos em dar andamento a pesquisa utilizando este isolado com as fontes de carbono supracitadas, excluindo o uso da xilose.

### 2.2.2 Microrganismo

Após *screening* conforme Tabela 1, foi selecionada a bactéria produtora de ácido láctico, *Lactobacillus casei* Ke8, a qual foi isolada de kefir e estocada em Ultra Freezer da AmericanLab à -80 °C em 20% de glicerol (v/v). Um inóculo de 10% (v/v) foi ativado em meio MRS durante 24 h a 37 °C e posteriormente reativados em MRS por 18 h a 37 °C e inoculado, 10% (v/v), em meio semi definido (SDM) – modificado.

Para o ensaio empregando xilose como fonte de carbono na produção de EPS, utilizou-se de um estoque de microrganismos previamente armazenados em glicerol 20% e congelados à -80 °C foi reativado. Foram coletados 500 µL do estoque e inoculados em tubos falcon de 50 mL contendo 4,5 mL de meio MRS (DILNA et al, 2015 modificado), adotando como fonte de carbono xilose na concentração de 40 g L<sup>-1</sup>. Os microrganismos BSLM9, BSLM14, CH17, CH24, CH25, CC10, CC28, CC29, CCC3, CCC15, B103, B512, Ke2, Ke7, Ke8, Ke11, Ke16, ALE3, ALE4, VINI6, Y15C foram incubados a temperatura de 36 °C por 24 h sob agitação de 150 rpm, exceto ALE4, ALE3, VINI6 e Y15C, visto serem anaeróbicos facultativos. Após a incubação os microrganismos foram repicados e incubados novamente.

Os microrganismos foram inoculados em meio SDM (WANG et al,2015), alterando a fonte de carbono para xilose. Foram inoculados 1 mL de inóculo e foram inoculados em tubos falcon de 50 mL contendo 9 mL de meio SDM com xilose. As amostras foram colocadas a temperatura de 36 °C e agitação de 150 rpm por 20 h,

exceto os microrganismos anaeróbicos facultativos. Após a inoculação dos microrganismos, os tubos foram agitados e realizou-se a primeira coleta (hora 0), sendo retiradas duas amostras de 1 mL e armazenadas em tubos de 2 mL. Uma das amostras foi usada para extração de EPS e a outra amostra foi usada para medição de pH e quantificação de açúcares totais através do método ácido fenol-sulfúrico (WANG et al,2015), utilizando espectrofotômetro a 485 nm. A partir do valor de absorbância obtido foram calculados os valores de açúcares totais comparando-os com valores de concentração de açúcares conhecidas, obtidos por uma curva padrão. Completadas as 20 h de fermentação, fase exponencial dos microrganismos, realizou-se a segunda e última coleta.

### **2.2.3 Meios de cultura**

#### **2.2.3.1 MRS**

A composição dos meios utilizados para o pré-inóculo dos microrganismos em g.L<sup>-1</sup>: extrato de carne (10), extrato de levedura (5), dextrose (20), polisorbato 80 (1), citrato de amônio (2), Acetato de sódio (5), sulfato de manganês (0,05), sulfato de magnésio (0,1), fosfato dipotássico (2).

#### **2.2.3.2 SDM (Meio Semi Definido)**

O meio SDM, utilizado para o preparo do inóculo das fermentações, é composto por g.L<sup>-1</sup> bactocastona (10), base nitrogenada de levedura (5), citrato de amônio (2), acetato de sódio (5), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0.1), MnSO<sub>4</sub> (0.05), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (2), glicerol (10), glicose (2) e 1.0 mL.L<sup>-1</sup> de Tween-80 e pH 6.6 ajustado com NaOH 1 M ou ácido acético 1 M (WANG *et al.*, 2015 modificado). Para a produção de EPS utilizando melaço como fonte de carbono, os substratos utilizados foram os mesmos, nas mesmas concentrações, porém foi substituído o glicerol e glicose para melaço (20 g.L<sup>-1</sup>), de acordo com Wang *et al.* (2015).

### **2.2.4 Processo fermentativo**

A cepa de *L. casei* foi inoculada em 3 L de meio SDM modificado em bioreator (Zeta, modelo Bioreactor System for Cell Culture 2 with bio-t mini® control system, Suíço) encamizado durante 128 h a 37 °C sob agitação de 130 rpm com injeção de NaOH 5 M e Ácido Acético 1 M para controle automático de pH 6.6 sem injeção de O<sub>2</sub>.

## **2.2.5 Métodos analíticos**

### **2.2.5.1 Processamento das amostras**

Para a produção de EPS utilizando glicerol e glicose, 50 mL das amostras foram retiradas em um intervalo de 08 h entre 0 h e 128 h. A densidade ótica foi mensurada por meio de leitura de absorbância a 600 nm (Espectrofotometro marca Bell). Para a produção de EPS utilizando melaço como fonte de carbono, 50 mL de amostra foram retiradas em um intervalo de 12 h entre 0 h e 120 h. A viabilidade celular também foi mensurada por meio de leitura de absorbância a 600 nm.

O emprego de melaço como fonte de carbono para a produção de EPS ocorreu após a obtenção de resultados que mostrassem que o isolado Ke8 fosse capaz de produzir EPS a partir de glicerol e glicose. Portanto, a alteração do intervalo de tempo ocorreu após a análise de trabalhos científicos que mostravam que o aumento do intervalo de tempo de coleta não afetaria negativamente a pesquisa (WANG *et al.*, 2015; ZAROOUR *et al.*, 2017).

### **2.2.6 Avaliação da produção de EPS**

A quantidade de açúcar presente no EPS, expressa em mg.L<sup>-1</sup>, foi estimada pelo método fenol – ácido sulfúrico usando glicose como padrão (DUBOIS *et al.*, 1951; WANG *et al.*, 2015) e a quantidade de EPS produzido, em massa (g.L<sup>-1</sup>), foi obtido pelo peso do EPS liofilizado (Liofilizador modelo L101, marca Liotop).

### **2.2.7 Extração de EPS**

Em 50 mL de meio fermentado, adicionou-se 4% (m/v) de ácido tricloroacético sob agitação por 30 min a temperatura ambiente. As células e as proteínas

precipitadas foram removidas por centrifugação 10.000 xg, 4 °C por 15 min. O EPS bruto foi precipitado do sobrenadante pela adição de 3 volumes de etanol gelado e estocado a 4 °C por 24 h. O EPS produzido foi coletado por centrifugação a 10.000 xg por 20 min, e o pellet foi dissolvido em água deionizada. Para o estudo utilizando xilose como fonte de carbono o EPS foi extraído de acordo com Dilna *et al.* (2015), coletado e quantificado em uma balança de precisão analítica.

### **2.2.8 Isolamento e purificação do EPS**

O EPS foi dialisado em membrana para diálise (Sigma 12 kDa) por 48 h contra água destilada a 4 °C e depois liofilizado (DILNA *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2015). O liofilizado foi fracionado por cromatografia de troca iônica utilizando coluna DEAE-celulose (10 mm x 32 cm) e eluído com NaCl 0.2 M. Frações de 5 mL do eluído foram coletados e o teor de carboidratos foi determinado pelo método fenol – ácido sulfúrico. As frações que continham polissacarídeos foram agrupadas, dialisadas e liofilizadas. O total de carboidratos contidos em 10 mg do EPS purificado e liofilizado foi detectado pelo método ácido fenol-sulfúrico usando glicose como padrão. As proteínas totais foram determinadas pelo método Lowry *et al.* (1951).

### **2.2.9 Caracterização do EPS**

#### **2.2.9.1 Análise do EPS por HPLC**

Amostra de 100 mg de EPS purificado foi hidrolisada com 250 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (4%), a 121 °C por 30 min em autoclave. Adicionou-se ao hidrolizado fase móvel (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.005 N) até a obtenção de 300 µL de amostra. Sua composição foi analisada por HPLC (Shimadu, Japão) utilizando o Rezex ROA – Organic Acid H<sup>+</sup> (8%) com detector IR. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.005 N) foi utilizado como fase móvel em um fluxo de 0.6 mL.min<sup>-1</sup> a 65 °C.

#### **2.2.10 Cromatografia por exclusão de tamanho**

A distribuição de massa molar do EPS foi determinada em um cromatógrafo de exclusão de tamanho da OMNISEC (Malvern Instruments). Utilizou-se os detectores de índice de refração Viscotek RImax (Malvern Instruments). As amostras foram dispersas em uma solução  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  de  $\text{NaNO}_3$  e filtradas em membranas de PTFE  $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ . Foram utilizadas três colunas cromatográficas da marca Shodex, modelo SB-806 HQ (SHOWA Denko, Tóquio, Japão), cuja temperatura foi mantida constantemente a  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ . Foi utilizado fluxo de injeção da fase móvel ( $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$  de  $\text{NaNO}_3$ ) na razão de  $0,7 \text{ mL.min}^{-1}$ . Para o cálculo da massa do polímero, uma curva de calibração foi obtida a partir de padrões de polietilenoglicol (PEG) da marca Varian Palo Alto, CA, cujas massa moleculares estão compreendidas entre 224000 e  $195 \text{ g.mol}^{-1}$  e cujos tempos de retenção também são conhecidos.

### **2.2.11 Análise do EPS por CG-MG**

Para a análise em CG-MS (Shimadzu® GC 2010 Plus acoplado a Espectrômetro de massas MSTQ8030), uma mistura das amostras contendo EPS foi derivatizada. Para isto, uma alíquota da amostra (1 mg) foi hidrolisada em estufa (Marca Fanen) a  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  com  $200 - 500 \text{ }\mu\text{L}$  de ácido trifluoracético (TFA) 1M por um período de 12 h. Após a etapa de hidrólise, o ácido foi removido por evaporação com auxílio de um jato de ar suave.

Os produtos de hidrólise foram suspensos com  $\text{H}_2\text{O}$  destilada ( $100 \text{ }\mu\text{L}$ ) e reduzidos com  $\text{NaBH}_4$  (pH 9,0-10,0) por aproximadamente 12 h. Sucessivamente, foi adicionada resina catiônica (Resina trocadora de cátions fortemente ácida (H+) - DIELAB) na reação, sendo posteriormente filtrada em algodão. O ácido bórico formado durante a reação foi eliminado por co-evaporação com metanol na forma de borato de trimetila.

Os alditóis obtidos após a remoção do ácido bórico foram acetilados com anidrido acético e piridina (1:1, v/v) sob temperatura ambiente por 12 h.

Os acetatos de alditóis foram extraídos pela adição de aproximadamente 1 mL de clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$ ) e a piridina residual na fração clorofórmica foi removida por complexação com sulfato de cobre 5% (m/v). Após a remoção completa da piridina, a amostra foi filtrada em algodão (CLAYDEN *et al.*, 2012).

As amostras foram identificadas por espectrometria de massas, sendo a ionização realizada por impacto eletrônico (70 eV). A temperatura de interface e da fonte de íons foi 280 °C. A coluna utilizada foi Restek Rtx-5ms (30 m x 0.250 mm x 0.25 µm) fundida com sílica. Os parâmetros adotados estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros utilizado no CG-MS

**Rampa de aquecimento da coluna**

	Taxa de variação (°C/min)	Temperatura (°C)	Tempo de espera (min)
0		100	0
1	10	260	1

**Parâmetros operacionais do método CG-EM**

Temperatura do forno da coluna	100 °C
Temperatura de injeção	250 °C
Volume de injeção	1 µL
Pressão	81,6 kPa
Fluxo total	14 mL/min
Fluxo na coluna	1 mL/min
Velocidade linear	37,2 cm/seg
Fluxo de purga	3 mL/min
Split	10

### 2.2.12 Análise do EPS por FT-IR

Os maiores grupos estruturais do EPS purificado foram detectados usando espectroscopia infravermelho por transformada de *Fourier* (FT-IR) e os espectros do EPS foram obtidos pela técnica de reflectância total atenuada (ATR) utilizando cristal de seleneto de zinco. O espectro FT-IR foi registrado em um Perkin Elmer, Frontier na região de 4000-550 cm<sup>-1</sup>. Foram realizadas 64 varreduras com resolução de 4 cm<sup>-1</sup>.



### **2.2.13 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) unidimensional $^1\text{H}^{13}\text{C}$**

Os espectros unidimensionais (1-D) – RMN do EPS foram aferidos em temperatura ambiente usando espectrômetro Bruker Avance III 600 MHz. Ambos  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram analisados. Para a análise, 10 mg de amostra de EPS purificado foi dissolvido em 630  $\mu\text{L}$  de 99.96%  $\text{D}_2\text{O}$ . Os deslocamentos químicos foram expressos em partes por milhão (ppm).

## **2.3 Resultados e discussão**

### **2.3.3.1 Variação do pH durante o processo fermentativo em erlenmeyer**

Na leitura realizada ao início do experimento, todas as amostras possuíam pH próximo a 7, no qual foram inoculados, Figura 2, com exceção dos microrganismos CH25 e B512. Na leitura realizada ao término do experimento, os microrganismos CCC3, B103, Ke2 e Ke11 registraram pH mais básico, enquanto os microrganismos CH25, B512, Ke8 e VINI 6 registraram pH mais ácido, possivelmente pela produção de ácido láctico, visto serem bactérias lácticas (RUAS-MADIEDO et al, 2002).

Para a produção de EPS a partir de glicose com glicerol como fonte de carbono e melão, o pH foi controlado em 6.6.

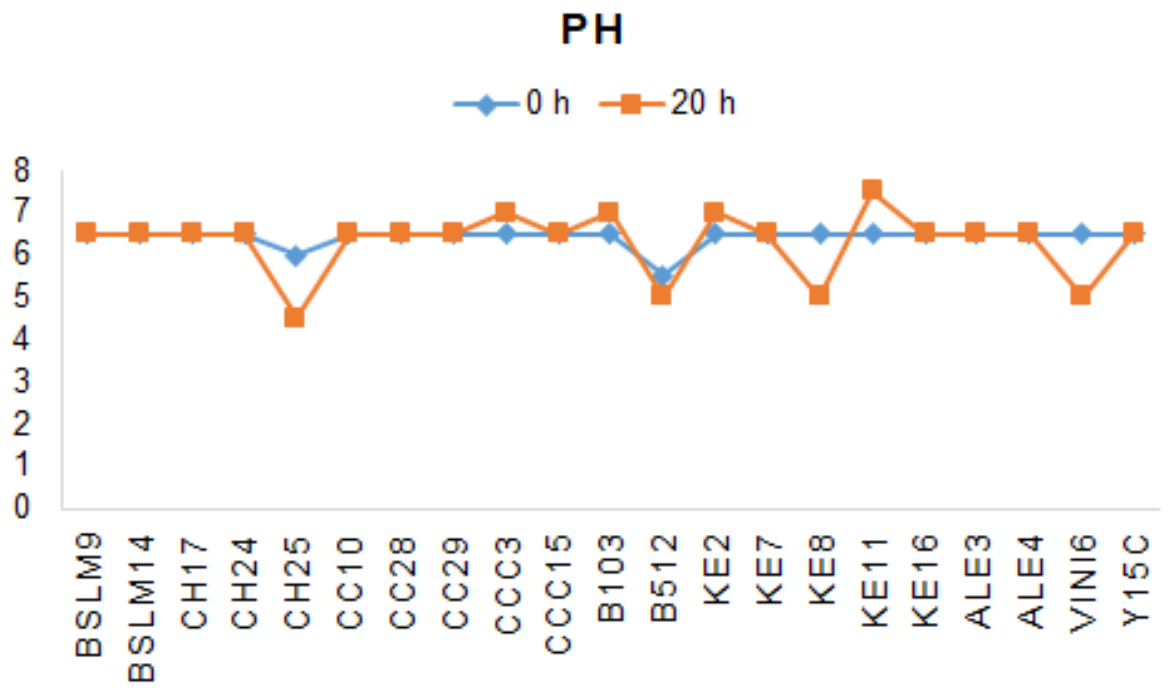


Figura 2. Valores iniciais e finais de pH no processo fermentativo para obtenção de EPS.

### 2.3.3.2 Seleção de microrganismos com potencial para a produção de EPS

A Figura 3 apresenta os 22 isolados estudados para a produção de EPS utilizando-se glicerol como fonte de carbono. Foram coletadas amostras no tempo 0 e no tempo de 20 h e o EPS presente foi precipitado, recolhido e seco a 37 °C (DILNA *et al.*, 2015). Observou-se que o isolado que apresentou maior produção de EPS utilizando glicerol como fonte de carbono, foi a cepa *Lactobacillus casei* (Ke8). Também é possível observar que todos produziram EPS no tempo 0 e isto pode estar relacionado a produção deste biopolímero na etapa de pré-inoculação, visto que foi utilizada uma proporção de 20 g.L<sup>-1</sup> de glicerol e 2 g.L<sup>-1</sup> de fonte de nitrogênio. Sabe-se que para a maioria dos microrganismos produtores de EPS, a relação carbono/nitrogênio é importante e que o estresse causado por essa diferença de concentração induz a produção do biopolímero (MORE *et al.*, 2014).

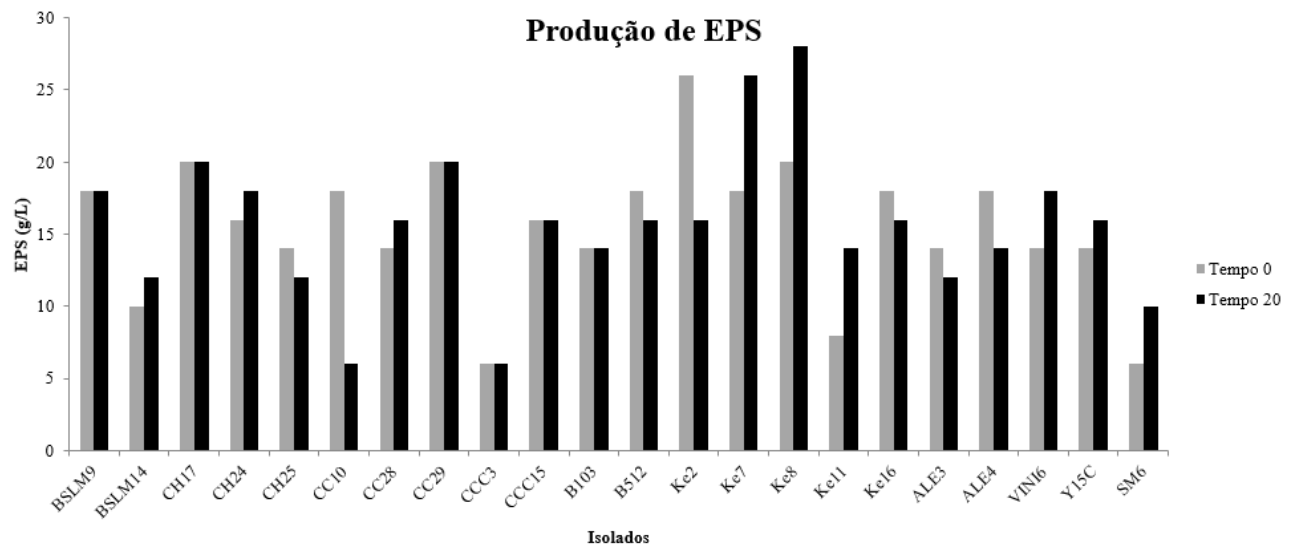


Figura 3. *Screening* da produção de EPS por bactérias potencialmente produtoras de EPS em meio contendo glicerol como fonte de carbono.

Realizou-se também uma pré-seleção de microrganismos para verificar a potencialidade em produzir EPS a partir de xilose como fonte de carbono. A quantidade de EPS obtida variou entre os diferentes isolados, Figura 4. Alguns isolados apresentaram queda na produção do polímero; porém os isolados CH24,

Ke7 e ALE3 apresentaram um aumento na produção de EPS. De acordo com a figura abaixo, provavelmente os microrganismos estudados produziram EPS na etapa pré-fermentativa e ao passo que ocorre o processo fermentativo algumas cepas utilizam do EPS produzido como fonte de carbono, o que está relacionado com a diminuição da concentração do EPS (MORE *et al.*, 2014).

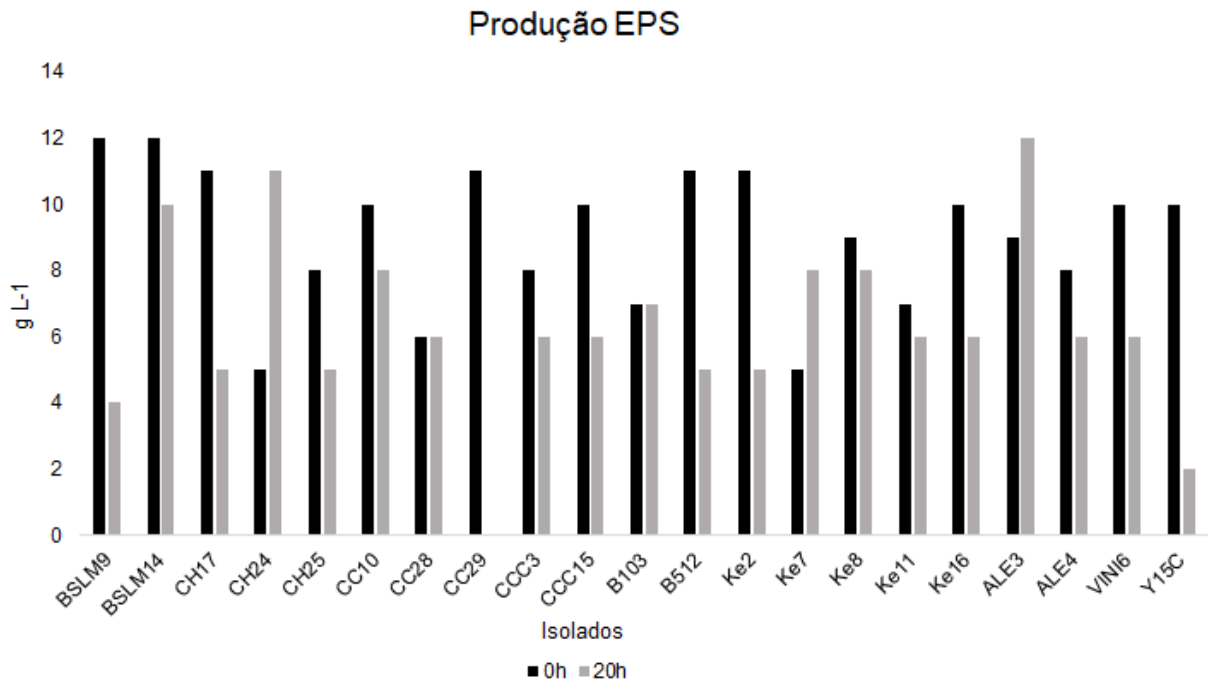


Figura 4. Produção (g.mL<sup>-1</sup>) de EPS entre os isolados utilizando-se xilose como fonte de carbono.

A produção de EPS pode ter sido influenciada pela fonte de carbono, pois estas apresentam vias metabólicas distintas. Como exemplo Celik *et al.*, (2007) relatou que ao testar diferentes fontes de carbono (glicose, manose, frutose e xilose) para dois microrganismos a produção de EPS foi diferente para cada fonte de carbono testada, sendo que com a xilose a produção de EPS foi a mais elevada em ambos os isolados. A produção de EPS também varia de acordo com o gênero e as espécies de microrganismos escolhidas. No estudo conduzido por Kodali *et al.*, (2008) foi utilizado *Bacillus coagulans*, identificado em nosso estudo como ALE 3, e obteve-se concentração de EPS de 0,11 g/L com 36 horas de incubação, enquanto Xu e colaboradores, (2010) utilizou *Lactobacillus paracasei*, identificado em nosso

estudo como Ke7 e relatou obter EPS na concentração de 0,238 g/L com 24 horas de incubação.

### 2.3.3.3 Determinação de açúcares totais

O teor total de açúcares presentes nas amostras foi quantificado através de leitura colorimétrica em comprimento de onda de 485 nm, Figura 5 e na Tabela 3. A partir do valor encontrado foram feitos cálculos utilizando uma curva de calibração com padrões de glicose para determinar a concentração de açúcares totais, Figura 6.

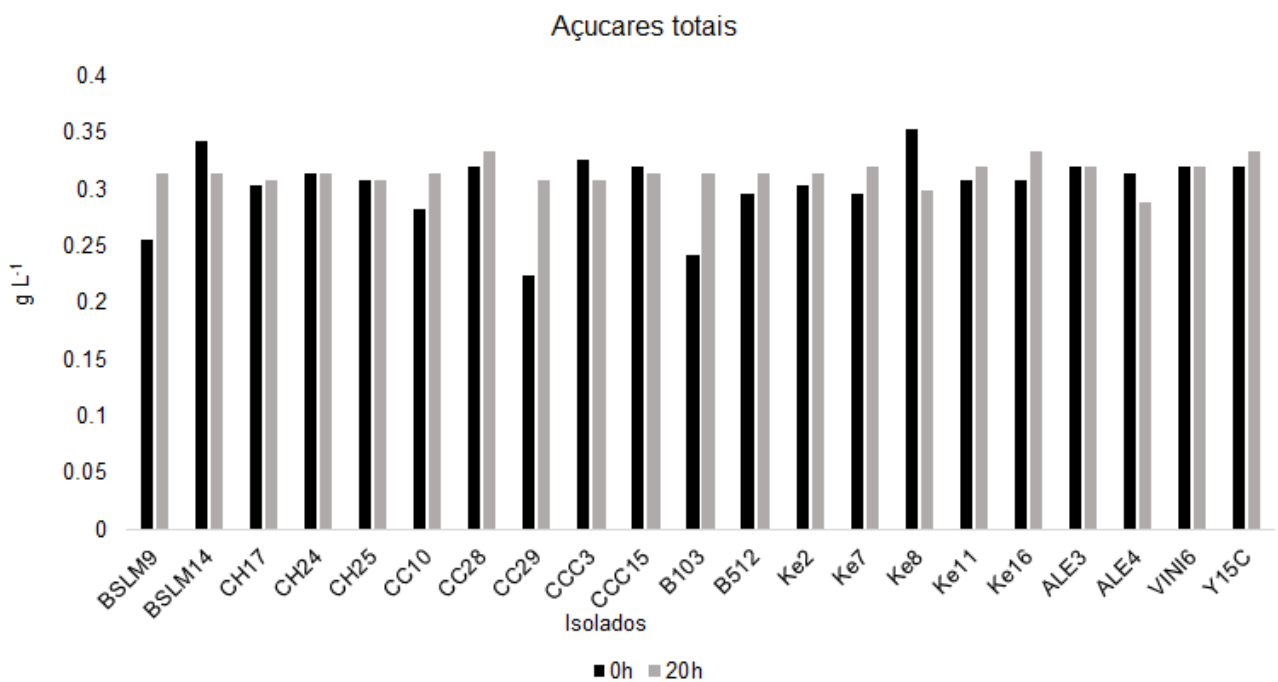


Figura 5. Teores de açúcares totais (Abs<sub>485nm</sub>) no EPS.

Tabela 3. Resultados das análises obtidos nas coletas de hora 0 e hora 20.

Isolado	pH		Produção de EPS (g.L <sup>-1</sup> )		Açúcares totais (g.L <sup>-1</sup> )	
	0h	20h	0h	20h	0h	20h
<b>BSLM9</b>	6,5	6,5	12	4	0,256261	0,31412
<b>BSLM14</b>	6,5	6,5	12	10	0,343079	0,314102
<b>CH17</b>	6,5	6,5	11	5	0,304102	0,308875
<b>CH24</b>	6,5	6,5	5	11	0,314102	0,314102
<b>CH25</b>	6	4,5	8	5	0,308875	0,308875
<b>CC10</b>	6,5	6,5	10	8	0,282625	0,314102
<b>CC28</b>	6,5	6,5	6	6	0,319784	0,333988
<b>CC29</b>	6,5	6,5	11	0	0,223761	0,308875
<b>CCC3</b>	6,5	7,0	8	6	0,326375	0,308875
<b>CCC15</b>	6,5	6,5	10	6	0,319784	0,314102
<b>B103</b>	6,5	7,0	7	7	0,242965	0,314102
<b>B512</b>	5,5	5,0	11	5	0,295806	0,314102
<b>Ke2</b>	6,5	7,0	11	5	0,304102	0,314102
<b>Ke7</b>	6,5	6,5	5	8	0,295806	0,319784
<b>Ke8</b>	6,5	5,0	9	8	0,353988	0,299784
<b>Ke11</b>	6,5	7,5	7	6	0,308875	0,319784
<b>Ke16</b>	6,5	6,5	10	6	0,308875	0,333988
<b>ALE3</b>	6,5	6,5	9	12	0,319784	0,319784
<b>ALE4</b>	6,5	6,5	8	6	0,314102	0,288761
<b>VINI6</b>	6,5	5,0	10	6	0,319784	0,319784
<b>Y15C</b>	6,5	6,5	10	2	0,319784	0,333988

Na maioria das amostras as concentrações iniciais e finais de açúcares mantiveram-se praticamente constantes, indicando que não houve quebra ou redução de açúcares. Os isolados BSLM9, CC29 e B103 apresentaram diferença positiva entre as coletas iniciais e finais, ressaltando que o microrganismo B103 também apresentou diferença no pH do meio. Isto possivelmente ocorreu devido à síntese de compostos que alteraram o pH do meio para alcalino e que também podem ocasionar quebra de açúcares. Já os isolados BSLM9 e CC29 apresentaram queda na produção de EPS, indicando uma possível quebra do polímero.

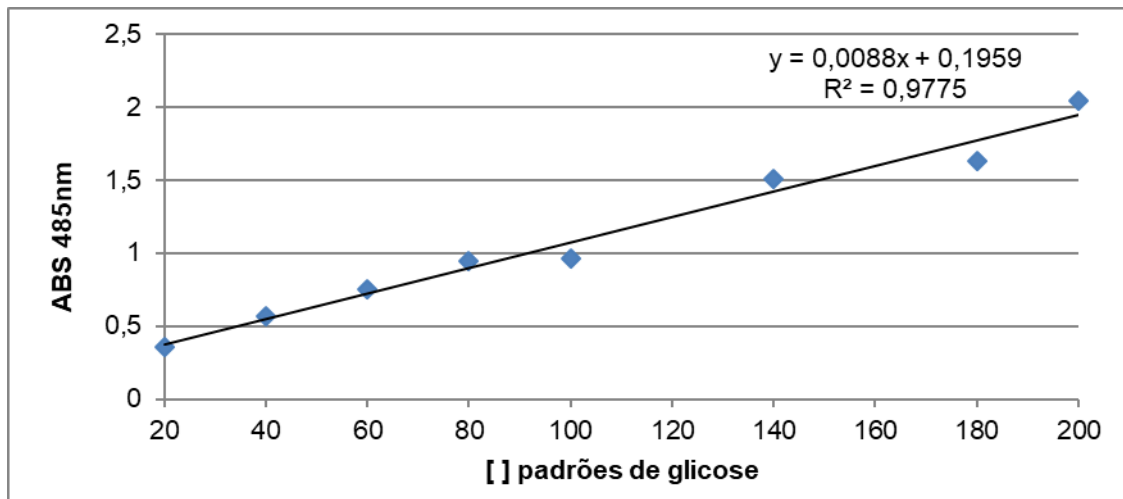


Figura 6.: Curva de calibração e equação da reta ( $Abs_{485nm} = 0,0088.[açúcares] + 0,1959$ ).

#### 2.3.3.4 Fermentação do isolado Ke8 (*L. casei*) em batch utilizando frascos erlenmeyers

Mediante a análise do *screening* para selecionar o isolado com melhor capacidade de produção de EPS, o *Lactobacillus casei* (Ke8) foi o que apresentou uma maior produção de EPS, sendo selecionado para produzir EPS a partir de fontes de carbono alternativas.

Para a realização de estudos em maior escala de produção (bioreator), preliminarmente foi executada uma fermentação em escala de erlenmeyer de 500 mL com volume útil de 100 mL, em mesa agitadora de bancada (shaker), com pH inicial de 6.6. Foi monitorado por um período entre 0 a 120 h, o crescimento bacteriano (Figura 7A) do Ke 8 em glicerol e a produção do EPS (g/L) (Figura 7B).

O Ke 8 apresentou crescimento até 36 h de incubação, sendo as primeiras 12 h de fermentação o período de adaptação do microrganismo em meio MRS com glicerol como fonte de carbono e seu maior crescimento foi observado em 36 h de fermentação. Estas características obtidas também foram encontradas por Wang *et al.* (2015). Após 36 h de incubação, pode-se dizer que o Ke 8 entrou na sua fase estacionária e de declínio.

De acordo com a Figura 7A, o isolado Ke8 apresentou DO máxima de 0,7. Quando comparado com o uso de outras fontes de carbono como glicose. Amjres *et*

*al.* (2015) obtiveram uma  $DO_{600nm}$  máxima de 3, enquanto neste trabalho foi obtido cerca de 0,7. Entretanto, Amjres *et al.* 2015 utilizaram glicose como fonte de carbono. Segundo Nouha *et al.* (2018) o uso de diferentes fontes de carbono pode alterar a composição e a produção de EPS devido as diferentes vias metabólicas utilizadas para metabolizar a fonte de carbono, e relatam que a glicose é a fonte de carbono mais fácil de se metabolizar, sendo degradada em piruvato e oxidada para formar acetil-CoA. Sabe-se que algumas células de microrganismos são limitadas em relação à absorção de glicerol para dentro da célula, apresentando dificuldades ou desvantagens de crescimento (SILVA *et al.*, 2009).

A produção de EPS obteve seu maior valor em 24 h de fermentação, alcançando aproximadamente  $4 \text{ g.L}^{-1}$  (Figura 3B). O perfil de produção do EPS indicou, possivelmente, que é caracterizado como metabólito primário, pois ao passo em que o isolado Ke8 se desenvolve há produção de EPS, ou seja, o EPS está sendo produzido junto a fase exponencial do microrganismo (MORE *et al.*, 2014). Este perfil de produção também foi encontrado por Amjres *et al.* (2015). Após as 24 h de fermentação há um decréscimo na produção de EPS até 42 h de fermentação e em 48 h tem-se um novo pico de produção. Este pico pode estar relacionado as condições nutricionais do meio, pois sabe-se que a produção de EPS está relacionada com o estresse causado ao seu hospedeiro, podendo ser por diferença de concentração de fonte de carbono e nitrogênio, alteração de pH e temperatura, entre outras (MORE *et al.*, 2014; DEO; DAVRAY; KULKARNI, 2019; DERTLI *et al.*, 2016; NGUYEN *et al.*, 2021).

Diante dos resultados obtidos para a produção de EPS a partir do emprego de glicerol como parte da fonte de carbono, o próximo passo foi utilizar o Ke8 na produção de EPS utilizando melão como fonte de carbono.



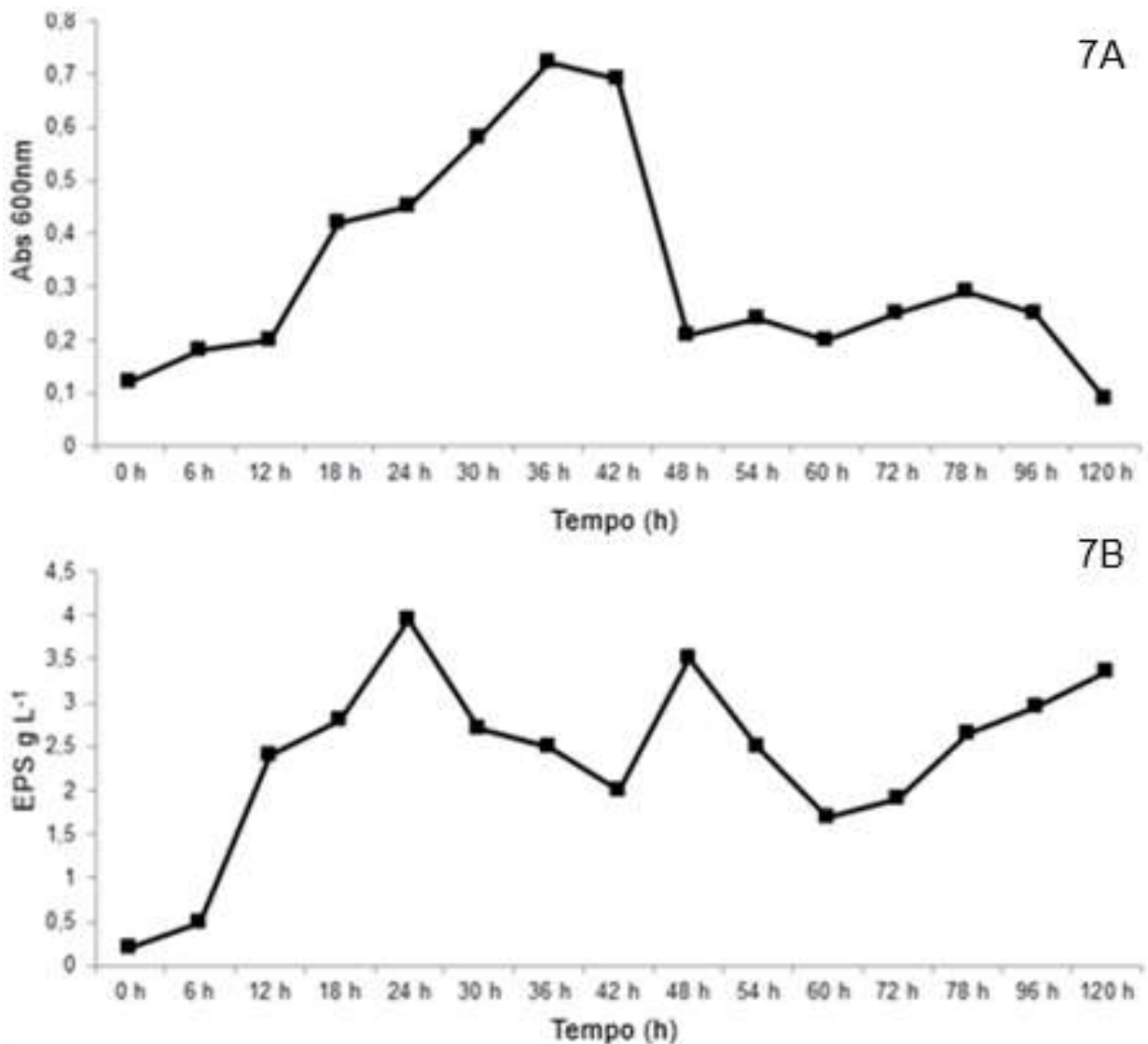


Figura 7. Monitoramento do crescimento (A) e do processo fermentativo, em erlenmeyer, para produção de EPS por *Lactobacillus casei* Ke8 (B), sob 130 rpm, 37 °C e pH de 6.6

### 2.3.3.5 Cinética de crescimento e produção

A relação entre o crescimento bacteriano e a produção de EPS durante todo o processo fermentativo está representada pela Figura 8. Nota-se que desde o tempo 0h foi possível quantificar EPS e que a maior quantidade de EPS foi 1.8 mg.L<sup>-1</sup> obtida em 16 h de fermentação. No período de crescimento exponencial de *L. casei*, 16 a 32 h, há um decréscimo na produção de EPS, o que pode ser devido tanto ao uso deste polímero como fonte de carbono por ser composto basicamente de

carboidratos e proteínas (ZHANG; BISHOP, 2003; RIVARO *et al.*, 2021) como também devido a enzimas capazes de degradá-lo, como por exemplo dextranase e glicosil-hidrolases (MORE *et al.*, 2014; SHENG, 2006; ZHANG; BISHOP, 2003; LYNCH *et al.*, 2018).

A produção de EPS permanece relativamente constante no intervalo de 40 a 104 h, fase estacionária e início de uma nova fase exponencial do microrganismo. Segundo More *et al.* (2014), FARRAH; UNZ, (1976) e KURANE; HATAKEYAMA; TSUGENO, (1991) o EPS pode ser produzido associado ao crescimento celular, simultaneamente durante o início e meio da fase exponencial ou no meio da fase exponencial, podendo apresentar produção em diferentes estágios na etapa fermentativa, como metabólito primário ou secundário (MORE *et al.*, 2014).

Em 56 h de fermentação o micro-organismo cresceu novamente, enquanto a produção de EPS diminuiu, o que pode estar relacionado ao uso do EPS como fonte de carbono (MORE *et al.*, 2014). Após 104 h de fermentação, o EPS produzido é caracterizado como metabólito secundário, o que também foi encontrado por Wang *et al.* (2015), pois mostraram produção de EPS no período em que o microrganismo já havia atingido a fase estacionária.

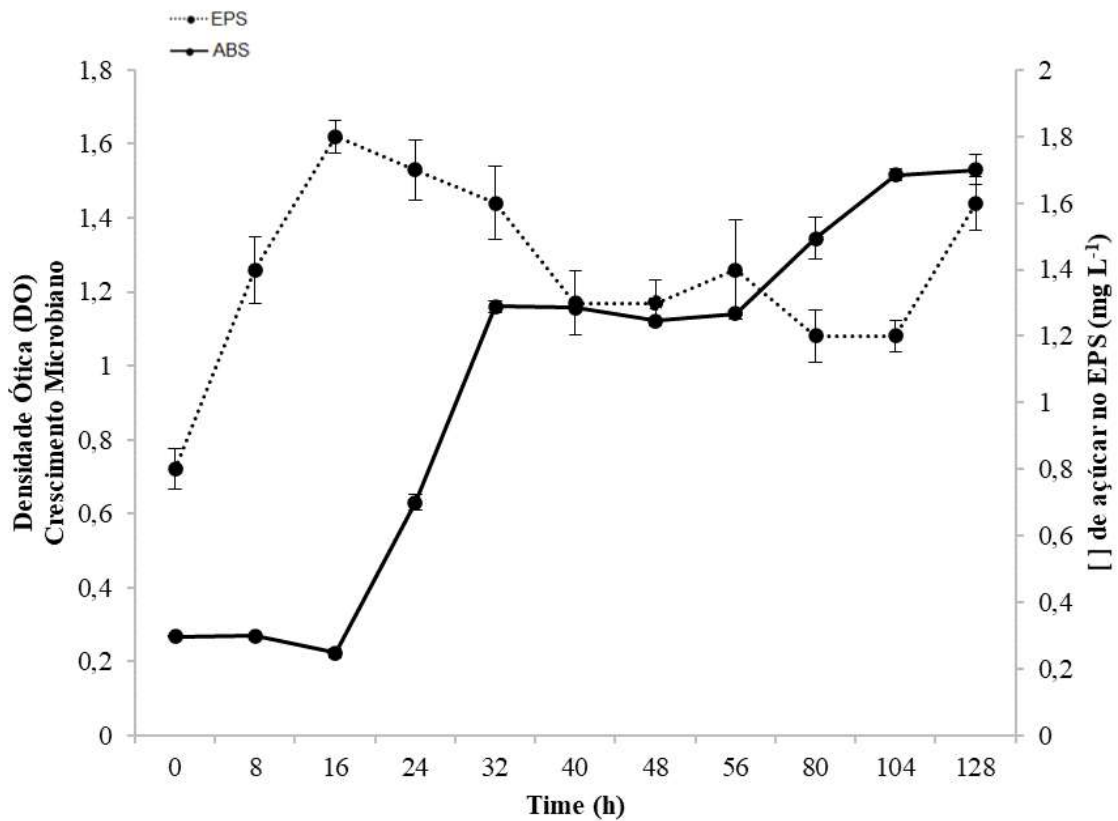


Figura 8. Correlação entre crescimento bacteriano e produção de EPS em meio SDM durante 128 h de fermentação a 37 °C sob agitação de 130 rpm em meio contendo glicerol e glicose como fonte de carbono.

Embora a capacidade desta cepa de produzir EPS em um curto espaço de tempo (dentro de 16 horas de fermentação) seja um atributo desejável, a rápida redução do EPS paralelamente ao crescimento celular de *Lactobacillus casei*, Ke8, é bastante incomum e pode limitar a aplicação prática da mesma. Devido à degradação enzimática ou mudança nos parâmetros físicos e/ou químicos dos meios de cultura, vários estudos têm demonstrado a redução no rendimento de EPS ao longo do tempo, mas essa diminuição foi geralmente observada na fase estacionária ou na fase de declínio do crescimento.

A partir de *Lactobacillus rhamnosus*, Pham e colaboradores (2000) produziram EPS utilizando glicose ou lactose como fonte de carbono e relataram obter 500 mg.L<sup>-1</sup> de EPS. Segundo os autores, a produção de EPS está parcialmente associada ao crescimento do microrganismo e a quantidade de EPS produzida diminuiu com a fermentação prolongada. Diante deste fato, eles também avaliaram a

degradação do EPS no processo fermentativo através da medida de suas massas molares e viscosidades, e encontraram uma enzima despolimerizante no meio de fermentação. De acordo com os pesquisadores o seu estudo sobre perfis de produção enzimática mostrou um grande espectro de glicohidrolases ( $\alpha$ -D-glucosidase,  $\beta$ -D-glucosidase,  $\alpha$ -D-galactosidase,  $\beta$ -D-galactosidase,  $\beta$ -D-glucuronidase e alguns traços de  $\alpha$ -L-ramnosidase), sendo encontradas em seu estudo duas delas:  $\alpha$ -D-glucosidase e  $\beta$ -D-glucuronidase. Cerning *et al.* (1992) produziu EPS a partir de cepas de *Lactococcus lactis ssp* e *Lactobacillus casei* obtendo produção de polissacarídeo variando de 30 a 600 mg.L<sup>-1</sup>. Gancel e Novel (1994) relataram que *Streptococcus salivarius ssp.* foi capaz de produzir EPS e que este microrganismo apresentou produção ótima de polissacarídeos utilizando lactose ou sacarose como fonte de carbono, além das condições definidas de temperatura e pH inicial de crescimento. Afirmam que também encontraram sistemas degradativos de polissacarídeos e que fatores ambientais podem desencadear efeitos na produção e na degradação de EPS pelos microrganismos.

Apesar da dificuldade de explicar a redução precoce de EPS e biomassa observada neste estudo, pode-se dizer que a alta taxa de crescimento da bactéria (DO<sub>600nm</sub> 1.5) pode impactar negativamente a estabilidade do EPS e a biossíntese, uma vez que eles podem ser rapidamente hidrolisados pela bactéria para atender sua crescente demanda nutricional. A biossíntese de EPS é estimulada pela diminuição da taxa de crescimento (CERNING, J., 1992; GANCEL; NOVEL, 1994; LOOIJESTEIJN; HUGENHOLTZ, 1999)

De acordo com a literatura, a quantidade de EPS produzida por várias cepas bacterianas é altamente variável, sendo os rendimentos mais baixos geralmente produzidos por bactérias do ácido láctico (LAB). A maioria delas produz entre 0,01-2,0 g L<sup>-1</sup> (BADEL; BERNARDI; MICHAUD, 2011; REN *et al.*, 2020). Os *Lactobacillus* são os menores produtores de EPS, geralmente produzindo menos de 1,0 g.L<sup>-1</sup> (BADEL; BERNARDI; MICHAUD, 2011). Isto acontece pois LAB acidifica os meios de cultura abaixo de pH 5,0 causando ativação de glicosil-hidrolase que resulta na digestão/hidrólise enzimática do EPS produzido; diminuindo significativamente os rendimentos finais (BADEL; BERNARDI; MICHAUD, 2011). Entretanto, EPS de LAB estão sendo mais utilizados por serem classificados como GRAS (geralmente

reconhecido como seguro), sendo uma alternativa natural importante fazendo com que as cepas produtoras de EPS tenham grande potencial comercial (ZHU *et al.*, 2019).

Devido as condições de melhor desempenho nos estudos em erlenmeyers, dados apresentados no item 2.3.3.4, Figura 7, o microrganismo *L.casei* foi utilizado para a produção de EPS a partir de melaço como única fonte de carbono. A Figura 9 apresenta a relação entre concentração de EPS presente no EPS comparado ao crescimento celular bacteriano em função do tempo de fermentação. Nota-se que a produção de EPS apresenta-se associada ao crescimento bacteriano. A produção de EPS manteve-se crescente até 48 h, tempo de maior produção do biopolímero, e após este período, houve decréscimo na sua produção. O crescimento bacteriano, como observado, apresentou perfil semelhante ao de produção com uma DO de 1,4 em 48 h de fermentação. Pode-se dizer que até 12 h de fermentação a cepa de *L. casei* se encontrava na fase de adaptação ao meio e que com 48 h atingiu seu máximo crescimento e produção de biopolímero. Neste caso, o EPS produzido é caracterizado como metabólito associado ao crescimento.

O melaço utilizado como única fonte de carbono foi promissor para o crescimento e desenvolvimento celular, bem como para a produção de EPS, pois pode-se observar que em 48 h de fermentação foram obtidos cerca de 140 mg.L<sup>-1</sup> de EPS com DO<sub>600nm</sub> de aproximadamente 1,4.

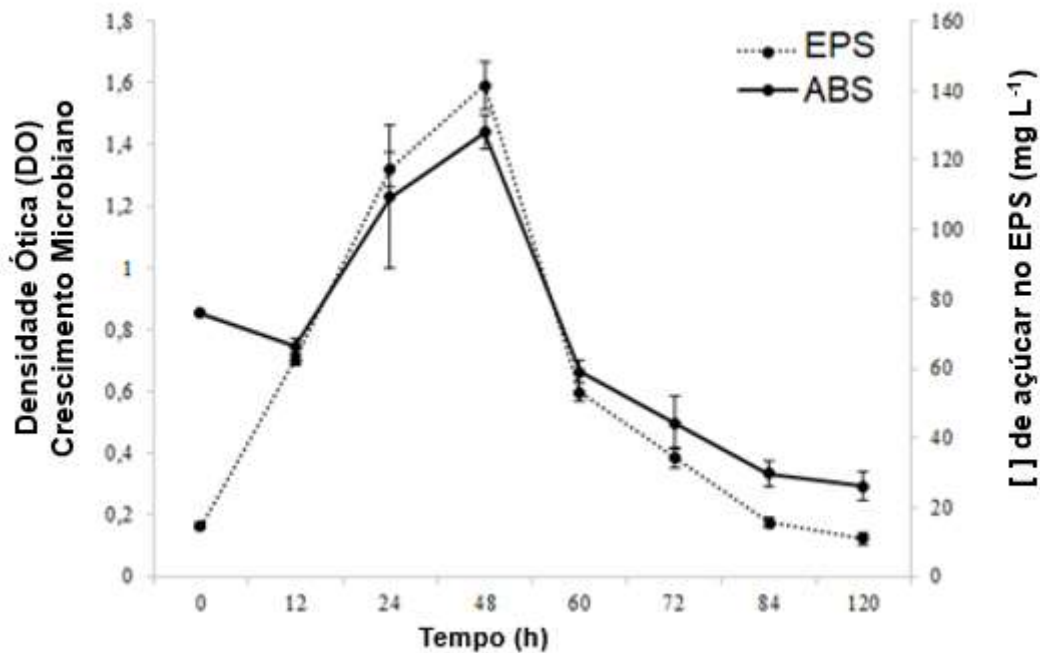


Figura 9. Correlação entre crescimento bacteriano e produção de EPS durante 120 h de fermentação a 37 °C sob agitação de 130 rpm em meio contendo melaço como fonte de carbono.

### 2.3.3.6 Extração e purificação do EPS

A amostra coletada da coluna DEAE-celulose, volume total 100 mL, equivalente a 10x o volume total da coluna, foi dialisada, liofilizada, pesada e utilizada para a caracterização físico química. As análises de carboidrato e proteína total foram calculadas de acordo com uma equação da reta obtida por uma curva de calibração que utilizou soro albumina bovina como padrão para quantificar proteínas e glicose para quantificar carboidratos. As Figura 10 e 11 apresentam as curvas de calibração obtidas para quantificar carboidratos e proteínas, respectivamente, nas amostras. Para o cálculo da concentração de carboidratos, foram unidas as amostras que apresentaram maior absorbância. O teor de carboidrato obtido referente ao uso de glicose e glicerol como fonte de carbono foi de 39,4%, enquanto que para o uso de melaço como fonte de carbono foi de 52,9%. O teor de proteínas obtido para o estudo que utilizou glicose e glicerol como fonte de carbono foi de

18%, enquanto que para a produção de EPS utilizando melaço foi de 11,69%. Wang *et al* (2015) encontraram 92.35% de carboidrato e 1.38% de proteína no EPS purificado e uma produção total de EPS de 0.09 g.L<sup>-1</sup>, em meio semi definido com glicose como fonte de carbono. Gupta & Takur (2016) relatam ter obtido 1.67 g.L<sup>-1</sup> de EPS. Botelho *et al.* (2014) obtiveram 18 mg.mL<sup>-1</sup> de EPS composto por 22% de carboidratos e 2% de proteína em meio utilizando leite de soja como fonte de carbono. Nota-se que a produção, em massa, de EPS obtida neste trabalho usando glicerol e glicose como fonte de carbono foi eficiente, pois apresentou 3.0 g.L<sup>-1</sup> (m/m) e com o uso de melaço foi de 3.5 g.L<sup>-1</sup> (m/m) quando comparada com os trabalhos mencionados.

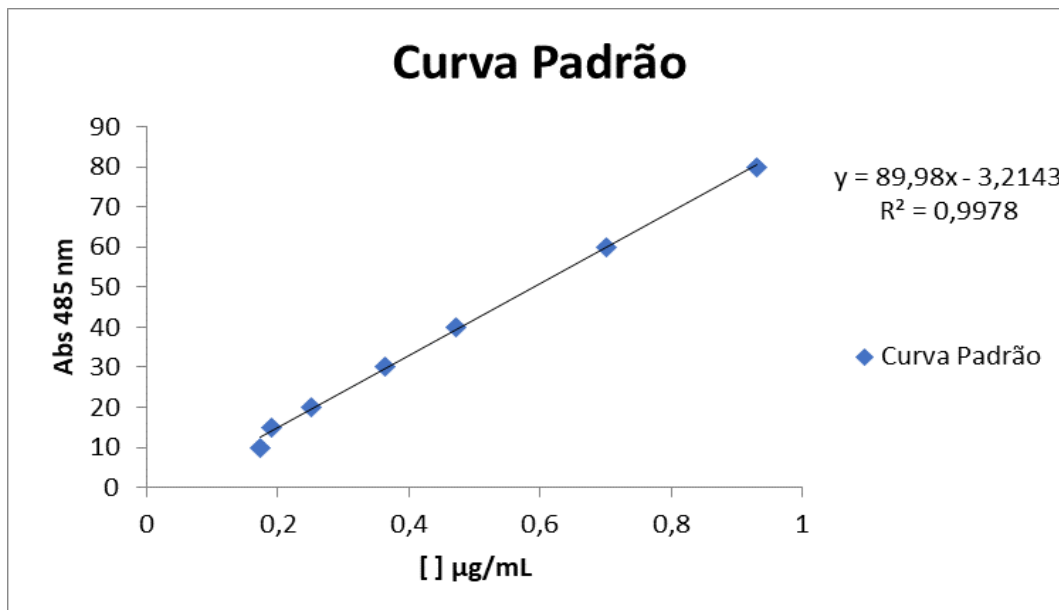


Figura 10. Curva de calibração para obtenção dos valores de carboidratos contidos na amostra ( $Abs_{485nm} = 89,98.[açúcares] - 3,2143$ )

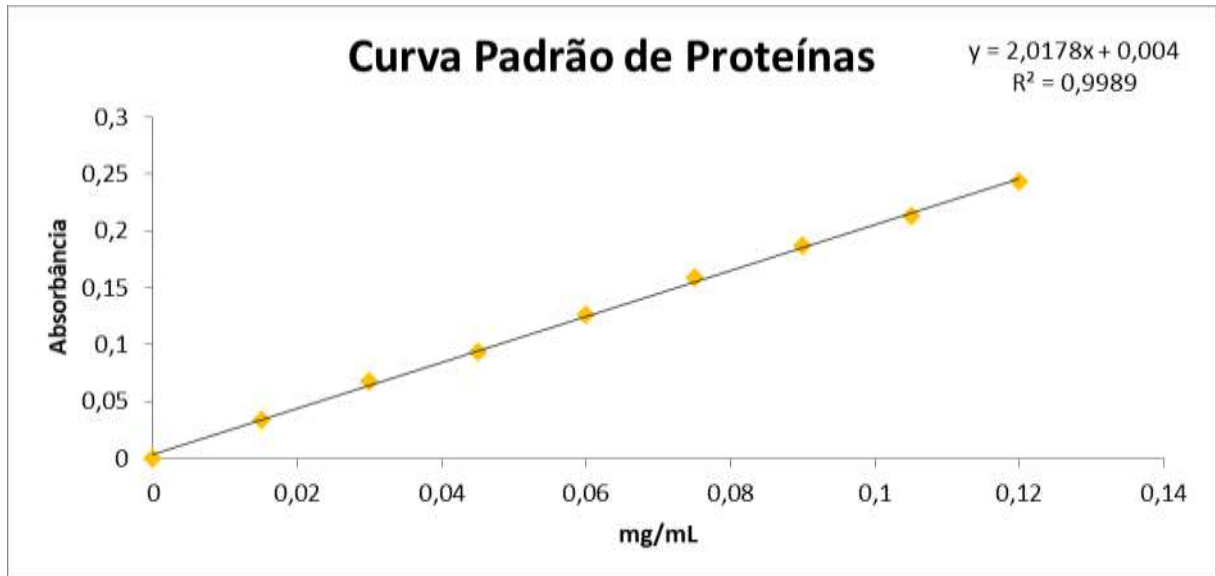


Figura 11. Curva de Calibração para obtenção dos valores de proteínas contidas na amostra ( $Abs_{600nm} = 2,0178 [\text{proteínas}] - 0,004$ )

### 2.3.3.7 Análise do EPS produzido a partir de glicerol/glicose e melão por HPLC

A análise por HPLC revelou que o EPS obtido a partir de *Lactobacillus casei* utilizando glicerol e glicose como fonte de carbono é classificado como heteropolissacarídeo composto por glicose e manose, Figura 12.

O tempo de retenção da glicose é de 10,416 e o da manose é de 10,8 min, com picos característicos por apresentarem áreas de 18119 e 14668, altura de 923 e 880 e concentrações de  $0,066 \text{ g.L}^{-1}$  e  $0,046 \text{ g.L}^{-1}$ , respectivamente. Este tipo de EPS também foi encontrado por pesquisadores utilizando leite desnatado, lactose, galactose, glicose e sucrose como fonte de carbono e outros microrganismos (DILNA *et al.*, 2015).



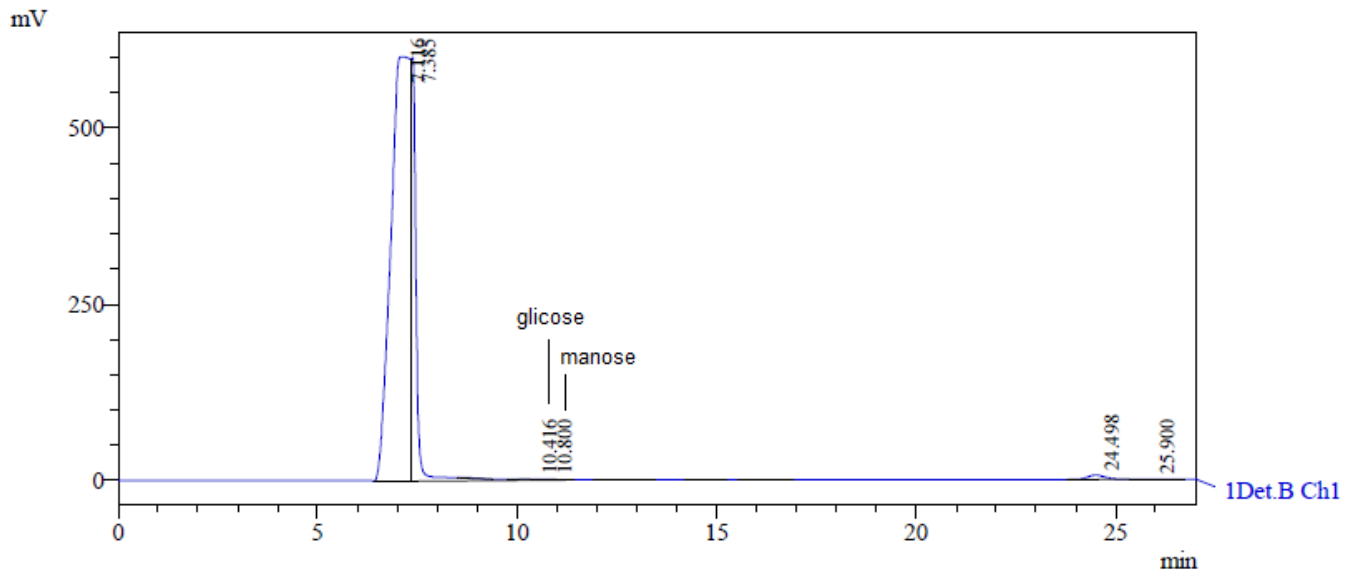


Figura 12. Cromatograma de HPLC mostrando a composição de monossacarídeo de EPS hidrolisado. O pico em 10,416 corresponde à glicose e o pico em 10,800 representa manose.

O EPS obtido por *L. casei* a partir de melão como fonte de carbono é classificado como heteropolissacarídeo composto por glicose, galactose e arabinose, Figura 13.

O tempo de retenção da glicose é de 9,767, da arabinose é de 11,679 e o da galactose é de 11,086 min, com picos característicos por apresentarem áreas de 303076, 1173146 e 3465224, altura de 11857, 43237 e 144188 respectivamente. As concentrações obtidas foram  $2,245 \text{ g.L}^{-1}$  para glicose,  $4,742 \text{ g.L}^{-1}$  para arabinose e  $14,290 \text{ g.L}^{-1}$  para galactose. Zhou *et al.* (2021) encontraram EPS composto por carboidratos como galactose, arabinose, glicose e manose, a partir de *L. casei* em meio SDM com melão como fonte de carbono. A galactose e a glicose são os monossacarídeos mais comuns de ser encontrado na constituição do EPS (ZHOU *et al.*, 2021). Em um estudo utilizando *Lactobacillus casei* ssp. produziu-se heteropolissacarídeos, quando cultivados em meio contendo leite e ultrafiltrado do que, os quais eram fontes principalmente de galactose e glicose, sendo que o EPS produzido mostrava predominância de galactose na composição. No entanto, pequenas quantidades de manose, ramnose e pentoses também foram identificadas (CERNING *et al.*, 1992).

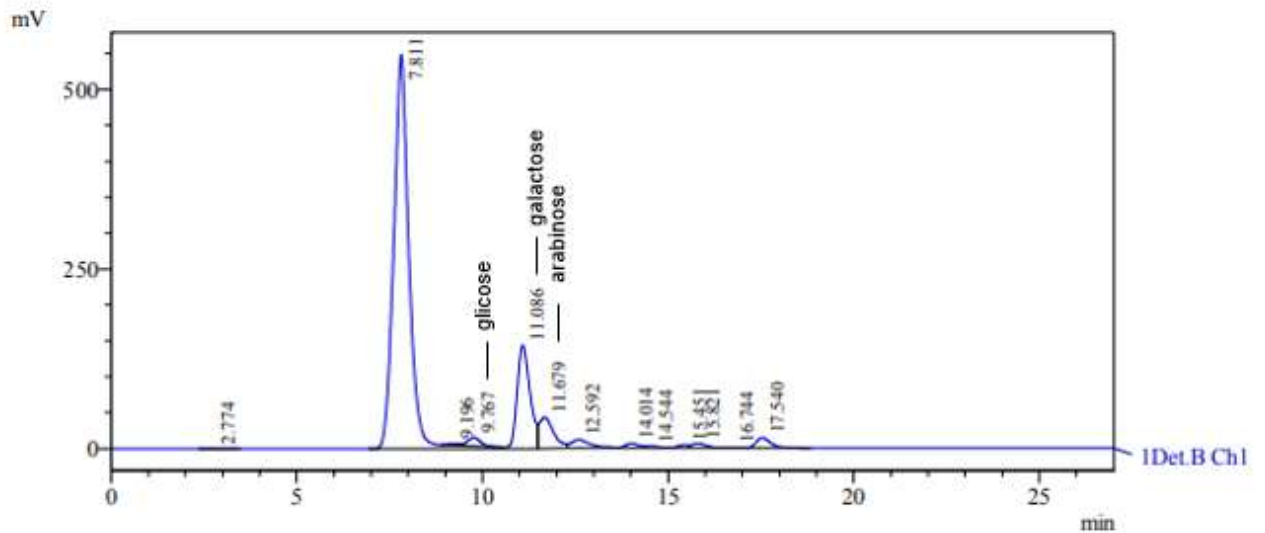


Figura 13. Cromatograma de HPLC mostrando a composição de monossacarídeo de EPS hidrolisado. O pico em 10,416 corresponde à glicose e o pico em 10,800 representa manose.

### 2.3.3.8 Cromatografia por exclusão

O cromatograma por exclusão de tamanho apresentou um único pico com tempo de retenção em 32,56 mL, Figura 14. De acordo com os dados obtidos, o EPS obtido pelo uso de glicerol e glicose como fonte de carbono possui distribuição de massa molar em massa ( $M_w$ ) de  $106 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  e dispersividade ( $D=M_w/M_n$ ) de 1,658.

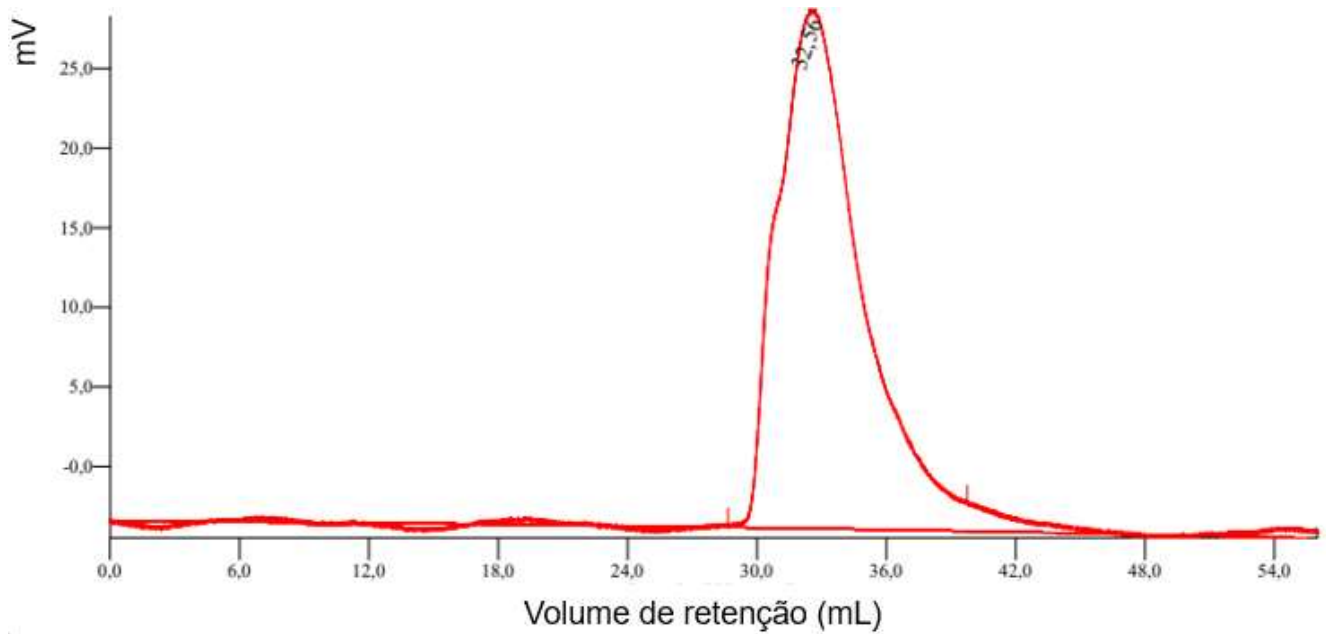


Figura 14. Cromatograma por técnica de cromatografia de exclusão mostrando a massa do EPS obtido a partir de glicerol e glicose como fonte de carbono utilizando coluna *Showa denko sb 806*.

O cromatograma por exclusão de tamanho do EPS produzido utilizando melão como fonte de carbono apresentou um único pico com tempo de retenção em 33,11 mL, Figura 15. De acordo com os dados obtidos, o EPS possui distribuição de massa molecular (MW) de  $81 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  e dispersividade ( $D=M_w/M_n$ ) de 1,479.

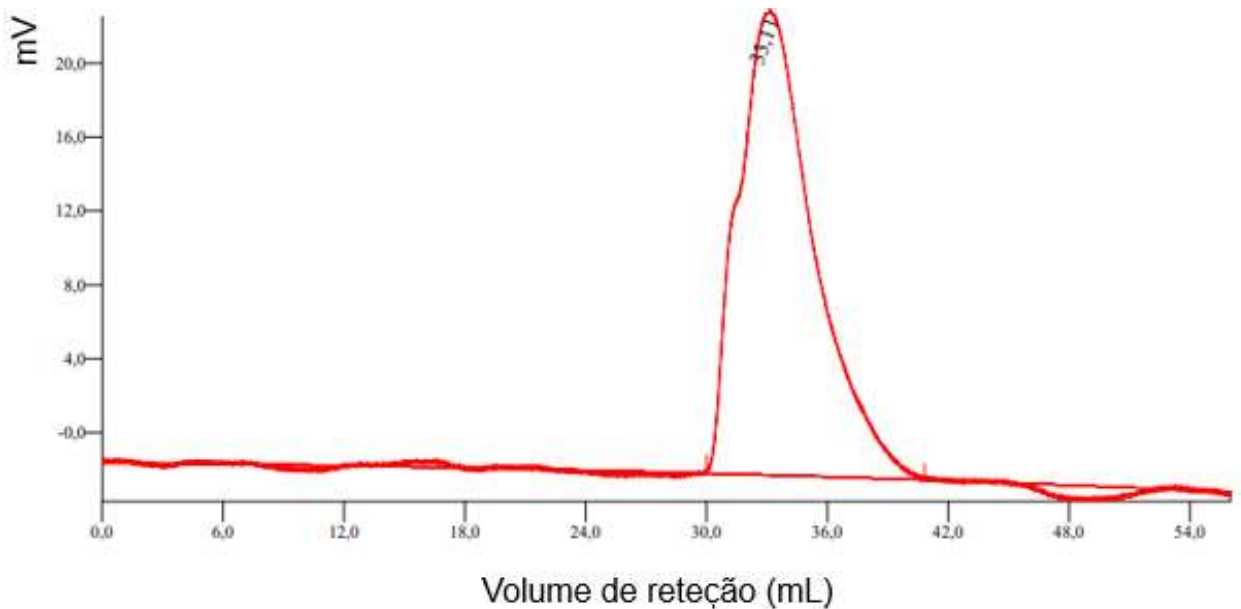


Figura 15. Cromatograma por técnica de cromatografia de exclusão mostrando a massa do EPS obtido a partir de meloço como fonte de carbono utilizando coluna *Showa denko sb 806*.

### 2.3.3.9 Composição monossacarídea do EPS, análise CG-MS

Para conhecer a composição estrutural da molécula, os cromatogramas do EPS obtido por CG-MS foram comparados com os cromatogramas dos padrões de açúcares: manose, raminose, arabinose, frutose, glicose e galactose, bem como com a biblioteca *National Institute of Standards and Technology* (NIST). Provavelmente, devido a baixa concentração de carboidratos na molécula de EPS foi necessário monitoramento de íons nas amostras padrões de açúcares com o intuito de detectá-los na amostra de EPS obtida. Portanto, os seguintes fragmentos de íons precursores monitorados foram 115, 128, 139, 145, 170 e 187 m/z.

A Figura 16 representa a composição do EPS obtido por *L. casei* utilizando glicerol e glicose como fonte de carbono. Observa-se que os íons 115, 128, 139, 145, 170 e 187 m/z estão presentes na amostra. O espectro de massas obtido através do monitoramento dos íons foi comparado com a biblioteca NIST contida no próprio equipamento e a análise CG-MS da composição do EPS oriundo de *L. casei* sugere que sua composição é D- manitol e D-glucitol (manose e glicose).

Sabe-se que bactérias produtoras de ácido lático são capazes de sintetizar EPS aplicáveis na área alimentícia, farmacêutica e ambiental, pois podem compor uma nova geração de aditivos alimentares naturais, inofensivos e prebióticos (BADEL; BERNARDI; MICHAUD, 2011; BOTELHO *et al.*, 2014; GALLE; ARENDT, 2014; OLEKSY-SOBCZAK; KLEWICKA; PIEKARSKA-RADZIK, 2020; PAIVA *et al.*, 2016). Por apresentarem afinidade eletrostática podem servir de agentes adsortivos de metais pesados em processos de descontaminação e até mesmo como redutores potenciais de elementos traços (HA *et al.*, 2010; ZENG *et al.*, 2020). Huang *et al.* (2020) encontraram esta mesma composição em EPS produzido por *L. plantarum* e sugeriram, a partir dos resultados obtidos nos estudos realizados, que este EPS inibe a atividade da  $\alpha$ -amilase no pâncreas e tem potencial aplicação na prevenção e alívio do diabetes mellitus. Mathivanan *et al.* (2020) encontraram EPS composto por manose, raminose, glicose e xilose e relatam que este apresentou atividade de emulsificação e floculação podendo ser aplicado na indústria biotecnológica na remoção de metais. Ibrahim e colaboradores (2020) relatam que os grupos ativos (hidroxila, amino e carbonila) presente no EPS composto por manose e glicose, produzido por *Halobacillus sp.* formam complexos com metais pesados e protegem a célula bacteriana contra a toxicidade a zinco, cádmio, chumbo, níquel, e cobre até 5 mM. Caruso *et al.* (2018) relatam ter obtido EPS composto por galactose, glicose e manose que pode ser utilizado como crioprotetor para isolados microbianos, pois melhorou a sobrevivência ao congelamento e descongelamento dos isolados. Di *et al.* (2017) obtiveram a partir de *L. casei* EPS composto por galactose, glicose e manose. Este polímero exibiu efeitos anti tumorais significativos contra células de câncer do cólon (intestino grosso) e concluíram que o EPS encontrado pode ser usado em produtos alimentícios e na área médica.

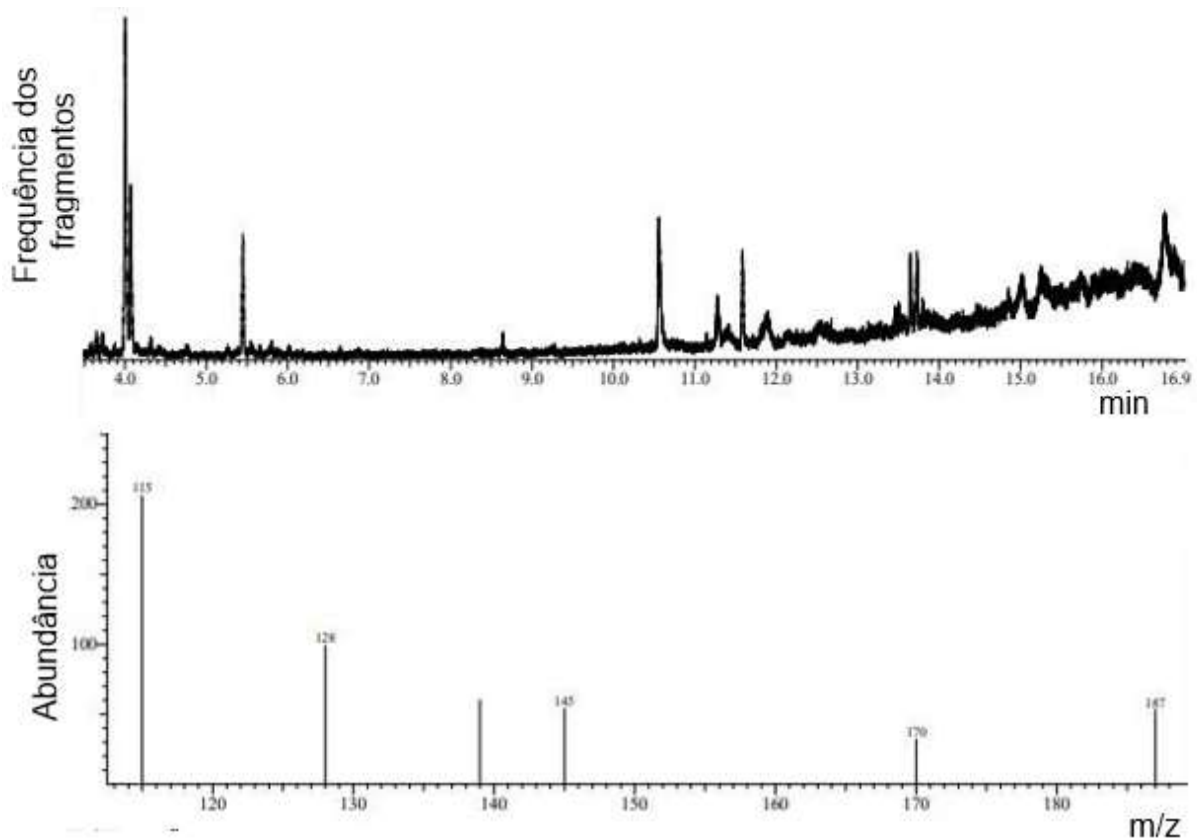


Figura 16. Perfil de fragmentação dos acetatos de alditóis após derivatização química da molécula de EPS obtido por *L. casei*.

### 2.3.3.10 Análise do EPS obtido por FT-IR

A espectroscopia de infravermelho com transformada de *Fourier* é utilizada para monitorar as mudanças estruturais dos biopolímeros (TRABELSI *et al.*, 2015) e para identificar os grupos funcionais em EPS (ZHU *et al.*, 2019; RAJOKA *et al.*, 2019).

O espectro de FT-IR do EPS, Figura 17, revelou numerosas bandas dentro da faixa de 4000-800  $\text{cm}^{-1}$ . O EPS de *L. casei* mostrou um número significativo de grupos hidroxila, característico por apresentar uma banda alongada, ampla e intensa em torno de 3400  $\text{cm}^{-1}$ , confirmando a natureza do polímero de polissacarídeo como observado por (WANG *et al.*, 2015; TRABELSI *et al.*, 2015; SAMPAIO *et al.*, 2020).

Os espectros de FT-IR do EPS (Figuras 17 e 18) revelaram características funcionais, incluindo um grupo hidroxila de amplo alongamento em 3.400  $\text{cm}^{-1}$ , dois

picos de vibração de estiramento ou alongamento axial de C-H, sendo um em torno de 2925 e em 2856  $\text{cm}^{-1}$  correspondendo a grupos metil e metileno (TRABELSI *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015; RAJOKA *et al.*, 2019). Também são observadas dobras simétricas dos grupos metila e metileno na região de 1400  $\text{cm}^{-1}$  e absorção em 1740  $\text{cm}^{-1}$  corresponde a um grupo C=O (PAN & MEI, 2010; WANG *et al.*, 2015). Essas bandas características são encontradas estiramentos de carboxilatos, no qual um estiramento assimétrico é observado na região de 1600  $\text{cm}^{-1}$  e um estiramento simétrico é observado na região de 1400  $\text{cm}^{-1}$  (PIAZZA *et al.*, 2017; PAVIA *et al.*, 2001).

A amostra apresentou absorbância na região de 1200-970  $\text{cm}^{-1}$  que é considerada a região de identificação de exopolissacarídeos, a qual designa a ocorrência de carboidratos (DILNA *et al.*, 2015; PAJOKA *et al.*, 2019). A banda obtida em 1094  $\text{cm}^{-1}$  indica a presença de ligação glicosídica  $\alpha$ -1-6 (DILNA *et al.*, 2015; SAMPAIO *et al.*, 2020), mostrando a possível ocorrência de ramificação. A baixa absorção na região de 815  $\text{cm}^{-1}$  e na região anomérica entre 970 - 730  $\text{cm}^{-1}$ , corresponde a existência de manose (DILNA *et al.*, 2015. MATHLOUTHI & KOENIG, 1986).

As bandas presentes na região de 1200 a 970  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídas ao estiramento C–O–C característicos de  $\alpha$ -piranose carboidratos (YE *et al.*, 2014; TRABELSI *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2015; DILNA *et al.*, 2015). As bandas contidas nessa região do espectro também foram encontradas por Dilna *et al.* (2015) e, segundo os autores, elas também podem indicar a presença de  $\alpha$ -piranose (CHI, SU, & LU, 2007; DILNA *et al.*, 2015).

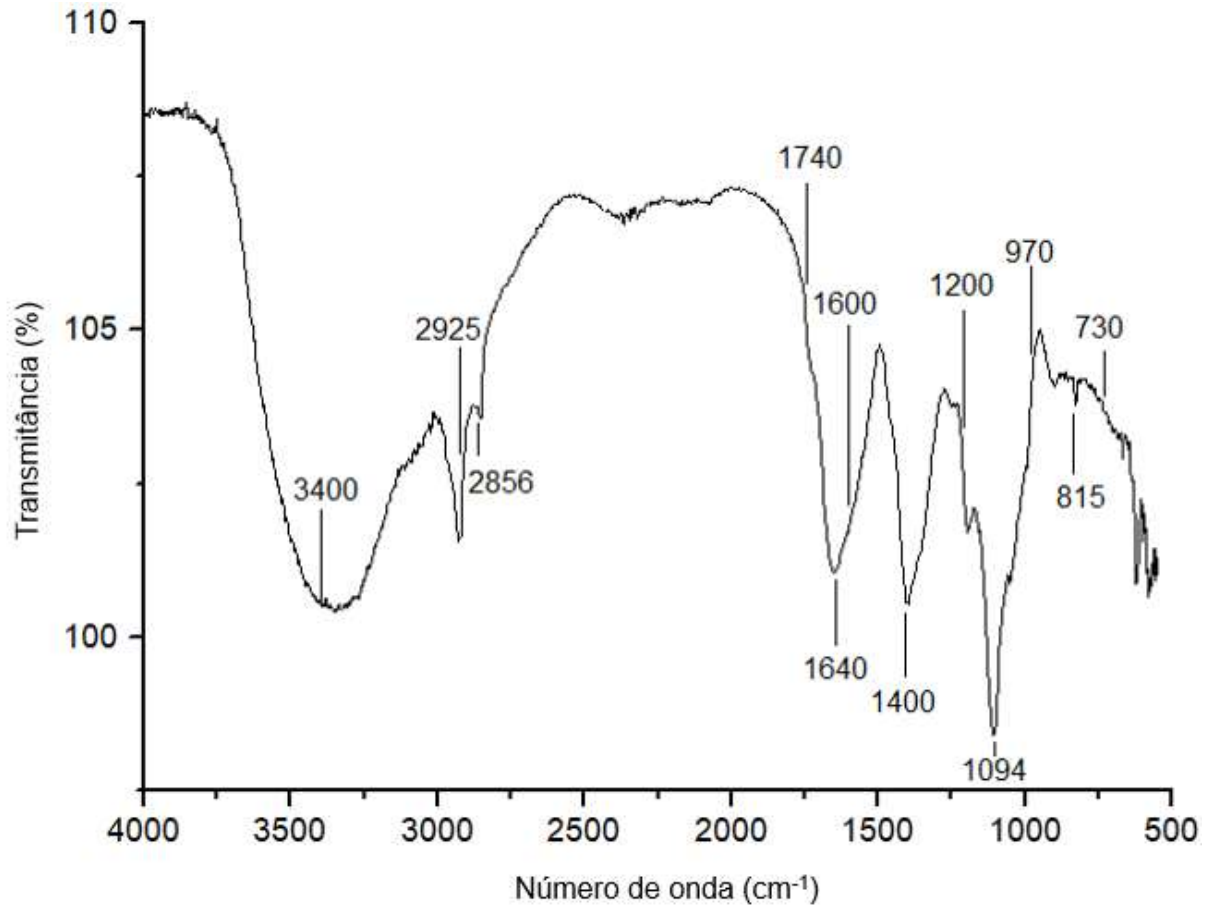


Figura 17. Espectro na região do infravermelho com transformada de *Fourier* (FT-IR) do exopolissacarídeo produzido por *L. casei* utilizando glicerol e glicose como fonte de carbono.



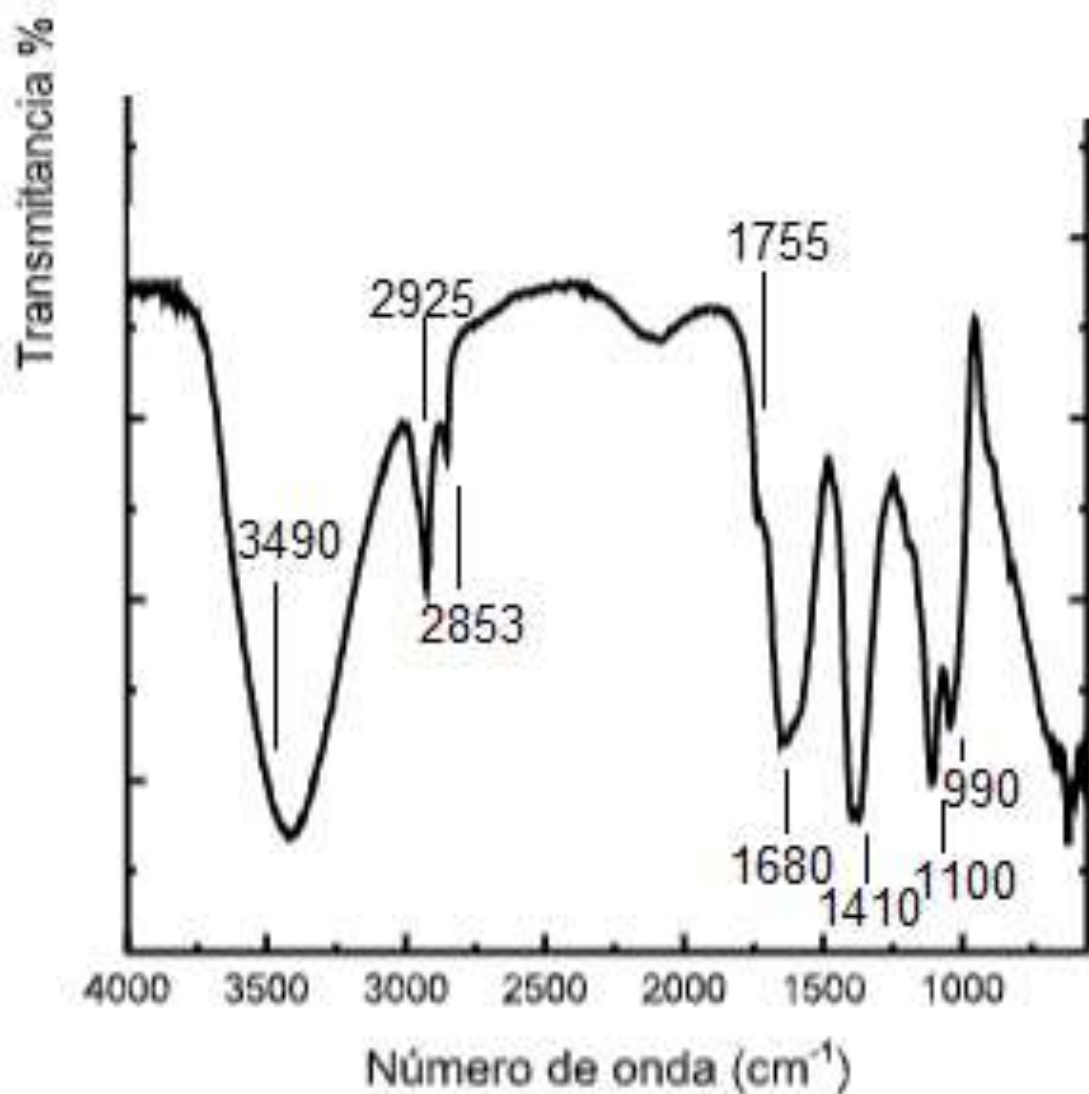


Figura 18. Espectro na região do infravermelho com transformada de *Fourier* (FT-IR) do exopolissacarídeo produzido por *L. casei* utilizando melão como fonte de carbono.

### 2.3.3.11 Análise do EPS por RMN

O espectro de <sup>1</sup>H RMN, Figura 19, do polissacarídeo pode ser dividido em 3 principais regiões. Neste espectro, a região anomérica não foi observada devido ao deslocamento químico da água estar suprimindo-a. Entretanto, os estiramentos referentes ao carbono anomérico foram encontrados no espectro de FT-IR. A segunda região, compreendida entre 4.5 - 5.5 ppm apresentou baixa intensidade e é atribuída aos prótons ligados a C2 e C6 da estrutura glicosídica. A terceira região é característica do grupo alquila (WANG *et al.*, 2014; DILNA *et al.*, 2015).

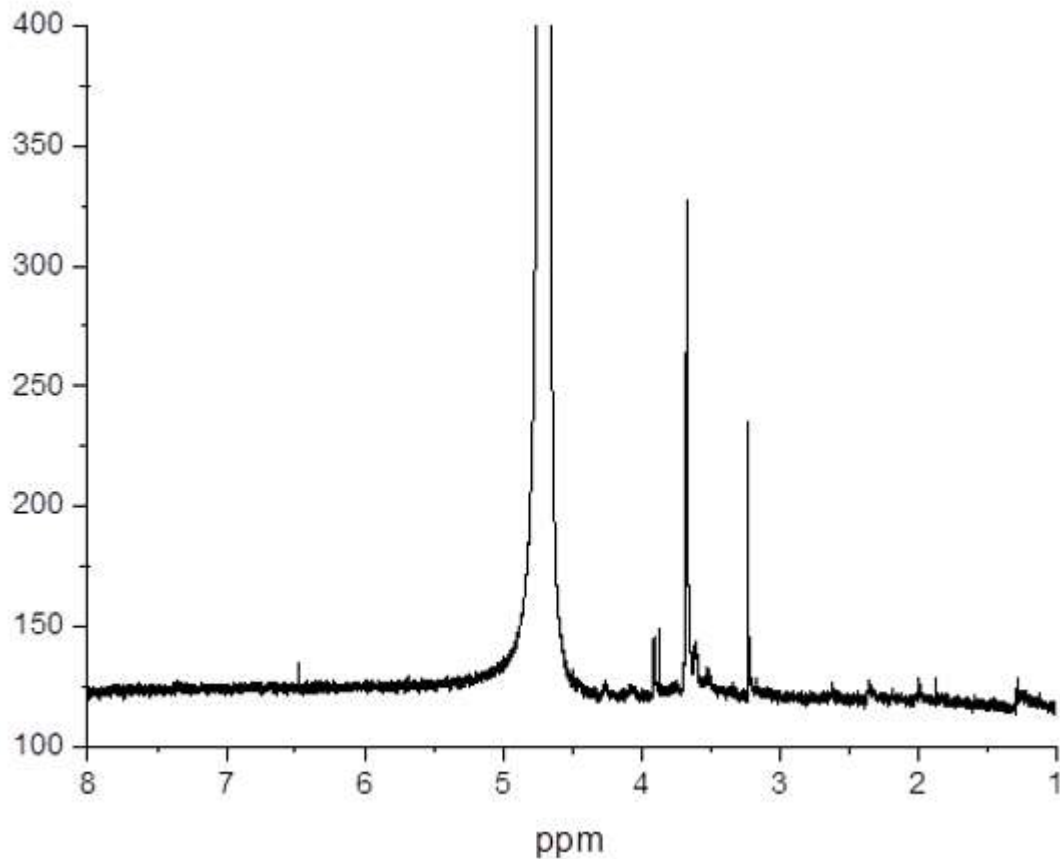


Figura 19. Espectro de RMN de prótons de EPS produzido por *L. casei* utilizando glicerol e glicose como fonte de carbono.

Para o EPS produzido a partir de melação como fonte de carbono, observa-se a partir do espectro de RMN de <sup>1</sup>H, Figura 20, que a amostra apresentou um sinal próximo ao sinal do solvente (D<sub>2</sub>O) em aproximadamente 5 ppm, que é sinal característico de hidrogênio anomérico. Apresenta sinais na região entre 3,0 – 4,0 ppm que é atribuída a prótons ligados a C2 e C6 e apresenta sinais entre 1,0 – 2,0 ppm que são sinais característicos de grupos alquílicos, dessa maneira, de acordo com Wang *et al.*, 2014, a amostra apresenta sinais característicos de um polissacarídeo.

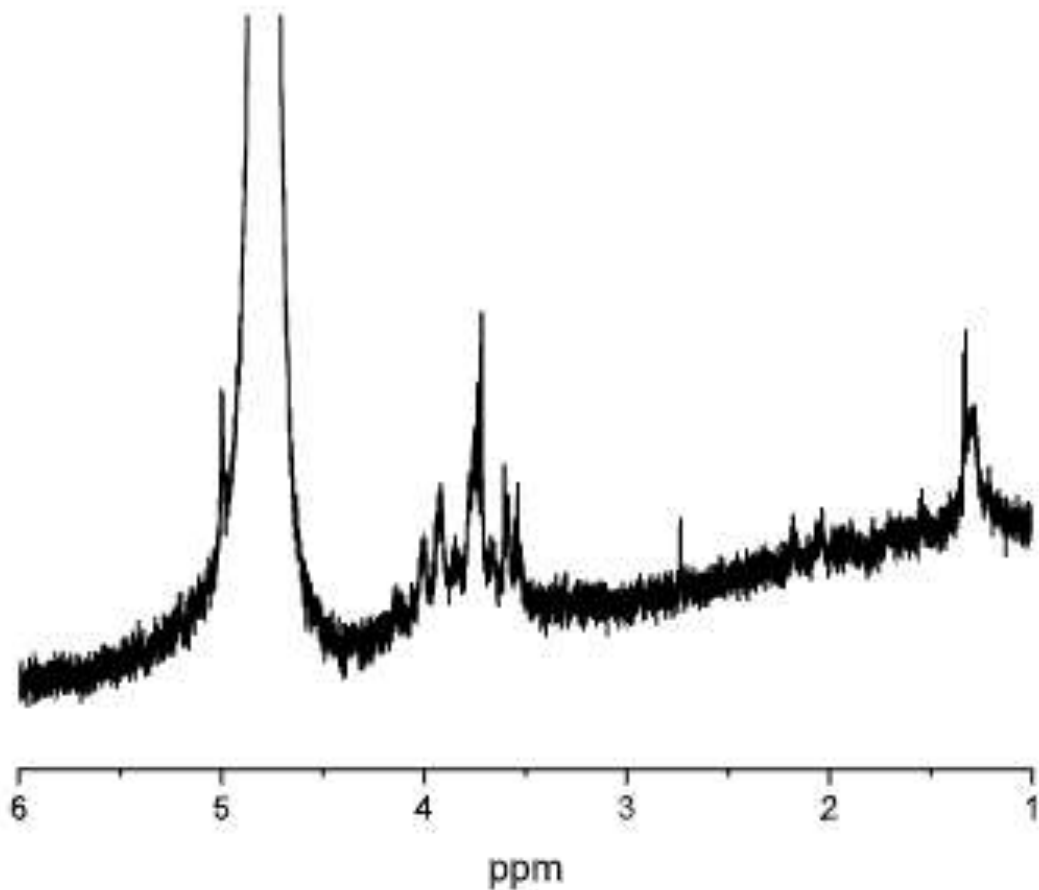


Figura 20. Espectro de RMN de prótons de EPS produzido por *L. casei* utilizando melão como fonte de carbono.

### 2.3 Conclusão

O procedimento mostrou-se eficiente, levando-se em consideração as variáveis e imprecisões experimentais. A partir dos resultados obtidos pode-se observar o comportamento geral dos microrganismos no meio de produção, analisando a produção de EPS, o pH e os açúcares presente nas amostras, bem como os que tiveram maior sucesso nas condições utilizadas. Dos 22 isolados testados, todos produziram EPS, porém, os isolados CH24 e ALE3 apresentaram o maior pico de produção de EPS, indicando uma possível correlação positiva entre os microrganismos, o meio e a fonte de carbono utilizados para produção.

O microrganismo *L. casei* foi capaz de produzir EPS utilizando glicerol e glicose como fonte de carbono, bem como melaço. O EPS obtido é caracterizado como heteropolissacarídeo composto por glicose e manose, referente ao uso de glicose e glicerol como fonte de carbono, e de glicose, galactose e arabinose, referente ao uso de melaço como fonte de carbono. O peso molecular do EPS a partir de glicose e glicerol foi de  $106 \text{ g.mol}^{-1}$ , enquanto que para o emprego de melaço como fonte de carbono o peso do EPS foi de  $81 \text{ g.mol}^{-1}$ . As análises de RMN e FT-IR comprovaram a existência de características de polissacarídeo na estrutura do EPS produzido.

### 3 Considerações Finais

- 1) O microrganismo Ke8 apresentou capacidade de crescimento e produção de EPS utilizando uma mistura de glicose e glicerol como fonte de carbono.
- 2) O microrganismo Ke8 apresentou capacidade de crescimento e produção de EPS utilizando melão como fonte de carbono.
- 3) As análises de caracterização evidenciaram a presença do polímero.
- 4) A xilose também pode ser empregada para produção de EPS a partir de uma gama de microrganismos. Para isso, mais estudos precisam ser realizados.
- 5) A dificuldade em se ter uma quantidade mais concentrada de polímero pode estar relacionada a possíveis perdas na etapa de dialise e de derivatização da amostra.

#### 4 Referências

AHMED, Z.; WANG, Y.; ANJUM, N.; AHMAD, A.; KHAN, S. T. Characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir - Part II. **Food Hydrocolloids**, v. 30, n. 1, p. 343–350, 2013.

Doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.06.009>

AMJRES, H.; BÉJAR, V.; QUESADA, E.; CARRANZA, D.; ABRINI, J.; SINQUIN, C.; RATISKOL, J.; COLLIEC-JOUAULT, S.; LLAMAS, I. Characterization of haloglycan, an exopolysaccharide produced by *Halomonas stenophila* HK30. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 117–124, 2015.

DOI: [10.1016/j.ijbiomac.2014.07.052](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.07.052)

ASGHER, M.; RANI, A.; KHALID, N.; QAMAR, S. A.; BILAL, M. Bioconversion of sugarcane molasses waste to high-value exopolysaccharides by engineered *Bacillus licheniformis*. **Case Studies in Chemical and Environmental Engineering** v. 3, p. 100084, 2021.

Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cscee.2021.100084>

AVILA, P. M.; LORENZO E. R. P. P. L. D. B.; BRIGANTI, D. L.; WIERZBICKI, M.; THOMPSON, R. A.; FERREIRA, H.; CONTIERO, J. Anaerobic and micro-aerobic 1,3-propanediol production by engineered *Escherichia coli* with dha genes from *Klebsiella pneumoniae* GLC29 **African Journal of Biotechnology**, v. 16, n.35, p. 1800-1809, 2017.

Doi: [10.5897/AJB2017.15888](https://doi.org/10.5897/AJB2017.15888)

BADEL, S.; BERNARDI, T.; MICHAUD, P. New perspectives for *Lactobacilli* exopolysaccharides. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 1, p. 54–66, 2011.

Doi: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.08.011>

BIEBL, H. Fermentation of glycerol by *Clostridium pasteurianum* — batch and continuous culture studies. **J Ind Microbiol Biotech.** v. 27, p. 18-26, 2001.

BIRCH, J.; CALSTEREN, V., M.; PÉREZ, S.; SVENSSON, B. The exopolysaccharide properties and structures database: EPS-DB. Application to bacterial exopolysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 205, n. June 2018, p. 565–570, 2019.

Doi: [10.1016/j.carbpol.2018.10.063](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.10.063)

BOTELHO, P. S.; MACIEL, M. I. S.; BUENO, L. A.; MARQUES, M. F. F.; MARQUES, D. N.; SILVA, T. M. S. Characterisation of a new exopolysaccharide obtained from fermented kefir grains in soymilk. **Carbohydrate Polymers**, v. 107, n. 1, p. 1–6, 2014.

Doi: [10.1016/j.carbpol.2014.02.036](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.02.036)

BURA, R.; CHEUNG, M.; LIAO, B.; FINLAYSON, C.; LEE, B.C. Composition of extracellular polymeric substances in the activated sludge floc matrix, **Water Sci. Technol.** v.37, p. 325–333, 1998.

Doi: [https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(98\)00125-5](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(98)00125-5)

CARUSO, C.; RIZZO, C.; MANGANO, S.; POLI, A.; DONATO, P.; FINORE, I.; NICOLAUS, B.; MARCO, G.; MICHAUD, L.; GIUDICE, A.. Production and biotechnological potential of extracellular polymeric substances from sponge-associated Antarctic bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, n. 4, p. 1–18, 2018.

Doi: <https://doi.org/10.1128/AEM.01624-17>

CASTELLANE, T. C. L.; PERSONA, M. R.; CAMPANHARO, J. C.; LEMOS, E. G. M. Production of exopolysaccharide from rhizobia with potential biotechnological and bioremediation applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 74, p. 515–522, 2015.

Doi: [10.1016/j.ijbiomac.2015.01.007](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.01.007)

CASTELLANE, T. C. L.; LEMOS, M. V. F.; LEMOS, E. G. M. Evaluation of the biotechnological potential of *Rhizobium tropici* strains for exopolysaccharide production. **Carbohydrate Polymers**. v. 111, p. 191-197, 2017.

Doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.04.066>

CERNING, J. BOUILLANNE, C.; LANDON, M.; DESMAZEAUDM. Isolation and Characterization of Exopolysaccharides from Slime-Forming Mesophilic Lactic Acid Bacteria. **Journal of Dairy Science**. v. 75, p. 692-699, 1992.

Doi: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(92\)77805-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(92)77805-9)

COLIN, T, BORIES A, LAVIGNE C, MOULIN G. Effects of acetate and butyrate during glycerol fermentation by *Clostridium butyricum*. **Curr Microbiol**. v. 43, p. 238-243, 2001.

CZACZYK, K.; MYSZKA, K. Biosynthesis of extracellular polymeric substances (EPS) and its role in microbial biofilm formation. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 16, n. 6, p. 799–806, 2007.

D'ABZAC, P.; BORDAS, F. Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from anaerobic granular sludges: comparison of chemical and physical extraction protocols. **Appl Microbiol Biotechnol**. v. 85, p. 1589-1599, 2010.

Doi: DOI [10.1007/s00253-009-2288-x](https://doi.org/10.1007/s00253-009-2288-x)

DALIU, P.; SANTINI, A.; NOVELLINO, E. A decade of nutraceutical patents: where are we now in 2018?. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**. v. 28, p. 875-882, 2018.

Doi: <https://doi.org/10.1080/13543776.2018.1552260>

DALIU, P.; SANTINI, A.; NOVELLINO, E. From pharmaceuticals to nutraceuticals: bridging disease prevention and management. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 12, p. 1-7, 2019.

Doi: <https://doi.org/10.1080/17512433.2019.1552135>

DAMAGER, I., ENGELSEN, S. B., BLENNOW, A., MOLLER, B. L., AND MOTAWIA, M. S. First principles insight into the  $\alpha$ -glucan structures of starch: their synthesis, conformation, and hydration. **Chem. Rev.** v. 110, p. 2049–2080, 2010.

Doi: 10.1021/cr900227t

DEO, D.; DAVRAY, D.; KULKARNI, R. A diverse repertoire of exopolysaccharide biosynthesis gene clusters in *Lactobacillus* revealed by comparative analysis in 106 sequenced genomes. **Microorganisms**, v. 7, n. 10, 2019.

Doi: 10.3390/microorganisms7100444

DERTLI, E.; MERCAN, E.; ARICI, M.; YILMAZ, M. T.; SAGDIC, O. Characterisation of lactic acid bacteria from Turkish sourdough and determination of their exopolysaccharide (EPS) production characteristics. **Lwt**, v. 71, p. 116–124, 2016.

Doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.03.030>

DERTLI, E.; COLQUHOUN, I. J.; GUNNING, A. P.; BONGAERTS, R. J.; GALL, G. L.; BONEV, B. B.; MAYER, M. J.; NARBAD, A. Structure and biosynthesis of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus johnsonii* FI9785. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 44, p. 31938–31951, 2013.

Doi: 10.1074/jbc.M113.507418

DI, W.; ZHANG, L.; WANG, S.; YI, H.; HAN, X.; FAN, R.; ZHANG, Y. Physicochemical characterization and antitumour activity of exopolysaccharides produced by *Lactobacillus casei* SB27 from yak milk. **Carbohydrate Polymers**, v. 171, p. 307-315, 2017.

Doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.03.018>

DILNA, S. V.; SURYA, H.; ASWATHY, R. G.; VARSHA, K. K.; SAKTHIKUMAR, D. N.; PANDEY, A.; NAMPOOTHIRI, K. M. Characterization of an exopolysaccharide with potential health- benefit properties from a probiotic *Lactobacillus plantarum* RJF4. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, n. 2, p. 1179–1186, 2015.

Doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.040>

DONOT, F.; FONTANA, A.; BACCOU, J. C.; SCHORR-GALINDO, S. Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 2, p. 951–962, 2012.

Doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.08.083>

DUBOIS, M.; GILLES, K.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. A colorimetric method for the determination of sugars. **Nature**, v. 168, n. 4265, p. 167, 1951.



DURMAZ, B.; SANIN, F. D. Effect of carbon to nitrogen ratio on the composition of microbial extracellular polymers in activated sludge. **Water Sci Technol**. v. 44, p. 221-229, 2001.

Doi: <https://doi.org/10.2166/wst.2001.0626>

FARAG, M. M. S.; MOGHANNEM, S. A. M.; SHEHABELDINE, A. M.; AZAB, M. S. Antitumor effect of exopolysaccharide produced by *Bacillus mycooides*. **Microbial Pathogenesis**. v. 140, p. 103947, 2020

FARRAH, S. R.; UNZ, R. F. Isolation of exocellular polymer from Zoogloea strains MP6 and 106 and from activated sludge. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 32, n. 1, p. 33–37, 1976.

Doi: [10.1128/aem.32.1.33-37.1976](https://doi.org/10.1128/aem.32.1.33-37.1976)

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 623–633, 2010.

FONTANA, A.; FALASCONI, I.; MOLINARI, P.; TREU, L.; BASILE, A.; VEZZI, A.; CAMPANARO, S.; MORELLI, L. Genomic comparison of lactobacillus helveticus strains highlights probiotic potential. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. 06, p. 1–14, 2019.

Doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01380>

FREITAS, F.; ALVES, V. D.; REIS, M. A. M. Advances in bacterial exopolysaccharides: From production to biotechnological applications. **Trends in Biotechnology**, v. 29, n. 8, p. 388–398, 2011.

Doi: [10.1016/j.tibtech.2011.03.008](https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.03.008).

GALLE, S.; ARENDT, E. K. Exopolysaccharides from Sourdough Lactic Acid Bacteria. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 54, n. 7, p. 891–901, 2014.

Doi: <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.617474>

GANCEL, F.; NOVEL, G. Exopolysaccharide Production by *Streptococcus salivarius* ssp. Thermophilus Cultures. 2. Distinct Modes of Polymer Production and Degradation Among Clonal Variants. **Journal of Dairy Science**. v. 77, p. 689-695, 1994.

Doi: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(94\)77001-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(94)77001-6)

GUIBAUD, G.; TIXIER, N.; BOUJU, A.; BAUDU, M. Relation between extracellular polymers composition and its ability to complex Cd, Cu and Pb. **Chemosphere**. v. 52, p. 1701–1710, 2003.

Doi: [10.1016/S0045-6535\(03\)00355-2](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(03)00355-2)

GUPTA, A.; THAKUR, I. S. Study of optimization of wastewater contaminant removal along with extracellular polymeric substances (EPS) production by a thermotolerant

Bacillus sp. ISTVK1 isolated from heat shocked sewage sludge. **Bioresource Technology**, v. 213, p. 21–30, 2016.

Doi: doi: 10.1016/j.biortech.2016.02.040

HA, J.; GÉLABERT, A.; SPORMANN, A. M.; BROWN, G. E. Role of extracellular polymeric substances in metal ion complexation on *Shewanella oneidensis*: Batch uptake, thermodynamic modeling, ATR-FTIR, and EXAFS study. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 74, n. 1, p. 1–15, 2010.

Doi: 10.1016/j.gca.2009.06.031

HAMA, S.; MIZUNO, S.; KIHARA, M.; TANAKA, T.; OGINO, C.; NODA, H.; KONDO, A. Production of d-lactic acid from hardwood pulp by mechanical milling followed by simultaneous saccharification and fermentation using metabolically engineered *Lactobacillus plantarum*. **Bioresource Technology**, v. 187, p. 167–172, 2015.

Doi: 10.1016/j.biortech.2015.03.106

HU, X.; PANG, X.; WANG, P. G.; CHEN, M. Isolation and characterization of an antioxidant exopolysaccharide produced by *Bacillus* sp. S-1 from Sichuan Pickles. **Carbohydrate Polymers**, v. 204, n. 05, 2018, p. 9–16, 2019.

Doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.09.069>

HUANG, Z.; LIN, F.; ZHU, X.; ZHANG, C.; JIANG, M.; LU, Z. An exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* H31 in pickled cabbage inhibits pancreas  $\alpha$ -amylase and regulating metabolic markers in HepG2 cells by AMPK/PI3K/Akt pathway. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 143, p. 775–784, 2020.

Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.09.137

HUG, I.; FELDMAN, M. F. Analogies and homologies in lipopolysaccharide and glycoprotein biosynthesis in bacteria. **Glycobiology**, v. 21, n. 2, p. 138–151, 2011.

Doi: 10.1093/glycob/cwq148

IBRAHIM, I. M.; KONNOVA, S. A.; SIGIDA, E. N.; LYUBUN, E. V.; MURATOVA, A. Y.; FEDONENKO, Y. P.; ELBANNA, K. Bioremediation potential of a halophilic *Halobacillus* sp. strain, EG1HP4QL: exopolysaccharide production, crude oil degradation, and heavy metal tolerance. **Extremophiles**, v.24, p.157–166, 2020.

Doi: <https://doi.org/10.1007/s00792-019-01143-2>

ITO, T.; NAKASHIMADA, Y.; SENBA, K.; MATSUI, T.; NISHIO, N. Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. **J Biosci Bioeng**, v. 100, p. 260-265, 2005.

KNOTHE G, VAN GERPEN J, KRAHL J. The biodiesel handbook. **Champaign, Illinois, USA: AOCS Press; 2005**

KODALI, V. P.; SEN, R. Antioxidant and free radical scavenging activities of an exopolysaccharide from a probiotic bacterium. **Biotechnology Journal**, v. 3, p. 245-251, 2008.

Doi: <https://doi.org/10.1002/biot.200700208>

KRISHNAMURTHY, M.; UTHAYA, C. J.; THANGAVEL, M.; ANNADURAI, V.; RAJENDRAN, R.; GURUSAMY, A. Optimization, compositional analysis, and characterization of exopolysaccharides produced by multi-metal resistant *Bacillus cereus* KMS3-1. **Carbohydrate Polymers**, v. 227, n. 09, 2019, 2020.

Doi: 10.1016/j.carbpol.2019.115369

KURANE, R.; HATAKEYAMA, S.; TSUGENO, H. Correlation between flocculant production and morphological changes in *Rhodococcus erythropolis* S-1. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 72, n. 6, p. 498–500, 1991.

Doi: [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(91\)90065-O](https://doi.org/10.1016/0922-338X(91)90065-O)

LEE, J. W.; YEOMANS, W. G.; ALLEN, A. L.; DENG, F.; GROSS, R. A.; KAPLAN, D. Biosynthesis of Novel Exopolymers by *Aureobasidium pullulans*. **Applied and environmental microbiology**, v. 65, p. 5265–5271, 1999.

LEE, I. C.; CAGGIANIELLO, G.; SWAM, I. I.; TAVERNE, N.; MEIJERINK, M.; BRON, P. A.; SPANO, G.; KLEEREBEZEM, M. Strain-specific features of extracellular polysaccharides and their impact on *Lactobacillus plantarum*-host interactions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 13, p. 3959–3970, 2016.

Doi: 10.1128/AEM.00306-16

LIU, H.; FANG, H. H.P. Characterization of Electrostatic Binding Sites of Extracellular Polymers by Linear Programming Analysis of Titration Data. **Biotechnol Bioeng**, v.7, p. 806-811, 2002.

DOI: 10.1002/bit.10432

LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** v. 193, p. 265-275, 1951.

LYNCH, K. M.; COFFEY, A.; ARENDT, E. K. Exopolysaccharide producing lactic acid bacteria: Their techno-functional role and potential application in gluten-free bread products. **Food Research International**, v. 110, p. 52–61, 2018.

Doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.03.012>

MATHIVANAN K.; CHANDIRIKA, J. U.; MATHIMANI, T.; VINOTHKANNA, A.; RAJARAM, R.; ANNADURAI, G. Optimization, compositional analysis, and characterization of exopolysaccharides produced by multi-metal resistant *Bacillus cereus* KMS3-1. **Carbohydrate Polymers**, v. 227, p. 115369, 2020.

Doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115369>

MAYHEW, S. G.; HOWELL, L. G. Chromatography of proteins on diethylaminoethyl-cellulose in concentrated ammonium sulfate. **Analytical Biochemistry**, v. 41, n. 2, p. 466–470, 1971.

Doi: 10.1016/0003-2697(71)90166-7

MIAO, L.; ZHANG, Q.; WANG, S.; LI, B.; WANG, Z.; ZHANG, S.; ZHANG, M.; PENG, Y. Characterization of EPS compositions and microbial community in an Anammox

SBBR system treating landfill leachate. **Bioresource Technology**, v. 249, n. September 2017, p. 108–116, 2018.

Doi: 10.1016/j.biortech.2017.09.151

MORE, T. T.; YADAV, J. S. S.; YAN, S.; TYAGI, R. D.; SURAMPALLI, R. Y. Extracellular polymeric substances of bacteria and their potential environmental applications. **Journal of Environmental Management**, v. 144, p. 1–25, 2014.

Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.05.010>

NÉMETH, A.; KUPCSULIK, B.; SEVELLA, B. 1,3-Propanediol oxidoreductase production with *Klebsiella pneumoniae* DSM2026. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 19, p.659–663, 2003.

NGUYEN, P.; NGUYEN, T.; TUYEN VO, T. N.; NGUYEN, T. T. X.; HOANG, Q. K.; NGUYEN, H. T. Response of *Lactobacillus plantarum* VAL6 to challenges of pH and sodium chloride stresses. **Scientific reports**. v. 11, p. 1301, 2021.

Doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80634-1>

NOUHA, K.; KUMAR, R. S.; BALASUBRAMANIAN, S.; TYAGI, R. D. Critical review of EPS production, synthesis and composition for sludge flocculation. **Journal of Environmental Sciences (China)**, v. 66, p. 225–245, 2018.

Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jes.2017.05.020>

NURAIIDA, L. A review: Health promoting lactic acid bacteria in traditional Indonesian fermented foods. **Food Science and Human Wellness**. v. 4, p. 47–55, 2015.

Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fshw.2015.06.001>

OLEKSY, M.; KLEWICKA, E. Exopolysaccharides produced by *Lactobacillus* sp.: Biosynthesis and applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 3, p. 450–462, 2018.

Doi: 10.1080/10408398.2016.1187112

OLEKSY-SOBCZAK, M.; KLEWICKA, E.; PIEKARSKA-RADZIK, L. Exopolysaccharides production by *Lactobacillus rhamnosus* strains – Optimization of synthesis and extraction conditions. **Lwt**, v. 122, n. September 2019, 2020.

Doi: 10.1016/j.lwt.2020.109055

PAIVA, I. M.; STEINBERG, R. S.; LULA, I. S.; SOUZA-FAGUNDES, E. M.; MENDES, T. O.; BELL, M. J. V.; NICOLI, J. R.; NUNES, A. C.; NEUMANN, E. *Lactobacillus kefirifaciens* and *Lactobacillus satsumensis* isolated from Brazilian kefir grains produce alpha-glucans that are potentially suitable for food applications. **LWT - Food Science and Technology**, v. 72, p. 390–398, 2016.

Doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.05.010>

PARK, C.; NOVAK, J. T. Characterization of Lectins and Bacterial Adhesins in Activated Sludge Floccs. **Water Environment Research**, v. 81, n. 8, p. 755–764, 2009.

Doi: 10.2175/106143008x370421

PAVIA, D. L., LAMPMAN, G. M., & KRIZ, G. S. Infrared Spectroscopy. In Introduction to Spectroscopy: a guide for student of organic chemistry. **South Melbourne: Thomson Learning**, v. 3, p. 579, 2001.

PAVONI J. L.; TENNEY M. W.; ECHELBERGER, W. Bacterial exocellular polymers and biological flocculation. **Journal of the Water Pollution Control Federation**, v. 44, n. 3 pt 1, p. 414–431, 1972.

PHAM, P.L.; DUPONT, I.; ROY, D.; LAPOINTE, G.; CERNING, J. Production of Exopolysaccharide by *Lactobacillus rhamnosus* R and Analysis of Its Enzymatic Degradation during Prolonged Fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 66, p. 2302-2310, 2000.  
Doi: 10.1128/aem.66.6.2302-2310.2000

PIAZZA, R. D.; NUNES, E. DA SILVA, VIALI, W. R.; DA SILVA, S. W.; ARAGÓN, F.H.; COAQUIRA, J. A.H.; DE MORAIS, P. C.; MARQUES, R.F.C.; JAFELICCI, M. Magnetic nanohydrogel obtained by miniemulsion polymerization of poly(acrylic acid) grafted onto derivatized dextran, **Carbohydrate Polymers**, v. 178, p. 378-385. 2017.  
Doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.09.019>

POLAK-BERECKA, M.; WASKO, A.; SZWAJGIER, D.; CHOMAZ, A. Bifidogenic and antioxidant activity of exopolysaccharides produced by *Lactobacillus rhamnosus* E/N cultivated on different carbon sources. **Polish Journal of Microbiology**, v. 62, n. 2, p. 181–188, 2013.

POLAK-BERECKA, M., WASCO, A., SKRZYPEK, H., AND KREFT, A. Production of exopolysaccharides by a probiotic strain of *Lactobacillus rhamnosus*: biosynthesis and purification methods. **Acta Alim**. v. 42, p. 220–228, 2013.  
Doi: 10.1556/AAlim.42.2013.2.9

QUISPE, C. A. G.; CORONADO, C. J. R.; CARVALHO, J. A. Glycerol: Production, consumption, prices, characterization and new trends in combustion. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 27, p. 475-493, 2013.  
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.06.017>

RAJOKA, M. S. R.; MEHWISH, H. M.; ZHANG, H.; ASHRAF, M.; FANG, H.; ZENG, X.; WU, Y, KHURSHID, M.; ZHAO, L.; HE, Z. Antibacterial and antioxidant activity of exopolysaccharide mediated silver nanoparticle synthesized by *Lactobacillus brevis* isolated from Chinese koumiss. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 186, p. 110734, 2020.  
Doi: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110734>

RAJOKA, M. S. R.; MEHWISH, H. M.; FANG, H.; PADHIAR, A. A.; ZENG, X.; KHURSHID, M.; HE, Z.; ZHAO, L. Characterization and anti-tumor activity of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefir* isolated from Chinese kefir grains. **Journal of Functional Foods**. v. 63, p. 103588, 2019.  
Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103588>

REHM, B. H. A. Bacterial polymers: Biosynthesis, modifications and applications. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 8, p. 578–592, 2010.

Doi: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2354>

REN, Q.; TANG, Y.; ZHANG, L.; XU, Y.; LIU, N.; REN, H. Exopolysaccharide produced by *Lactobacillus casei* promotes the differentiation of CD4 + T cells into Th17 cells in BALB/c mouse Peyer's Patches in vivo and in vitro. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2020.

Doi: [10.1021/acs.jafc.9b07987](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b07987)

RIAZ RAJOKA, M. S.; MEHWISH, H. M.; ZHANG, H.; ASHRAF, M.; FANG, H.; ZENG, X.; WU, Y.; KHURSHID, M.; ZHAO, L.; HE, Z. Antibacterial and antioxidant activity of exopolysaccharide mediated silver nanoparticle synthesized by *Lactobacillus brevis* isolated from Chinese koumiss. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 186, n. September 2019, p. 110734, 2020.

Doi: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110734>

RIVARO, P.; ARDINI, F.; GROTTI, M.; VIVADO, D.; SALIS, A.; DAMONTE, G. Detection of carbohydrates in sea ice extracellular polymeric substances via solid-phase extraction and HPLC-ESI-MS/MS. **Marine Chemistry**, v. 228, p. 103911, 2021.

Doi: <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2020.103911>

RUAS-MADIEDO, P.; HUGENHOLTZ, J.; ZOON, P. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 163–171, 2002.

Doi: [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00160-1](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00160-1)

RUSSO, P.; CAPOZZI, P. L. V.; PALENCIA, P. F.; DUENAS, M. T.; SPANO, G.; FIOCCO, D. Beta-glucans improve growth, viability and colonization of probiotic microorganisms. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 5, p. 6026–6039, 2012.

Doi: [10.3390/ijms13056026](https://doi.org/10.3390/ijms13056026)

SAMPAIO, M. G. V.; SILVA, W. E.; SILVA, M. V.; SANTOS, B. S.; LIMA, L. G. L.; CALAZANS, G. M. T. Production and characterization of a thermostable EPS produced by a new strain of *Lactobacillus fermentum* in medium containing sugarcane molasses. **Journal of Engineering Research and Application**, v. 10, p. 43-52. 2020

SÁNCHEZ, J. I., MARTÍNEZ, B., GUILLÉN, R., JIMÉNEZ-DÍAZ, R., AND RODRÍGUEZ, A. Culture conditions determine the balance between two different exopolysaccharides produced by *Lactobacillus pentosus* LPS26. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 72, p. 7495–7502, 2006

Doi: [10.1128/AEM.01078-06](https://doi.org/10.1128/AEM.01078-06)

SCHMID, J.; SIEBER, V.; REHM, B. Bacterial exopolysaccharides: Biosynthesis pathways and engineering strategies. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. MAY, p. 1–24, 2015.

Doi: 10.3389/fmicb.2015.00496

SEIFERT, C.; BOWIEN, S.; GOTTSCHALK, G.; DANIEL, R. Identification and expression of the genes and purification and characterization of the genes products involved in reactivation of coenzyme B12-dependent glycerol dehydratase of *Citrobacter freundii*. **Eur J Biochem**. v. 268, p.2369–2378, 2001.

Doi: 10.1046/j.1432-1327.2001.02123.x

SHAKURNIA, A.; SHEIKHI, A.; MIRZAPOUR, M.; BAHARIFAR, V.; BAHARIFAR, N.; AGHAMOHAMMADI, N.; SHEIKHI, M.; MATINRAD, M.; NOURADDIN, S.; SHEIKHI, S.; SHEIKHI, R. Sugarcane molasses enhances TGF- $\beta$  secretion and *FOXP3* gene expression by *Bifidobacterium Animalis Subsp. Lactis* stimulated PBMCs of Ulcerative Colitis patients. **Complementary Therapies in Medicine**. v. 47, p. 102210, 2019.

SHENG, G. P.; YU, H. Q.; LI, X. Y. Extracellular polymeric substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: A review. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 6, p. 882–894, 2010.

Doi: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.08.001>

SHENG, Y. *Microorganisms*. v. 13, n. 4, p. 289–292, 2006.

SILVA, G. P.; LIMA, C. J. B.; CONTIERO, J. Production and productivity of 1,3-propanediol from glycerol by *Klebsiella pneumoniae* GLC29. **Catalysis Today**. v. 257, p. 259–266, 2015.

Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2014.05.016>

SILVA, G. P.; CONTIERO, J.; NETO, P. M. LIMA,; C. J. B. 1,3-propanediol: produção, aplicações e potencial biotecnológico **Quim. Nova**, Vol. 37, No. 3, p. 527–534, 2014.

Doi: <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20140083>

SHU, C. H.; LUNG, M. Y. Effect of pH on the production and molecular weight distribution of exopolysaccharide by *Antrodia camphorata* in batch cultures. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 8, p. 931–937, 2004.

Doi: 10.1016/S0032-9592(03)00220-6

SUTHERLAND, I. W. Biofilm exopolysaccharides: A strong and sticky framework. **Microbiology**, v. 147, n. 1, p. 3–9, 2001b.

Doi:10.1099/00221287-147-1-3

SUTHERLAND, I. W. Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 9, p. 663–674, 2001a.

Doi: [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00112-1](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00112-1)

TALARICO, T.L.; AXELSSON, L.T.; NOVOTNY, J.; FIUZAT, M.; DOBROGOSZ, W.J. Utilization of glycerol as a hydrogen acceptor by *Lactobacillus reuteri*: purification of 1,3-propanediol:NAD<sup>+</sup> oxidoreductase. **Appl Env Microbiol.** v. 56, p. 943–948, 1990.

THANH HUU, N., RAZAFINDRALAMBO H., BLECKER C. Stochastic exposure to sub-lethal high temperature enhances exopolysaccharides (EPS) excretion and improves *Bifidobacterium bifidum* cell survival to freeze-drying. **Biochem Eng J.** v. 88, p. 85–94, 2014.

Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2014.04.005>

TORINO, M.I.; VALDEZ, G. F.; MOZZI, F. Biopolymers from lactic acid bacteria. Novel applications in foods and beverages. **Frontiers in Microbiology.** v. 6, p. 1-16. 2015.

Doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00834>

TRABELSI, I.; SLIMA, S. B.; CHAABANE, H.; RIADH, B. S. Purification and characterization of a novel exopolysaccharides produced by *Lactobacillus* sp. Ca<sub>6</sub>. **International Journal of Biological Macromolecul.** v. 74, p. 541-546, 2015.

Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.12.045>

VALDEZ, A. L.; BABOT, J. D.; SCHMID, J. Produção de escleroglucano por *Sclerotium rolfsii* ATCC 201126 a partir de meios baseados em melão amiláceo e cana-de-açúcar: idéias promissoras para um aumento sustentável e ecológico. **J Polym Environ.** v.27, p.2804–2818, 2019

VANINGELGEM, F., ZAMFIR, M., MOZZI, F., ADRIANY, T., VANCANNEYT, M., SWINGS, J. Biodiversity of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* strains is reflected in their production and their molecular and functional characteristics. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 70, p. 900–912, 2004.

Doi: 10.1128 / AEM.70.2.900-912.2004

VASTANO, V.; PERRONE, F.; MARASCO, R.; SACCO, M.; MUSCARIELLO, L. Transcriptional analysis of exopolysaccharides biosynthesis gene clusters in *Lactobacillus plantarum*. **Archives of Microbiology,** v. 198, n. 3, p. 295– 300, 2016.

Doi: 10.1007/s00203-015-1169-1

VU, B.; CHEN, M.; CRAWFORD, R. J.; IVANOVA, E. O. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. **Molecules,** v. 14, n. 7, p. 2535–2554, 2009.

Doi: 10.3390/molecules14072535

WANG, J.; ZHAO, X.; TIAN, Z.; YANG, Y.; YANG, Z.. Characterization of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW11 isolated from Tibet Kefir. **Carbohydrate Polymers,** v. 125, p. 16–25, 2015.

Doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.03.003>



WANG, K., LI, W., RUI, X., CHEN, X., JIANG, M., & DONG, M. Structural characterization and bioactivity of released exopolysaccharides from *Lactobacillus plantarum* 70810. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.67, p. 71-78, 2014.

Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2014.02.056

WANG, Z.; ZHUGE, J.; FANG, H.; PRIOR, B. A. Glycerol production by microbial fermentation: A review. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 201-223, 2001.

Doi: [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(01\)00060-X](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(01)00060-X)

YE, F.; YE, Y.; LI, Y. Effect of C/N ratio on extracellular polymeric substances (EPS) and physicochemical properties of activated sludge flocs. **Journal of Hazardous Materials**, v. 188, n. 1–3, p. 37–43, 2011.

Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.01.043>

ZAROOUR, K., LLAMAS, G.; PRIETO, A.; RÚAS-MADIEDO, P. DUENAS, M. T.; PALENCIA, P. F.; AZNAR, R.; KIHAL, M.; LÓPEZ, P. Rheology and bioactivity of high molecular weight dextrans synthesised by lactic acid bacteria. **Carbohydrate Polymers**, v. 174, p. 646–657, 2017.

Doi: 10.1016/j.carbpol.2017.06.113

ZEHİR ŞENTÜRK, D.; DERTLI, E.; ERTEN, H.; SIMSEK, O. Structural and technological characterization of ropy exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Tarhana. **Food Science and Biotechnology**, v. 29, n. 1, p. 121–129, 2020.

Doi: 10.1007/s10068-019-00641-5

ZEIDAN, A. A.; POULSEN, V. K.; JANZEN, T.; BULDO, P.; DERKX, P. M. F.; OREGAARD, G.; NEVES, A. R.. Polysaccharide production by lactic acid bacteria: from genes to industrial applications. **FEMS microbiology reviews**, v. 41, n. 1, p. S168–S200, 2017.

Doi: <https://doi.org/10.1093/femsre/fux017>

ZENG, W.; WU, C.; YU, R.; WU, X.; SHEN, L.; LIU, Y.; QIU, G.; LI, J. Role of extracellular polymeric substance (EPS) in toxicity response of soil bacteria *Bacillus sp.* S3 to multiple heavy metals. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 43, n. 1, p. 153–167, 2020.

ZHANG, L.; LIU, C.; LI, D.; ZHAO, Y.; ZHANG, X.; ZENG, X.; YANG, Z.; LI, S. Antioxidant activity of an exopolysaccharide isolated from *Lactobacillus plantarum* C88. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 54, n. 1, p. 270–275, 2013.

Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.12.037>

ZHANG, Q.; ACHAL, V.; XIANG, W.; Identification of Heavy Metal Resistant Bacteria Isolated from Yangtze. p. 619–623, 2014.

ZHANG, X.; FAN, W.; YAO, M.; YANG, C.; SHENG, G. Redox state of microbial extracellular polymeric substances regulates reduction of selenite to elemental selenium accompanying with enhancing microbial detoxification in aquatic environments. **Water Research**, v. 172, p. 115538, 2020.  
Doi: 10.1016/j.watres.2020.115538

ZHANG, X.; BISHOP, P. L. Biodegradability of biofilm extracellular polymeric substances. **Chemosphere**, v. 50, n. 1, p. 63–69, 2003.  
Doi: [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(02\)00319-3](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00319-3)

ZHOU, Y.; CUI, Y.; QU, X. Exopolysaccharides of lactic acid bacteria: Structure, bioactivity and associations: A review. **Carbohydrate Polymers**. v. 207, p. 317-332, 2019.  
Doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.11.093>

ZHOU, Y.; CUI, Y.; SOU, C.; WANG, Q.; QU, X. Structure, physicochemical characterization, and antioxidant activity of the highly arabinose-branched exopolysaccharide EPS-M2 from *Streptococcus thermophilus* CS6. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 192, p. 716-727, 2021.  
Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.10.047>

ZHU, Y.; WANG, X.; PAN, W.; SHEN, X.; HE, Y.; YIN, H.; ZHOU, K.; ZOU, L.; CHEN, S.; LIU, S. Exopolysaccharides produced by yogurt-texture improving *Lactobacillus plantarum* RS20D and the immunoregulatory activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 121, p. 342–349, 2019.  
Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.201>

ZIVKOVIC, M.; MILJKOVIC, M.; RUAS-MADIEDO, P.; STRAHINIC, I.; TOLINACKI, M.; GOLIC, N.; KOJIC, M. Exopolysaccharide production and rropy phenotype are determined by two gene clusters in putative probiotic strain *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 4, p. 1387–1396, 2015.  
Doi: 10.1128/AEM.03028-14

