

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO – SP

ALINE ZAGO DE GRANDI

Produção de exopolissacarídeos por *Lactobacillus helveticus* autóctone isolado
de soro-fermento natural

São José do Rio Preto - SP

Abril/2010

ALINE ZAGO DE GRANDI

Produção de exopolissacarídeos por *Lactobacillus helveticus* autóctone isolado
de soro-fermento natural

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, área de Ciência e Tecnologia de Alimentos junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto – SP.

Orientador:

Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia-Cruz

São José do Rio Preto - SP

Abril/2010

Grandi, Aline Zago de.

Produção de exopolissacarídeos por *Lactobacillus helveticus*
autóctones isolados de soro-fermento natural / Aline Zago de Grandi. – São
José do Rio Preto: [s.n.], 2010.

56 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Crispin Humberto Garcia-Cruz

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Biopolímeros - Produção. 2. Polissacarídeos. 3. *Lactobacillus*
helveticus. I. Garcia-Cruz, Crispin Humberto. II. Universidade Estadual
Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 577.124.5

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
Campus de São José do Rio Preto - UNESP

ALINE ZAGO DE GRANDI

Produção de exopolissacarídeos por *Lactobacillus helveticus* autóctone isolado
de soro-fermento natural

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, área de Ciência e Tecnologia de Alimentos junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto – SP.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia-Cruz
Professor Doutor
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Profa. Dra. Sandra Garcia
Professora Doutora
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Daise Aparecida Rossi
Professora Doutora
Universidade Federal de Uberlândia – UFU

São José do Rio Preto, 30 de abril de 2010.

Este trabalho foi realizado no laboratório de Biopolímeros do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, São José do Rio Preto - SP.

A cultura de Lactobacillus helveticus autóctone foi cedida pela Profa. Dra. Daise Aparecida Rossi da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (FAMEV – UFU).

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima.”

Louis Pasteur

Ao meu pai, Aldo, com muito amor.

Saudades.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Este trabalho é fruto da dedicação e colaboração de algumas pessoas muito especiais e por isso, deixo aqui registrado o quanto sou grata por toda a ajuda recebida. Dentre essas pessoas, faço um agradecimento especial ao Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia-Cruz pela oportunidade e orientação, além da enorme atenção e principalmente por acreditar que tudo isso seria possível.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - IBILCE e ao Programa de Engenharia e Ciência de Alimentos pela oportunidade do mestrado.

Ao Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos e a todos os professores que contribuíram para a minha formação profissional.

Ao Conselho de Aperfeiçoamento Pessoal de Ensino Superior – CAPES pelo apoio financeiro concedido na forma de bolsa.

À Profa Dra Daise Aparecida Rossi por ceder a cultura de Lactobacillus helveticus, fundamental para a pesquisa realizada. Agradeço também a ela por sua especial atenção e amizade.

À minha mãe, Rosali, por toda a compreensão, incentivo e principalmente por entender a minha necessidade em aprender.

Aos meus queridos irmãos, André e Anamary, por todo o carinho, amor e companheirismo.

Aos técnicos, Tânia e Newton, pelo auxílio no laboratório, sempre prestativos para fazer com que tudo funcionasse perfeitamente.

Aos meus amigos e colegas de mestrado, Adriana, Aline, Ana Carolina, Carolina, Leandro, Marcos, Raquel, Sabrina, Thiago e Victor, que juntos participaram de uma etapa de grande aprendizagem.

Às minhas amigas Ana Maria, Catharina, Gisele, Luana, Michele, Rafaella, Tayná, Vanessa e Vidianny. “Friends” que estiveram presentes nos momentos de altos e baixos, e que me ajudaram a ver como a amizade é um grande presente de Deus. Agradeço também a uma amiga especial, Juliana Guerra, que participou de todas as fases por mim vivenciadas em Rio Preto. A vida se tornou muito mais divertida com você aqui.

A Deus, que ilumina e guia meus passos, fazendo com que eu sempre encontre pessoas maravilhosas no meu caminho.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xv
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xvii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS	3
2.1.1 <i>Lactobacillus helveticus</i>	3
2.2 POLISSACARÍDEOS MICROBIANOS	5
2.3 PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS POR BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS (BAL)	8
2.4 CONDIÇÕES DE CULTIVO	9
2.5 APLICAÇÕES DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS E EXOPOLISSACARÍDEOS	12
3 OBJETIVOS	15
3.1 GERAL	15
3.2 ESPECÍFICOS	15
4 MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1 MICRORGANISMO	16
4.2 MEIOS DE CULTURA	16
4.2.1 Meio de Manutenção	16
4.2.2 Meio de Produção ou Fermentação	16
4.3 CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO	16
4.3.1 Preparo do Pré-inóculo	16
4.3.2 Pré-fermentação	17
4.3.3 Fermentação	17
4.3.4 Interrupção dos cultivos	19
4.4 MÉTODOS ANALÍTICOS	19
4.4.1 Determinação do número de células viáveis	19
4.4.2 Determinação do pH	19
4.4.3 Isolamento dos exopolissacarídeos (EPS)	20

4.4.4 Determinação de açúcares totais	21
4.4.5 Determinação de açúcares redutores	21
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
5.1 ADIÇÃO DAS FONTES DE CARBONO	22
5.1.1 pH e viabilidade celular de <i>Lactobacillus helveticus</i>	25
5.1.2 Açúcares totais e açúcares redutores	27
5.2 ADIÇÃO DAS FONTES DE NITROGÊNIO	31
5.2.1 Sulfato de Amônio - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	31
5.2.1.1 pH e viabilidade celular de <i>Lactobacillus helveticus</i>	32
5.2.1.2 Açúcares totais e açúcares redutores	34
5.2.2 Peptona de carne	35
5.2.2.1 pH e viabilidade celular de <i>Lactobacillus helveticus</i>	37
5.2.2.2 Açúcares totais e açúcares redutores	38
5.2.3 Extrato de levedura	40
5.2.3.1 pH e viabilidade celular de <i>Lactobacillus helveticus</i>	41
5.2.3.2 Açúcares totais e açúcares redutores	43
6 CONCLUSÕES	44
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	45
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
APÊNDICES	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Frascos Erlenmeyer contendo meio de fermentação e incubados em agitador orbital rotatório a 37°C e 100 rpm.	17
Figura 2	Sobrenadantes após centrifugação do meio fermentado (a); (b) após a adição de álcool anidro (4°C); (c) e após precipitação (4°C).	20
Figura 3	Isolamento do EPS com álcool anidro (4°C).	20
Figura 4	Colônias de <i>Lactobacillus helveticus</i> em superfície de meio <i>De Man Rogosa Sharpe</i> - MRS incubado em condições de anaerobiose a 37°C por 48 horas.	22
Figura 5	Produção de EPS (g/50mL de meio de produção) por <i>Lactobacillus helveticus</i> em LDR 10% acrescido de diferentes concentrações de glicose e frutose (1, 2, 3, 4 e 5%), após 24, 48, 72 e 96 horas de fermentação a 37°C e 100 rpm. I = desvio padrão das três repetições de cada experimento.	24
Figura 6	Comportamento do pH <i>versus</i> a enumeração de células viáveis de <i>Lactobacillus helveticus</i> em LDR 10% acrescido de diferentes concentrações de glicose e frutose (1, 2, 3, 4 e 5%), após 24, 48, 72 e 96 horas de fermentação a 37°C e 100 rpm.	26
Figura 7	Concentração de açúcares totais e redutores resultantes em LDR 10% acrescido de diferentes concentrações de glicose e frutose (1, 2, 3, 4 e 5%), respectivamente, por 24, 48, 72 e 96 horas de fermentação a 37°C e 100 rpm, por <i>Lactobacillus helveticus</i> . Os gráficos referentes à glicose se encontram melhor detalhados no Apêndice (Figura 20).	28
Figura 8	Aspecto dos EPS produzidos por <i>L. helveticus</i> e obtidos após adição de álcool anidro (4°C), utilizando como meio de fermentação LDR 10% acrescido de 2% de glicose (a) e 2% de frutose (b), após 48 horas de fermentação a 37°C e 100 rpm.	30
Figura 9	Produção EPS (g/50mL de meio de produção) por <i>Lactobacillus helveticus</i> em LDR 10% acrescido de diferentes concentrações de sulfato de amônio (1, 2, 3, 4 e 5%), em meio de produção contendo	32

2% de glicose e 2% de frutose, respectivamente, após 24, 48, 72 e 96 horas de fermentação a 37°C e 100 rpm. I = desvio padrão das três repetições de cada experimento. Fotos dos biopolímeros produzidos se encontram no Apêndice (Figura 21).

- Figura 10 Comportamento do pH *versus* a enumeração de células viáveis de *Lactobacillus helveticus* em LDR 10% acrescido de diferentes concentrações de sulfato de amônio (1, 2, 3, 4 e 5%) em meio contendo 2% de glicose e 2% frutose, respectivamente, na produção de EPS por *Lactobacillus helveticus*, após 24, 48, 72 e 96 horas de fermentação a 37°C e 100 rpm. 33
- Figura 11 Concentração de açúcares totais e redutores resultantes em LDR 10% acrescido de diferentes concentrações de sulfato de amônio (1, 2, 3, 4 e 5%) em meio de produção contendo 2% de glicose e 2% de frutose, respectivamente, após 24, 48, 72 e 96 horas de fermentação a 37°C e 100 rpm, por *Lactobacillus helveticus*. O gráfico referente à determinação de açúcares redutores no meio de fermentação com glicose adicionada de (NH₄)₂SO₄ se encontra melhor detalhado no Apêndice (Figura 22). 35
- Figura 12 Produção EPS (g/50mL de meio de produção) por *Lactobacillus helveticus* em LDR 10% acrescido de diferentes concentrações de peptona de carne (1, 2, 3, 4 e 5%), em meio de produção contendo 2% de glicose e 2% de frutose, respectivamente, após 24, 48, 72 e 96 horas de fermentação a 37°C e 100 rpm. I = desvio padrão das três repetições de cada experimento. Fotos dos biopolímeros produzidos se encontram no Apêndice (Figura 23). 36
- Figura 13 Comportamento do pH *versus* a enumeração de células viáveis de *Lactobacillus helveticus* em LDR 10% acrescido de diferentes concentrações de peptona de carne (1, 2, 3, 4 e 5%) em meio contendo 2% de glicose e 2% frutose, respectivamente, na produção de EPS por *Lactobacillus helveticus*, após 24, 48, 72 e 96 horas de fermentação a 37°C e 100 rpm. 38
- Figura 14 Concentração de açúcares totais e redutores resultantes em LDR 10% acrescido de diferentes concentrações de peptona de carne (1, 39

2, 3, 4 e 5%) em meio de produção contendo 2% de glicose e 2% de frutose, respectivamente, após 24, 48, 72 e 96 horas de fermentação a 37°C e 100 rpm, por *Lactobacillus helveticus*. O gráfico referente à determinação de açúcares redutores no meio de fermentação com glicose adicionada de peptona de carne se encontra melhor detalhado no Apêndice (Figura 24).

- Figura 15 Produção EPS (g/50mL de meio de produção) por *Lactobacillus* 41
helveticus em LDR 10% acrescido de diferentes concentrações de extrato de levedura (1, 2, 3, 4 e 5%), em meio de fermentação contendo 2% de glicose e 2% de frutose, respectivamente, após 24, 48, 72 e 96 horas de fermentação a 37°C e 100 rpm. I = desvio padrão das três repetições de cada experimento. Fotos dos biopolímeros produzidos se encontram no Apêndice (Figura 25 e 26).
- Figura 16 Comportamento do pH *versus* a enumeração de células viáveis de 42
Lactobacillus helveticus em LDR 10% acrescido de diferentes concentrações de diferentes concentrações de extrato de levedura (1, 2, 3, 4 e 5%) em meio contendo 2% de glicose e 2% frutose, respectivamente, na produção de EPS por *Lactobacillus helveticus*, após 24, 48, 72 e 96 horas de fermentação a 37°C e 100 rpm.
- Figura 17 Concentração de açúcares totais e redutores resultantes em LDR 43
10% acrescido de diferentes concentrações de extrato de levedura (1, 2, 3, 4 e 5%) em meio de produção contendo 2% de glicose e 2% de frutose, respectivamente, após 24, 48, 72 e 96 horas de fermentação a 37°C e 100 rpm, por *Lactobacillus helveticus*.
- Figura 18 Curva de calibração para determinação de açúcares totais pelo 53
método descrito por Dubois e colaboradores (1956).
- Figura 19 Curva de calibração para determinação de açúcares redutores pelo 53
método de Somogyi (1952) e Nelson (1944).
- Figura 20 Concentração de açúcares totais e redutores resultantes em LDR 10 54
% acrescidos de diferentes concentrações de glicose (1, 2, 3, 4 e 5%), por 24, 48, 72 e 96 horas de fermentação a 37°C e 100 rpm, por *Lactobacillus helveticus*.

- Figura 21 Exopolissacarídeos produzidos por *Lactobacillus helveticus* em LDR 10% acrescido de 2% de glicose e 2% de sulfato de amônio, após 48 horas de incubação a 37°C e 100 rpm. 54
- Figura 22 Concentração de açúcares redutores resultantes em LDR 10% acrescido de diferentes concentrações de sulfato de amônio (1, 2, 3, 4 e 5%) em meio de produção contendo 2% de glicose, após 24, 48, 72 e 96 horas de fermentação a 37°C e 100 rpm, por *Lactobacillus helveticus*. 55
- Figura 23 Exopolissacarídeos produzidos por *Lactobacillus helveticus* em LDR 10% acrescido de 2% de glicose e 4% de peptona de carne, após 24 horas de incubação a 37°C e 100 rpm, e após a secagem e posterior rehidratação. 55
- Figura 24 Concentração de açúcares redutores resultantes em LDR 10% acrescido de diferentes concentrações de peptona de carne (1, 2, 3, 4 e 5%) em meio de produção contendo 2% de glicose, após 24, 48, 72 e 96 horas de fermentação a 37°C e 100 rpm, por *Lactobacillus helveticus*. 56
- Figura 25 Exopolissacarídeos produzidos por *Lactobacillus helveticus* em LDR 10% acrescido de 2% de frutose e extrato de levedura, a 37°C e 100 rpm, e após precipitação com álcool anidro (4°C). 56
- Figura 26 Exopolissacarídeos produzidos por *Lactobacillus helveticus* em LDR 10% acrescido de 2% de glicose e extrato de levedura, a 37°C e 100 rpm, e após a secagem e posterior rehidratação. 56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Fontes de carbono e nitrogênio com suas respectivas concentrações utilizadas para produção de EPS por <i>Lactobacillus helveticus</i> em leite desnatado reconstituído 10% (LDR 10%) incubados em agitador orbital rotatório a 37°C e 100 rpm	18
Tabela 2	Valores de pH, EPS e contagem de células obtidos na fermentação de LDR 10% adicionado de glicose 2% e frutose 2% (p/v), respectivamente, por <i>Lactobacillus helveticus</i> , após 24, 48, 72 e 96 horas de fermentação a 37°C e 100 rpm	30

GRANDI, A. Z. **Produção de exopolissacarídeos por *Lactobacillus helveticus* autóctone isolado de soro-fermento natural**. São José do Rio Preto, 2010. 56p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Campus de São José do Rio Preto, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

RESUMO

Os polímeros microbianos possuem propriedades físico-químicas com maior uniformidade do que os obtidos de outras fontes devido à especificidade do microrganismo utilizado e à possibilidade de um rígido controle dos parâmetros de fermentação. Estão entre as bactérias produtoras de polissacarídeos as bactérias ácido-láticas, as quais são capazes de converter açúcares, ácidos orgânicos, proteínas ou gorduras em componentes de sabor e aroma, contribuindo ainda para melhorar a textura e a viscosidade de produtos fermentados por meio da produção de exopolissacarídeos (EPS). Nestes produtos, possuem a função de realçar, atribuir e manter as características desejáveis de corpo, textura, viscosidade e aparência, melhorando dessa forma os atributos sensoriais do produto final. O objetivo deste trabalho foi estudar o comportamento de *Lactobacillus helveticus* autóctone em meio de cultivo com substâncias estimulantes ao crescimento e produção de exopolissacarídeos. A cultura foi previamente isolada de soro-fermento natural. Utilizou-se leite desnatado reconstituído (LDR 10%) como meio de produção, acrescido de fontes de carbono (glicose e frutose) e nitrogênio (sulfato de amônio, peptona de carne e extrato de levedura), ambas nas concentrações de 1, 2, 3, 4 e 5% (p/v). Inoculou-se os meios de fermentação com 1% (v/v) das culturas reativadas em meio *De Man Rogosa Sharpe* - MRS, e a produção de EPS foi avaliada depois de 24, 48, 72 e 96 horas de incubação, a 37°C e 100 rpm. Das duas fontes de carbono testadas, a frutose foi a mais favorável à produção de exopolissacarídeos, proporcionando maiores quantidades (1,23 g/50mL de meio de produção). Para sulfato de amônio 5%, as produções chegaram a 3,63 com glicose e a 4,25g/50mL de meio de produção com frutose. Peptona de carne e extrato de levedura favoreceram a produção do biopolímero em concentrações menores, sendo a concentração 2% de ambas a que apresentou melhores resultados.

Palavras chaves: Bactérias ácido-láticas, EPS, *Lactobacillus helveticus*.

Exopolysaccharide production by *Lactobacillus helveticus* autochthono from natural whey

ABSTRACT

Microbial polymers have physical and chemical properties with larger uniformity than those obtained from other sources because of specificity microorganism used and possibility of a strict parameters of control fermentation. Among the polysaccharide-producing bacteria are the lactic acid bacteria, which are able to converting sugars, organic acids, proteins or fats in flavor and aroma components, thus contributing to improve the texture and viscosity of fermented products through the production of exopolysaccharides (EPS). These products have a enhance function, assign and maintain desirable characteristics of body, texture, viscosity and appearance, thus improving the sensory attributes of the final product. The aim was to study the behavior *Lactobacillus helveticus* autochthono, using a medium with substances stimulating the growth and exopolysaccharide production. Such autochthono culture was previously isolated from natural whey. Was used reconstituted skim milk (LDR 10%) as production medium, plus carbon sources (glucose and fructose) and nitrogen (ammonium sulfate, meat peptone and yeast extract), both varying in concentrations 1, 2, 3, 4 and 5% (w/v). Was inoculated the fermentation medium with 1% (v/v) culture reactivated in medium *Man Rogosa Sharpe* - MRS, and EPS production was evaluated after 24, 48, 72 and 96 hours of incubation at 37°C and 100 rpm. Carbon sources tested fructose was the most favorable, providing greater amounts of EPS (1.23 g/50mL of medium production). For ammonium sulfate 5%, the yield reached 3.63 with glucose, and 4.25 g/50mL of medium production with fructose. Meat peptone and yeast extract favored the biopolymer production in lower concentrations, the concentration 2% of both showed better results.

Key words: Lactic acid bacteria, EPS, *Lactobacillus helveticus*.

1 INTRODUÇÃO

Os polissacarídeos produzidos por microrganismos são gomas hidrossolúveis que apresentam características vantajosas na sua utilização pela indústria alimentícia e farmacêutica, entre outras. Sua aplicabilidade oferece vantagens sobre as de outras fontes, como de origem vegetal ou animal, pois a produção ocorre independentemente das condições climáticas e disponibilidade de matéria-prima. Os parâmetros de produção são controlados e estabelecidos de acordo com as melhores condições para o microrganismo.

Polissacarídeos de origem microbiana são conhecidos como biopolímeros e são classificados de acordo com a sua localização morfológica, em intracelulares, integrantes da parede celular e extracelulares. Quando são excretados para o meio extracelular são conhecidos como exopolissacarídeos ou EPS, que podem estar aderidos à célula na forma de cápsula, associados com a sobrevivência celular, ou sintetizados e excretados na forma de um polissacarídeo livre de aspecto limoso, com pouca ou nenhuma aderência celular.

No ambiente natural, os EPS oferecem proteção à célula microbiana contra agentes de dessecação, fagocitose, antibióticos, compostos tóxicos variados, estresse osmótico, adesão às superfícies sólidas e formação de biofilmes, além de contribuírem para o reconhecimento celular. Sua síntese depende de um maquinário enzimático próprio de cada espécie.

De acordo com a composição química os EPS são divididos em dois grupos, os homopolissacarídeos, que contém somente um tipo de monossacarídeo, e os heteropolissacarídeos, compostos de unidades repetidas de diferentes tipos de monossacarídeos, variando o tamanho da cadeia e podendo apresentar outras moléculas distintas de carboidratos. As propriedades reológicas dos EPS são influenciadas não só pela quantidade do biopolímero produzido, mas também por sua estrutura e massa molecular.

Os biopolímeros possuem maior uniformidade em suas propriedades físico-químicas devido à especificidade do microrganismo utilizado e à possibilidade de um rígido controle dos parâmetros de fermentação, como a temperatura, pH, taxa de aeração, velocidade de agitação, tempo de fermentação e composição do meio de cultura, incluindo as fontes de carbono e nitrogênio, assim como a disponibilidade de minerais, vitaminas e outros nutrientes.

Entre as bactérias produtoras de polissacarídeos encontram-se as bactérias ácido-láticas que são capazes de converter açúcares, ácidos orgânicos e outros substratos em componentes de sabor e aroma característico, contribuindo ainda para melhorar a textura e a viscosidade de produtos fermentados por meio da produção de EPS. Estes possuem propriedades importantes para alguns produtos alimentícios e têm sido utilizados na melhoria das características sensoriais e do valor nutritivo de uma grande variedade de produtos lácteos, sendo comum o uso de bactérias produtoras de EPS na fabricação de leites fermentados. Nestes produtos os EPS possuem a função de realçar, atribuir e manter as características desejáveis de corpo, textura, viscosidade e aparência, melhorando dessa forma os atributos sensoriais do produto final. Além disso, as bactérias ácido-láticas são largamente utilizadas na produção de alimentos por suas propriedades probióticas, podendo ser obtidos uma grande variedade de produtos lácteos com características distintas utilizando-se diferentes tecnologias de fabricação e culturas *starters*.

Dentre o gênero *Lactobacillus*, o *L. helveticus* é uma bactéria ácido-lática termófila de grande interesse para os laticínios. É caracterizada por ser uma bactéria láctica *starter*, pois é capaz de metabolizar a lactose reduzindo o pH do meio pela produção de ácidos orgânicos, sendo o ácido láctico produzido em grandes quantidades. Produz ainda heteropolissacarídeos compostos por unidades repetidas que apresentam em sua estrutura uma combinação de D-glicose e D-galactose.

Dessa forma, é promissor selecionar microrganismos que produzam exopolissacarídeos em quantidade e cujas propriedades e características sejam industrialmente favoráveis. O estudo das condições de cultivo sobre a produção de EPS de tais microrganismos se torna interessante no sentido de aperfeiçoar o rendimento, considerando as condições de cultivo, fontes de carbono e nitrogênio fatores de suma importância.

Polímeros produzidos por microrganismos reconhecidos como de categoria alimentar segura possuem potencial como aditivos alimentares ou como ingredientes alimentares funcionais, onde sua utilização resultará em um produto seguro, natural e de impacto na possibilidade de desenvolvimento de novos produtos alimentares.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS (BAL)

Uma grande variedade de produtos lácteos com diferentes características pode ser obtida utilizando diferentes tecnologias de fabricação e culturas *starters* ou iniciadoras. Dentre elas, estão as bactérias ácido-láticas (BAL) capazes de converter açúcares, ácido orgânicos, proteínas ou gorduras em componentes de sabor e aroma característicos, e de melhorar a textura e a viscosidade de produtos fermentados por meio da produção de exopolissacarídeos (DE VUYST; DEGEEST, 1999; RUAS-MADIEDO; HUGENHOLTZ; ZOON, 2002). São ainda amplamente utilizadas na produção de alimentos por suas propriedades probióticas.

As BAL representam um grupo de bactérias de grande importância em produtos como o leite e seus derivados. Em sua maioria, fazem parte da microbiota que fermenta a lactose e produz ácido lático como produto final do seu metabolismo, em proporções significativas. São Gram-positivas, na forma de cocos, bacilos ou bacilos cocóides, não esporuladas, pertencendo a este grupo as famílias *Lactobacillaceae* e *Streptococcaceae*.

Exopolissacarídeos (EPS) produzidos por BAL apresentam aptidões tecnológicas consideráveis que se destacam em alguns setores da indústria de alimentos. O uso de culturas *starters*, produtoras de EPS, como *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* é uma prática comum na produção de iogurte para melhorar a textura, evitando a sinérese e aumentando a viscosidade do produto. Tanto as bactérias lácticas mesófilas (*Lactobacillus casei*, *L. rhamnosus*, *L. paracasei*, *L. sakei*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, etc.) quanto as termófilas (*Streptococcus thermophilus*, *S. macedonicus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. helveticus*, etc.) são capazes de sintetizar EPS (TORINO; MOZZI; VALDEZ, 2005).

2.1.1 *Lactobacillus helveticus*

De acordo com o *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (GARRITY et al., 2005) o gênero *Lactobacillus* inclui 106 espécies descritas, pertence ao filo *Firmicutes*, classe *Bacilli*, ordem *Lactobacillales* e família *Lactobacillaceae*. O gênero *Lactobacillus* é

composto por bacilos Gram-positivos, regulares e não esporulados. Morfologicamente podem variar de bacilos longos e finos a bacilos curvados e pequenos. A forma de bacilos cocóides também é freqüente, sendo comum a formação de cadeias. São anaeróbios facultativos, às vezes microaerófilos, com crescimento geralmente em torno de 5% de CO₂. Nos meios de cultivo, as colônias geralmente apresentam-se com tamanho entre 2 - 5mm, convexas, opacas e sem pigmentos. Seu crescimento ótimo está entre 30 a 40°C. São acidúricos, com pH ótimo entre 5,5 e 6,2, embora o crescimento ocorra a 5,0 ou menos. A taxa de crescimento é freqüentemente reduzida em meios neutros ou alcalinos. São encontrados em derivados do leite, grãos, produtos de carne e peixe, água, cerveja, vinho, frutas e suco de frutas, conservas de vegetais, silagem, chucrute e massas fermentadas. Fazem parte da microbiota normal da boca e do trato intestinal de alguns animais homotérmicos, incluindo o homem, sendo sua patogenicidade considerada rara (SNEATH et al., 1986).

Os lactobacilos são organismos considerados fastidiosos e são adaptados a complexos substratos orgânicos. A carne é um nutriente essencial na formulação de meios de cultura para o gênero quando o meio contém carboidratos fermentáveis, peptona, extrato de levedura e extrato de carne. A suplementação dos meios com suco de tomate, manganês, acetato e ésteres de ácido oléico, especialmente Tween 80, é estimulante ou até essencial para determinadas espécies. Todos estes nutrientes estão presentes na composição do meio elaborado por Man, Rogosa e Sharpe (1960), o MRS, meio extensamente utilizado para crescimento e isolamento de lactobacilos.

Pertencente ao gênero *Lactobacillus*, o *L. helveticus* é uma bactéria ácido-lática termófila de grande interesse para os laticínios, destacando-se pela produção de ácido láctico e atividade lipolítica e proteolítica (ARNAUD; GIRAUD, 1985). É utilizado para a elaboração de queijos semi-duros, tais como o Grana e Provolone (FORTINA et al., 1998), e para a fabricação de queijo Mussarela esse microrganismo é usado em combinação com *Streptococcus thermophilus* (PERRY; MCMAHON; OBERG, 1997).

Lactobacillus helveticus apresentam bom crescimento entre 40 a 45°C, entretanto, podem crescer até 50 – 52°C, não se desenvolvendo em temperaturas inferiores a 15°C. Geralmente resistem a temperaturas de 60°C por 90 minutos (FURTADO, 1990). Requerem cálcio, piridoxal ou piridoxamina como fatores essenciais para o crescimento, sendo que ácido fólico, vitamina B₁₂ e tiamina não são necessários. São homofermentativos e fortes produtores de ácido láctico, fermentando a lactose via glicolítica

ou Embden-Meyerhof-Parnas, em concentrações de aproximadamente 2,7% (FURTADO, 1990a), catalisada pela enzima lactato desidrogenase (ARNAUD; GIRAUD, 1985).

Quanto à fermentação de carboidratos, os *L. helveticus* não fermentam amigdalina, arabinose, celobiose, esculina, gluconato, manitol, melezitose, melibiose, rafinose, ribose, sacarose, salicina, sorbitol e xilose. Fermentam a galactose, glicose e lactose, sendo que algumas são capazes de fermentar também frutose, maltose, manose e trealose e apresentam uma fermentação variável do N-acetil-glicosamina (TORRIANI; VESCOVO; SCOLARI, 1994).

L. helveticus podem ser obtidos de leite fermentado, soro-fermento, fermentos lácticos e queijos como Parmesão e Provolone. Culturas endógenas formam o soro-fermento natural, as quais se formam sob o controle de fatores tecnológicos em um determinado ambiente, sem sofrer influência de microrganismos de outra procedência, como aqueles inseridos pelo homem durante a fabricação (CANDIOTI et al., 2002; HEBERT et al. 2000), conferindo dessa forma alta qualidade e originalidade em determinados produtos.

2.2 POLISSACARÍDEOS MICROBIANOS

Os polissacarídeos, também conhecidos como hidrocolóides ou gomas, pertencem a uma classe de polímeros constituídos de monômeros de açúcar de cadeias longas e elevado peso molecular que se dissolvem em água atuando como agentes espessantes, gelificantes, estabilizantes e encapsuladores (DE VUYST; DEGEEST, 1999). Por apresentarem tais características são amplamente utilizados em formulações de produtos alimentícios e farmacêuticos.

Muitos dos polímeros atualmente utilizados na indústria de alimentos são polissacarídeos de origem vegetal, provenientes de algas, sementes ou exsudados de plantas. Existem também polímeros produzidos por modificações químicas de polissacarídeos naturais ou originados da biossíntese microbiana, que apresentam propriedades físicas, químicas e estruturais únicas.

Na indústria de alimentos, a aplicação dos polissacarídeos de origem microbiana oferece vantagens sobre os polímeros de outras fontes. Tais vantagens estão relacionadas principalmente à produção sob condições controladas, que possibilita a utilização de diferentes substratos e maior rapidez na obtenção do produto, sem necessitar

de grande espaço para a produção, tornando-se assim uma classe alternativa para utilização na indústria.

A capacidade de produzir polissacarídeos é verificada em diferentes microrganismos, como fungos e bactérias. Sua classificação é feita de acordo com a sua localização morfológica em três grupos: intracelulares, localizados no citoplasma da célula e usados como fonte de carbono; integrantes da parede celular, como os peptidoglicanos e ácidos teiônicos; e extracelulares, associados ou não à célula microbiana (CERNING, 1990; 1995).

Quando presentes no meio extracelular são denominados exopolissacarídeos (EPS) e podem estar aderidos à célula na forma de cápsula, associados com a sobrevivência celular e conhecidos como EPS capsulares, ou podem ser sintetizados pelo microrganismo e excretados para a superfície da célula na forma de uma substância limosa (do inglês, *slime*), com pouca ou nenhuma aderência celular (SUTHERLAND, 1972; CERNING, 1990). O estado físico do EPS tem particular importância se considerado o potencial de utilização desses produtos microbianos. Dentre algumas razões, pode-se citar a relativa facilidade de separação física do polímero extracelular, excretado na forma de substância limosa, e a necessidade de forças extensas e possivelmente processos de purificação para o material capsular. Polissacarídeos *slime* podem ser isolados das células por centrifugação, sedimentando-se assim os microrganismos provenientes do meio de cultura fermentado.

O EPS sintetizado pelo microrganismo oferece uma proteção natural à célula, favorecendo seu desenvolvimento. Protegem o microrganismo contra dessecação; fagocitoses; antibióticos, na qual a célula recoberta por uma matriz polimérica pode ser inacessível; contra compostos tóxicos, como dióxido sulfúrico e etanol; e contra estresse osmótico, além de favorecer a adesão às superfícies sólidas e formação de biofilmes (DE VUYST; DEGEEST, 1999; RUAS-MADIEDO; HUGENHOLTZ; ZOON, 2002). Podem estar associados também ao reconhecimento celular entre os microrganismos.

Os EPS propiciam algumas importantes características de reologia, textura e corpo de determinados produtos alimentícios. Estas propriedades físicas são influenciadas não só pela quantidade de biopolímero, mas também por sua estrutura, considerando o tamanho e a frequência das ramificações e a massa molecular (DUBOC; MOLLET, 2001; RUAS-MADIEDO; HUGENHOLTZ; ZOON, 2002), além das interações entre as cadeias de polissacarídeos (DE VUYST; DEGEEST, 1999).

Sua síntese depende de enzimas específicas, próprias de determinadas espécies de microrganismos. Portanto, podem diferir na composição monomérica e ligações entre as unidades da cadeia, na conformação estereoquímica e na presença de cadeias laterais e grupos funcionais (DE VUYST; DEGEEST, 1999). Tais moléculas são geralmente produzidas em níveis de $0,01 - 1,0 \text{ g.L}^{-1}$ e possuem massas moleculares superiores a 10^6 Da (DUBOC; MOLLET, 2001).

De acordo com a composição química são divididos em dois grupos: homopolissacarídeos, que contém somente um tipo de monossacarídeo na cadeia; e heteropolissacarídeos, compostos de unidades repetidas de diferentes tipos de monossacarídeos, como glicose, galactose, ramnose, manose, N-acetilglicosamina, N-acetilgalactosamina e ácido glucurônico, variando também no tamanho da cadeia, no grau de ramificação, além da possibilidade de apresentar outras moléculas, distintas de carboidratos, como fosfato inorgânico (KUMAR; MODY; JHA, 2007; DUBOC; MOLLET, 2001; DE VUYST; DEGEEST, 1999).

Para certos homopolissacarídeos, incluindo dextrana, mutana, alternana e levana, o processo de síntese ocorre extracelularmente e requer a sacarose como substrato específico. Uma glicosiltransferase altamente específica está envolvida na reação de polimerização, por exemplo, a enzima dextrana-sacarase responsável pela biossíntese de dextrana, onde a polimerização é realizada com energia proveniente da hidrólise da sacarose (DE VUYST, DEGEEST, 1999). A dextrana possui peso molecular que varia de 15 a 20.000 kDa e este biopolímero pode ser produzido usando tanto culturas de células bacterianas quanto preparações enzimáticas (CERNING, 1990).

Os homopolissacarídeos produzidos por bactérias lácticas podem ser agrupados em quatro grupos: α -D-glucanas, β -D-glucanas, frutanas e outras como poligalactana (RUAS-MADIEDO; HUGENHOLTZ; ZOON, 2002), que diferem pelo grau de ramificação e ligações entre as unidades monoméricas da cadeia (DE VUYST; DEGEEST, 1999).

A síntese de heteropolissacarídeos difere da síntese de homopolissacarídeos por envolver várias etapas biossintéticas e estar relacionada ao metabolismo de carbono da célula produtora. Para tal síntese são necessárias unidades monossacarídicas precursoras, que são formadas no citoplasma e posteriormente translocadas para o meio extracelular onde são polimerizadas (CERNING, 1990; 1995). As enzimas e/ou proteínas envolvidas na síntese e excreção desses EPS não são exclusivas do processo de produção dos mesmos

(DE VUYST; DEGEEST, 1999). A massa molar de heteropolissacarídeos atinge valores entre $4,0 \times 10^4$ e $6,0 \times 10^6$ Da (DE VUYST; DEGEEST, 1999). Glicosil isoprenóide que transportam lipídeos também estão envolvidos no processo, mas o mesmo está envolvido na síntese de polímeros da parede celular (peptideoglicanos, ácidos teiólicos, lipopolissacarídeos), havendo competição por estes componentes durante as fases de crescimento (SUTHERLAND, 1972).

2.3 PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS POR BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS (BAL)

A capacidade de produzir EPS é altamente variável entre as BAL, característica que depende tanto do microrganismo quanto da composição do meio de fermentação e condições de crescimento. Como a presença de EPS pode conferir uma característica “ropy” ao produto fermentado (CERNING, 1990), que pode ser compreendida como uma viscosidade elevada, as bactérias ácido-láticas produtoras de EPS são comumente designadas como culturas “ropy”, enquanto as culturas capsulares são descritas como “mucóides”. Entretanto, Folkenberg e colaboradores (2006) contestam tal denominação pelo motivo que essa característica nem sempre está correlacionada com a concentração de EPS, o que faz com que o termo culturas “ropy” possa ser impreciso para cepas produtoras de EPS.

A quantidade de EPS sintetizados intracelularmente e produzidos por diferentes cepas de BAL varia aproximadamente de 0,045 até 0,350 g.L⁻¹, quando a bactéria se desenvolveu sob condições de cultivo não otimizadas. Sendo que condições otimizadas de produção de EPS resultaram em quantidades de 0,15 até 0,60 g.L⁻¹, dependendo da cepa (CERNING, 1990; 1995).

Quando uma cepa “ropy” de *S. thermophilus* cresce em associação com uma cepa não “ropy” de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* em leite, a produção de EPS pode alcançar quantidades de aproximadamente 0,80 g.L⁻¹ (CERNING, 1988; 1990). Cepas mesófilas de *L. lactis* subsp. *cremoris* isoladas de Viili, leite fermentado finlandês, demonstraram capacidade de produção de EPS com elevada viscosidade, a partir de cultivo em leite desnatado a 25°C por 18 - 20 horas. As amostras foram tratadas com ácido tricloroacético seguida da precipitação em etanol, posteriormente separado e purificado, verificando-se valores de produção de EPS de 0,164 a 0,263 g.L⁻¹ entre as cinco cepas

avaliadas no estudo (YANG et al., 1999). Tais polissacarídeos eram constituídos de ramnose, glicose e galactose.

Alguns pesquisadores verificaram a síntese de EPS por *Lactobacillus helveticus*, observando se tratar de heteropolissacarídeos que apresentam em sua estrutura uma combinação de D-glicose e D-galactose (LIN; CHANG CHIEN, 2007; TORINO; MOZZI; FONT DE VALDEZ, 2005; YANG et al., 2000; STAAF et al., 1996, 2000; STINGELE, LEMOINE, NEESER, 1997; ROBIJN et al., 1995; YAMAMOTO et al., 1994, 1995).

Estudos prévios demonstraram que a produção de EPS por bactérias ácido-láticas é dependente da composição do meio de cultura, e a produção de EPS varia consideravelmente entre diferentes cepas (GAMAR; BLONDEAU; SIMONET, 1997; DE VUYST et al., 1998). Quando o meio de fermentação utilizado leite desnatado ou leite ultrafiltrado, cepas “ropy” de *L. lactis* subsp. *cremoris* T5 e MLS96 produziram 0,1 - 0,6 g.L⁻¹ de EPS (CERNING et al., 1992). Entretanto, somente 0,025 g.L⁻¹ de EPS foi produzido por *L. lactis* subsp. *cremoris* LC330 quando se utilizou meio quimicamente definido (MARSHALL; COWIE; MORETON, 1995).

Produtos lácteos fermentados por cepas produtoras de EPS tem sido relacionados com uma elevada viscosidade e um menor grau de sinérese, quando comparados com produtos produzidos por cepas não produtoras de EPS (CERNING, 1990; MARSHALL; RAWSON, 1999). Folkenberg e colaboradores (2006) analisaram produtos fabricados com cepas produtoras e não produtoras de EPS de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, e afirmam que a escolha das culturas bacterianas para a fermentação é um fator de controle das propriedades de textura. Sendo que ao fim da fermentação por uma cepa produtora de EPS pode-se obter, por exemplo, um iogurte com alta viscosidade, elevada cremosidade e baixa firmeza do gel. Esses atributos citados fazem parte de um painel sensorial utilizado para descrever propriedades de textura em iogurtes (FOLKENBERG et al., 2006).

2.4 CONDIÇÕES DE CULTIVO

Os biopolímeros possuem maior uniformidade em suas propriedades físico-químicas devido à especificidade do microrganismo utilizado e ao controle dos parâmetros de fermentação. Em tais parâmetros estão inclusos, temperatura, pH, taxa de aeração,

velocidade de agitação, tempo de fermentação e composição do meio de cultura, incluindo fonte de carbono e nitrogênio, assim como a disponibilidade de minerais, vitaminas e outros nutrientes. Essas condições influenciam tanto o rendimento quanto a composição do polímero produzido (DE VUYST et al., 1998; GASSEM; SCHMIDT; FRANK, 1995; KIMMEL; ROBERTS; ZIEGLER, 1998; LOOIJESTEIJN; HUGENHOLTZ; SMITH, 1998; PETRY et al., 2000).

Da mesma forma, na síntese e secreção de EPS de bactérias ácido-láticas que ocorrem durante diferentes fases do crescimento, a quantidade e o tipo de polímero produzido são influenciados pelas condições empregadas. Sua produção é quase sempre favorecida por temperaturas mais baixas de incubação (CERNING, 1995; MOZZI et al., 1995) e pode ser favorecida também pelo pH próximo da neutralidade (6,0 a 7,0) ou por uma alta taxa de carbono/nitrogênio (SUTHERLAND, 1972). O aumento das concentrações de carbono e nitrogênio favoreceu maiores produções de EPS em estudo com *S. thermophilus* LY03, sob ótimas condições físicas de cultivo (DE VUYST et al., 1998).

A composição do meio de crescimento influencia, particularmente, a produção de EPS associada diretamente com o crescimento (biomassa) das culturas lácticas, embora essa variação também possa depender do método de isolamento do polissacarídeo (RUAS-MADIEDO; HUGENHOLTZ; ZOON, 2002). Um meio de cultivo quimicamente definido contendo fontes de carboidrato, sais minerais, aminoácidos, vitaminas, bases de ácidos nucléicos é mais adequado para investigar a influência dos nutrientes sobre o crescimento nas vias metabólicas e na biossíntese de EPS em BAL (DE VUYST; DEGEEST, 1999).

Os meios de cultivo apresentam basicamente uma fonte de nitrogênio em concentrações adequadas para o crescimento do microrganismo, uma fonte de carbono como reserva energética e para produção do polissacarídeo e ainda, oligoelementos como Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} entre outros que apresentam papel importante como cofatores enzimáticos das vias de produção dos polímeros (MARTINS; BRITO; SÁ-CORREIA, 1990; ERNANDES, 2006).

A fonte de carbono pode influenciar a produção e o tamanho do EPS produzido, assim sendo, uma ampla variedade de fontes pode ser usada para a produção de biopolímeros, que incluem sacarose, glicose, lactose, maltose, manitol, sorbitol, soro e amido, entre outras (KUMAR; MODY; JHA, 2007). Geralmente, concentrações limitantes de outros nutrientes e excesso de carboidratos favorecem a produção de polissacarídeos

(SUTHERLAND, 1972; COLTRO; GARCIA-CRUZ, 2006). Embora diferenças sejam observadas na quantidade de EPS produzida de acordo com as fontes de carbono, sua composição monomérica parece ser independente das fontes utilizadas para apoiar o crescimento bacteriano (DEGEEST; DE VUYST, 2000; LOOIJESTEIJN et al., 1999; SUTHERLAND, 1972).

Segundo Torino e colaboradores (2001, 2005) *Lactobacillus helveticus* ATCC15807 é capaz de produzir EPS tanto em leite quanto em meio complexo contendo lactose. O leite tem sido o mais comum meio de cultura usado para a produção de EPS, entretanto, o isolamento de EPS de leites fermentados é fastidioso e pode ocorrer degradação do polímero durante a manipulação (CERNING et al., 1992).

Quando um meio complexo é empregado ao invés do leite, EPS são mais facilmente isolados, mas ele é altamente contaminado com componentes interferentes, por exemplo, extrato de carne e levedura, triptona e peptona, que podem levar a uma superestimação do polímero produzido e errôneas determinações da composição química do EPS (DE VUYST; DEGEEST 1999).

A produção de EPS sob condições de pH controladas constantemente durante o crescimento é significativamente mais elevada do que em culturas que tiveram somente o pH inicial ajustado. Além disso, o efeito do ajuste do pH pode ser maior do que a suplementação com nutrientes. De Vuyst; Degeest (1999) fazem uma ressalva para esses dados, caracterizando o pH como um fator limitante na exploração industrial de linhagens produtoras de EPS utilizadas na produção de leites fermentados, já que nestes a produção ocorre sob condições de pH não controladas.

Gassem; Schmidt; Frank (1997) relatam que a manutenção de um pH mais elevado pode resultar no aumento da produção de EPS por estender o tempo da cultura na fase exponencial de crescimento e o prolongamento da fase estacionária reduziria a síntese de polissacarídeos da parede celular como peptideoglicano e ácidos teiônicos, podendo resultar em um aumento da produção de EPS. A temperatura, segundo Sutherland (1972), influenciaria de forma similar ao pH, na qual a diminuição causaria uma redução na taxa de crescimento e na biossíntese de polímeros da parede celular, gerando mais precursores disponíveis para a síntese de exopolissacarídeos.

L. helveticus ATCC15807 que sintetiza EPS com massa molecular em torno de $1,8 \times 10^6$ Da, compostos por glicose e galactose (2:1) (TORINO et al., 2000), produz quantidades mais elevadas (0,247 - 0,549 g.mL⁻¹) do polímero sob condições ácidas (pH

4,5 – 5,0) em comparação com condições mais alcalina (pH 6.2), quando cultivadas a 37°C no leite e utilizando a lactose como fonte de carbono (TORINO et al., 2001).

Outra característica do polímero produzido é a massa molecular, que pode mudar como consequência de degradação enzimática. De Vuyst e colaboradores (1998) observaram que polissacarídeos com alta massa molecular podem ser degradados com prolongada incubação em meio como o leite. Declínio da viscosidade e da produção de EPS sob prolongada incubação tem sido explicado como resultado da hidrólise por glicohidrolases extracelulares em *S. thermophilus* (CERNING et al., 1988) e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (MACURA; TOWNSLEY, 1984), no entanto faltam provas e conhecimentos do processo.

2.5 APLICAÇÕES DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS E EXOPOLISSACARÍDEOS

As bactérias ácido-láticas são microrganismos considerados GRAS (*Generally Recognized as Safe*), e a incorporação de EPS produzidos por tais cepas utilizadas como culturas iniciadoras evita o uso de aditivos de origem animal ou vegetal, que não são permitidos em alguns países (GIBSON; ROBERFROID, 1995).

Exopolissacarídeos aplicados em leites fermentados, especialmente no iogurte batido e de baixo teor de gordura, atribuem, realçam e mantêm características desejáveis de corpo, textura, viscosidade e aparência, melhorando dessa forma os atributos do produto. Tendo em vista suas propriedades, os EPS de BAL tem as mais variadas aplicações na indústria de laticínios como aditivos naturais, o que os tornam uma alternativa aos aditivos químicos, vegetais ou animais como fonte estabilizante, espessante, gelificante ou agentes de ligação da água, utilizados para alcançar as novas necessidades do mercado para tais produtos (DE VUYST; DEGEEST, 1999; DUBOC; MOLLET, 2001). Entretanto, a produção de EPS por LAB e probióticas é pequena (0,04 a 1,40 g.L⁻¹), quando comparada com outros microrganismos, por exemplo *Leuconostoc* (CERNING, 1995; MACEDO et al., 2002). Contudo, cepas de BAL podem ser usadas *in situ* para a produção de EPS (DE VUYST; DEGEEST, 1999).

Para serem usados como bioespessantes, principalmente em iogurtes e outros leites fermentados, os EPS devem apresentar propriedades tixotrópicas ou pseudoplásticas, isto é, sua reologia deve diminuir sob agitação ou fluxo, mas deve ser restaurada

completamente quando a força de cisalhamento for removida. Os polímeros devem ser compatíveis com outros componentes alimentares e sua estabilidade como agente de viscosidade é necessária em uma ampla faixa de pH, força iônica e/ou temperatura (DE VUYST; DEGEEST, 1999).

A aplicação de estabilizantes é largamente influenciada pela porcentagem de sólidos do leite presente no produto. A quantidade de estabilizante necessária para dar qualidade ao produto é inversamente proporcional à concentração de sólidos do leite. Pequenas quantidades de EPS produzidas durante o processamento de leites fermentados (RAWSON; MARSHALL, 1997) e da fabricação de queijos (LOW et al., 1998; PERRY; MCMAHON; OBERG, 1998) são capazes de proporcionar um impacto na textura e nas propriedades desses produtos. Eles interagem com as micelas de caseína, limitando dessa forma a suscetibilidade de ocorrer sinérese e com isso melhoram a textura por aumento da viscosidade em iogurtes e por aumento da umidade em queijo Mussarela.

Nordic ropy milk é o nome genérico para leites fermentados por BAL que produzem EPS (MACURA; TOWNSLEY, 1984). Eles são popularmente conhecidos na Escandinávia, Islândia, Rússia e Mongólia e tem uma produção tradicionalmente caseira, mas também apresentam uma produção em escala industrial. As principais BAL mesófilas utilizadas são *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *lactis* e *lactis* subsp. *diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* e *dextranicum*, e as termófilas, *S. thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *L. helveticus*.

Ayran é um iogurte produzido na Turquia e é tradicionalmente obtido pela adição de 30 - 50% de água e sal em um nível máximo de 1% (p/v) (KOKSOY; KILIC, 2004). Na indústria, o leite é fermentado usando culturas produtoras de exopolissacarídeos e o coágulo obtido é posteriormente diluído com uma mistura de água e sal. Diferencia-se de outros iogurtes por ser uma bebida que contém sal e não apresenta nenhum aromatizante. Esta bebida está propensa a uma instabilidade de textura durante seu armazenamento devido ao baixo pH. Koksoy; Kilic, 2004 verificaram que *Ayrans*, disponibilizado para a venda no varejo na Turquia, apresentavam uma separação do soro acima de 30% e, sendo este, um efeito considerado adverso à preferência do consumidor, testaram diferentes tipos e concentrações de estabilizantes (goma guar, goma locusta, gelatina e pectina de alto teor de metoxilação) para a prevenção da sinérese em *Ayran*, tradicionalmente manufaturado. Eles obtiveram resultados favoráveis à adição de estabilizantes ao produto, reduzindo assim a sinérese.

A separação do soro ocorre em bebidas lácteas fermentadas sem o uso de estabilizantes (LUCEY et al., 1999). Porém, uma boa consistência e uma textura homogênea para um bom “*mouthfeel*” e prevenção da sinérese são características desejadas para bebidas fermentadas. A sinérese ocorre devido à agregação e sedimentação das partículas de caseína durante o armazenamento, sendo, portanto o uso de estabilizantes necessário para prevenir tal processo (LUCEY et al., 1999; TOWLER, 1984).

Segundo Vlahopoulou; Bell; Wilbey (2001), células bacterianas podem interagir com proteínas do leite de três maneiras: como filamentos que reforçam a estrutura polimérica quando estão em quantidades suficientes; por produção de metabólitos, tais como enzimas proteolíticas e glicoproteínas; e através da produção de EPS que podem estar ligados às células e/ou em interação com as proteínas.

Queijos e leites fermentados produzidos com culturas produtoras de EPS exibem uma estrutura porosa na qual é possível visualizar os EPS associados à matriz protéica (HASSAN; FRANK; CORREDIG, 2002). Por outro lado, uma compacta estrutura com pequenos poros é observada em queijos e leite fermentados com culturas não produtoras de EPS. As proteínas e EPS parecem estar agregadas em ambos os produtos. Ainda algumas diferenças são encontradas na microestrutura de EPS entre as cepas “*ropy*” observadas através de micrografia eletrônica de varredura (HASSAN; FRANK; CORREDIG, 2002).

Produtos com EPS situados em cápsulas intimamente associada com a bactéria (EPS capsular) são encontrados sendo menos “*ropy*” que produtos com EPS distribuídos no volume total do produto (HASSAN et al., 1995). Dados obtidos por Broadbent e colaboradores (2001) indicam que EPS capsulares, mas não “*ropy*” de *S. thermophilus* também podem ser usados para aumentar o teor de umidade e melhorar a fusão em queijo Mussarela, sem afetar a viscosidade.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Estudar o comportamento de *Lactobacillus helveticus* em meios de fermentação com substâncias estimulantes ao crescimento para produção de exopolissacarídeos.

3.2 ESPECÍFICOS

- Selecionar fontes de carbono para produção de EPS por *Lactobacillus helveticus*;
- Aperfeiçoar a produção de EPS em relação às concentrações das fontes selecionadas à temperatura de 37°C;
- Testar a concentração das fontes de carbono selecionadas acrescidas de diferentes concentrações das fontes de nitrogênio para produção de EPS por *Lactobacillus helveticus*;
- Determinar o pH, contagem de células viáveis e concentração de açúcares totais e redutores nos meios de fermentação;
- Verificar qual meio de fermentação proporcionou a maior produtividade de exopolissacarídeos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biopolímeros da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus de São José do Rio Preto - SP.

4.1 MICRORGANISMO

Nesta pesquisa foi utilizada uma cultura autóctone de *Lactobacillus helveticus*, isolada a partir de soro-fermento de laticínios brasileiros que não utilizavam cultura láctica comercial para a fabricação de queijos (ROSSI, 2001).

4.2 MEIOS DE CULTURA

4.2.1 Meio de Manutenção

As culturas foram mantidas estocadas em meio *De Man Rogosa Sharp* - MRS acrescido de glicerol estéril 15% (v/v). O glicerol foi utilizado como crioprotetor e os cultivos foram congelados a -20°C até o momento da reativação e posterior inoculação no meio de fermentação.

4.2.2 Meio de Produção ou Fermentação

Foi utilizado como meio de produção ou fermentação leite desnatado reconstituído (LDR), preparado numa concentração de 10% (p/v) e esterilizado a 100°C por 30 minutos. Cada fonte de carbono e fonte de nitrogênio foi esterilizada separadamente em autoclave a 121°C por 15 minutos e então adicionada ao LDR 10% esterilizado.

4.3. CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO

4.3.1 Preparo do Pré-inóculo

A reativação das culturas foi realizada por três repiques sucessivos em caldo MRS acidificado até pH 5,4 e a incubação foi feita a 37°C por 24 horas.

4.3.2 Pré-fermentação

A pré-fermentação foi realizada repicando-se a cultura obtida em caldo MRS para 50mL do mesmo meio. Foi inoculado 1% (v/v) da cultura em 50mL de caldo MRS, com incubação em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas.

4.3.3 Fermentação

Os meios de fermentação foram inoculados a 1% (v/v) com a cultura. Os frascos Erlenmeyer de 250mL continham 50mL do meio de fermentação em uma proporção ar/meio de 5:1, com as diferentes fontes de carbono e nitrogênio a serem testadas (Tabela 1).

Primeiramente foram realizadas fermentações com diversas concentrações de fontes de carbono, glicose e frutose, e de acordo com os resultados obtidos definiu-se uma concentração fixa de carbono, de ambas as fontes, para fermentações posteriores, nas quais houve variação de fontes de nitrogênio e suas respectivas concentrações.

Os frascos Erlenmeyer foram incubados em agitador orbital rotatório (Marconi® Modelo MA 830) sob rotação de 100 rpm a 37°C (Figura 1) por 24, 48, 72 e 96 horas. Os ensaios foram realizados em triplicata.



Figura 1. Frascos Erlenmeyer contendo meio de fermentação e incubados em agitador orbital rotatório a 37°C e 100 rpm.

Tabela 1. Fontes de carbono e nitrogênio com suas respectivas concentrações utilizadas para produção de EPS por *Lactobacillus helveticus* em leite desnatado reconstituído 10% (LDR 10%) incubados em agitador orbital rotatório a 37°C e 100 rpm

Experimento	Fonte de Carbono (%)	Fonte de Nitrogênio (%)
1	Glicose 1%	--
	Glicose 2%	--
	Glicose 3%	--
	Glicose 4%	--
	Glicose 5%	--
2	Glicose 2%	Sulfato de Amônia 1%
		Sulfato de Amônia 2%
		Sulfato de Amônia 3%
		Sulfato de Amônia 4%
		Sulfato de Amônia 5%
3	Glicose 2%	Peptona de Carne 1%
		Peptona de Carne 2%
		Peptona de Carne 3%
		Peptona de Carne 4%
		Peptona de Carne 5%
4	Glicose 2%	Extrato de Levedura 1%
		Extrato de Levedura 2%
		Extrato de Levedura 3%
		Extrato de Levedura 4%
		Extrato de Levedura 5%
5	Frutose 1%	--
	Frutose 2%	--
	Frutose 3%	--
	Frutose 4%	--
	Frutose 5%	--
6	Frutose 2%	Sulfato de Amônia 1%
		Sulfato de Amônia 2%
		Sulfato de Amônia 3%
		Sulfato de Amônia 4%
		Sulfato de Amônia 5%
7	Frutose 2%	Peptona de Carne 1%
		Peptona de Carne 2%
		Peptona de Carne 3%
		Peptona de Carne 4%
		Peptona de Carne 5%
8	Frutose 2%	Extrato de Levedura 1%
		Extrato de Levedura 2%
		Extrato de Levedura 3%
		Extrato de Levedura 4%
		Extrato de Levedura 5%

4.3.4 Interrupção dos Cultivos

A fermentação foi realizada por um período de 96 horas. Os frascos contendo o meio de fermentação foram retirados nos intervalos de 24, 48, 72 e 96 horas. A escolha da duração do processo de fermentação foi feita com base na metodologia utilizada em alguns estudos (LIN; CHANG-CHIEN, 2007; TORINO; MOZZI; FONT DE VALDEZ, 2005), que verificaram crescimento e produção de EPS ao longo de um extenso período de fermentação.

4.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.4.1 Determinação do Número de Células Viáveis

A viabilidade celular de *Lactobacillus helveticus* foi avaliada após cada intervalo estabelecido (0, 24, 48, 72 e 96 horas) nos meios de fermentação (LDR 10%) inoculados. Foi utilizada a técnica de cultivo em placa para a enumeração, transferindo-se 1mL da cultura em 9mL de água peptonada 0,1% estéril, sendo esta a diluição 10^{-1} , e a partir desta foram feitas diluições seriadas. Posteriormente, 1mL de cada diluição selecionada foi inoculado, pela técnica de profundidade em placas estéreis, utilizando 15mL de ágar MRS acidificado até pH 5,4 como meio de cultura. Após completa solidificação as placas foram incubadas invertidas a 37°C, em condições de anaerobiose durante 48 horas (adaptação de SILVA et al., 2007). O resultado obtido em cada placa foi multiplicado pela recíproca da diluição utilizada e o valor expresso em unidades formadoras de colônias por mililitro da amostra (ufc.mL⁻¹)

4.4.2 Determinação do pH

Foram feitas medições do valor de pH em cada frasco Erlenmeyer incubado. A cada interrupção dos cultivos (0, 24, 48, 72 e 96 horas) e após a retirada da alíquota para a contagem de células viáveis em condições estéreis, o pH foi determinado diretamente no meio fermentado por potenciometria, utilizando-se um pH-metro (Marconi® Modelo Digimed DM20).

4.4.3 Isolamento dos Exopolissacarídeos (EPS)

Os EPS foram isolados a partir do meio de fermentação. Após o período de incubação de cada frasco o meio fermentado foi transferido para tubos de centrifuga de 50mL e posteriormente centrifugado a 7077 x g por 20 minutos a 4°C (Jouan® Modelo GR 2022). O sobrenadante do meio foi transferido para Béquer previamente pesado. Foi adicionado ao sobrenadante três volumes de álcool anidro (4°C) mantendo-o a 4°C por 24 horas para a precipitação dos EPS (Figuras 2 e 3).

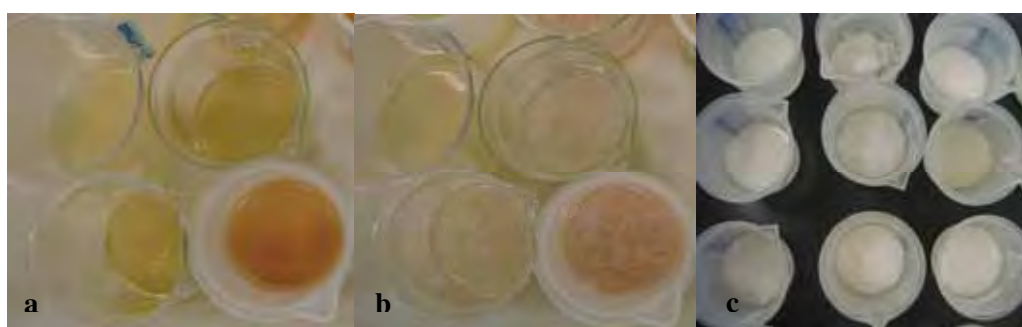


Figura 2. Sobrenadantes após centrifugação do meio fermentado (a); (b) após a adição de álcool anidro (4°C); (c) e após precipitação (4°C).



Figura 3. Isolamento do EPS com álcool anidro (4°C).

O EPS precipitado foi seco em estufa à vácuo a 55°C até peso constante, determinando assim seu rendimento em gramas por 50mL de meio de produção (g/50mL).

4.4.4 Determinação de açúcares totais

A quantificação de açúcares totais foi feita a partir da análise química pelo método fenol - ácido sulfúrico, descrito por Dubois e colaboradores (1956). Utilizaram-se alíquotas de 500µL dos sobrenadantes das amostras, obtidos após centrifugação, que foram transferidos para tubos de ensaio de 20mL seguidos da adição de 500µL de solução fenol 5% e posterior acréscimo de 2,5mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄).

A amostra foi deixada em repouso na temperatura ambiente por 20 minutos, após agitação, e a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (Bel[®] Photonics SP1105) no comprimento de onda de 490nm. As concentrações foram determinadas com base em uma curva de calibração da glicose (Apêndice – Figura 18), preparada com uma solução padrão de 0,01% (p/v) de glicose. As análises foram realizadas em duplicata.

4.4.5 Determinação de açúcares redutores

Os açúcares redutores foram determinados segundo a metodologia proposta por Somogyi (1952) e Nelson (1944), relacionada com a redução de átomos de cobre em meio alcalino. Utilizaram-se alíquotas de 500µL dos sobrenadantes das amostras, transferidas para tubos de ensaio de 20mL, e em seguida foi adicionado 500µL de reativo de Somogyi e posteriormente submissão a banho-maria fervente por 10 minutos. Após o resfriamento, adicionou-se 500µL do reativo de Nelson e 3,5mL de água destilada.

A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Bel[®] Photonics SP1105) no comprimento de onda de 540nm e as concentrações foram determinadas com base em uma curva de calibração da glicose (Apêndice – Figura 19) com uma solução padrão de 0,01% (p/v) de glicose. As análises foram realizadas em duplicata.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As colônias da cepa de *Lactobacillus helveticus* isolada e caracterizada por Rossi (2001) que foi utilizada nesta pesquisa apresentaram-se de cor bege e de aspecto leitoso (Figura 4). Esta cepa é capaz de fermentar glicose, frutose, manose e lactose, porém não fermenta sacarose e outros carboidratos, tal caracterização foi realizada por meio da fermentação de carboidratos utilizando as galerias API CH50. E foi observado que *L. helveticus* também foi capaz de resistir ao tratamento térmico a 55°C e 65°C por 30 minutos, apresentando crescimento intenso após este tratamento (ROSSI, 2001).

Em outro estudo Barros (2005) verificou que esta mesma cepa apresentou integridade metabólica e foi caracterizada como não autolítica, uma vez que cepas autolíticas apresentam rápida passagem da fase estacionária para a fase de declínio, seguida de alterações na parede celular.



Figura 4. Colônias de *Lactobacillus helveticus* em superfície de meio *De Man Rogosa Sharpe* - MRS incubado em condições de anaerobiose a 37°C por 48 horas.

5.1 ADIÇÃO DAS FONTES DE CARBONO

Glicose e frutose foram os açúcares utilizados neste estudo para verificar a influência de fontes de carbono no crescimento e na produção de EPS. Utilizaram-se concentrações de 1, 2, 3, 4 e 5% (p/v) de ambos os carboidratos, temperatura de incubação de 37°C e agitação de 100 rpm; os ensaios foram realizados em triplicata. Os valores obtidos para a produção de EPS, em gramas por 50mL de meio de produção, são mostrados na Figura 5, juntamente com o desvio padrão apresentado nas três repetições de cada experimento.

Ao observar a Figura 5 e cada uma das concentrações de glicose empregada, pode-se verificar que as concentrações 1 e 2% de glicose foram as concentrações que apresentaram maiores valores para a produção de EPS nos períodos de 72 e 96 horas, sendo que a concentração 2% também apresentou o valor máximo para o tempo 48 horas. As concentrações 4 e 5% apresentaram valores próximos de produção de EPS nos quatro tempos avaliados. Ainda, as produções obtidas com 96 horas de fermentação, em torno de 0,53 g/50mL, foram as mais homogêneas em todas as concentrações testadas.

Avaliando-se a produção de EPS a partir de frutose como fonte de carbono (Figura 5) é possível notar que a mesma apresentou maiores quantidades quando comparadas com os valores para glicose nas mesmas concentrações. Nos primeiros três períodos de interrupção dos cultivos, as maiores produtividades foram com 3 e 4% de frutose, com valores variando de 0,74 a 0,97 e de 0,75 a 1,23 g/50mL de meio de produção, respectivamente.

Conforme varia e/ou aumenta-se a concentração da fonte de carbono, mais macronutrientes estarão disponíveis aos microrganismos, os quais serão por esses utilizados para suas atividades. Em trabalho realizado por Sanchez e colaboradores (2006) foi verificado que frutose e manitol propiciaram menores sínteses de EPS por *Lactobacillus pentosus* LPS26, considerando-se então que glicose e lactose são as fontes de açúcar mais favoráveis para a produção de EPS. Entretanto, no nosso trabalho foi observado que a frutose favoreceu maiores produções de EPS em comparação a glicose.

Degeest; De Vuyst (2000) encontraram maiores produções de EPS com lactose do que com glicose utilizando culturas de *Streptococcus thermophilus* LY03, e Looijesteijn; Hugenholtz (1999) utilizando cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NIZO B40, verificaram que as mesmas produziram mais EPS com glicose do que com frutose, podendo-se verificar com isso que a fonte de carbono, assim como a bactéria utilizada influenciam na quantidade de polissacarídeo produzido.

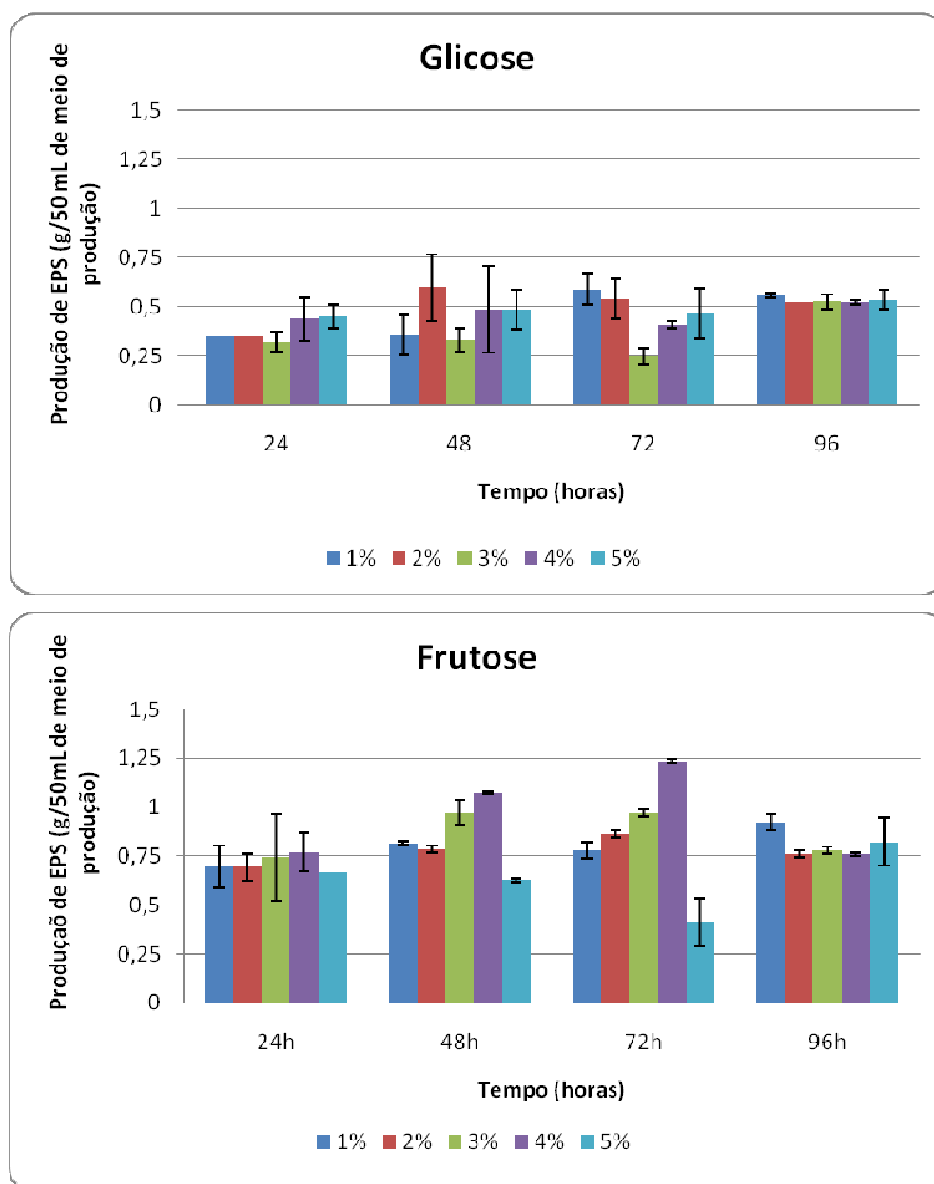


Figura 5. Produção de EPS (g/50mL de meio de produção) por *Lactobacillus helveticus* em LDR 10% acrescido de diferentes concentrações de glicose e frutose (1, 2, 3, 4 e 5%), após 24, 48, 72 e 96 horas de fermentação a 37°C e 100 rpm. I = desvio padrão das três repetições de cada experimento.

O aumento da produção de EPS ao longo do tempo de fermentação também foi verificado por Lin; Chang-Chien (2007) que trabalharam com *L. helveticus* BCRC14030 por 84 horas de fermentação em LDR 10% (p/v), sem acréscimos de outros nutrientes. Foi observado um aumento de 0,25 para 0,73 g.L⁻¹ entre 32 e 84 horas de fermentação, onde a

maior produção ocorreu com 60 horas. No nosso trabalho foi verificado que a maior produção de EPS ocorreu em 48 horas. Entretanto, ocorre um decréscimo nas outras concentrações, por exemplo, com 4% de frutose, ao comparar os valores de 72 e 96 horas, o que pode ser devido à presença de glico-hidrolases capazes de hidrolisar EPS e liberar monômeros da sua cadeia (LIN; CHANG-CHIEN, 2007).

Outro aspecto a ser considerado é que condições menos favoráveis ao crescimento microbiano pode ter resultado na maior produção de EPS pela própria cepa para sua proteção contra um meio adverso ao crescimento (CERNING et al., 1988).

5.1.1 pH e viabilidade celular de *Lactobacillus helveticus*

De acordo com Karasová e colaboradores (2002); Kenny e colaboradores (2003) a enzima β -galactosidase, responsável pela hidrólise da lactose, possui temperatura ótima de 37°C e pH ótimo próximo à neutralidade. Os meios de fermentação foram incubados com pH inicial em torno de 6,0 e pode ser observado que o pH, ao longo do tempo de fermentação, apresentou comportamento similar para ambas as fontes de carbono e suas concentrações (Figura 6).

Aslim e colaboradores (2005) avaliaram a influência do pH no crescimento microbiano e na produção de EPS, sendo verificado um aumento proporcional de ambos com o aumento do pH. As cepas estudadas, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, demonstraram máximo crescimento em pH 7,0 e maior produção de EPS em pH 6,2 e 6,8, respectivamente (ASLIM et al., 2005). Em outro estudo Mozzi e colaboradores (1995) observaram a máxima síntese de EPS e contagens de células viáveis em pH 6,0 para *L. casei* CRL 87, onde a quantidade de EPS foi 3,6 vezes mais alta em relação à aquela sem controle do pH. Apesar do presente estudo não ter sido realizado sob condições de pH controladas, partiu-se de um valor de pH que, segundo a literatura, favorece o crescimento microbiano e a produção de EPS.

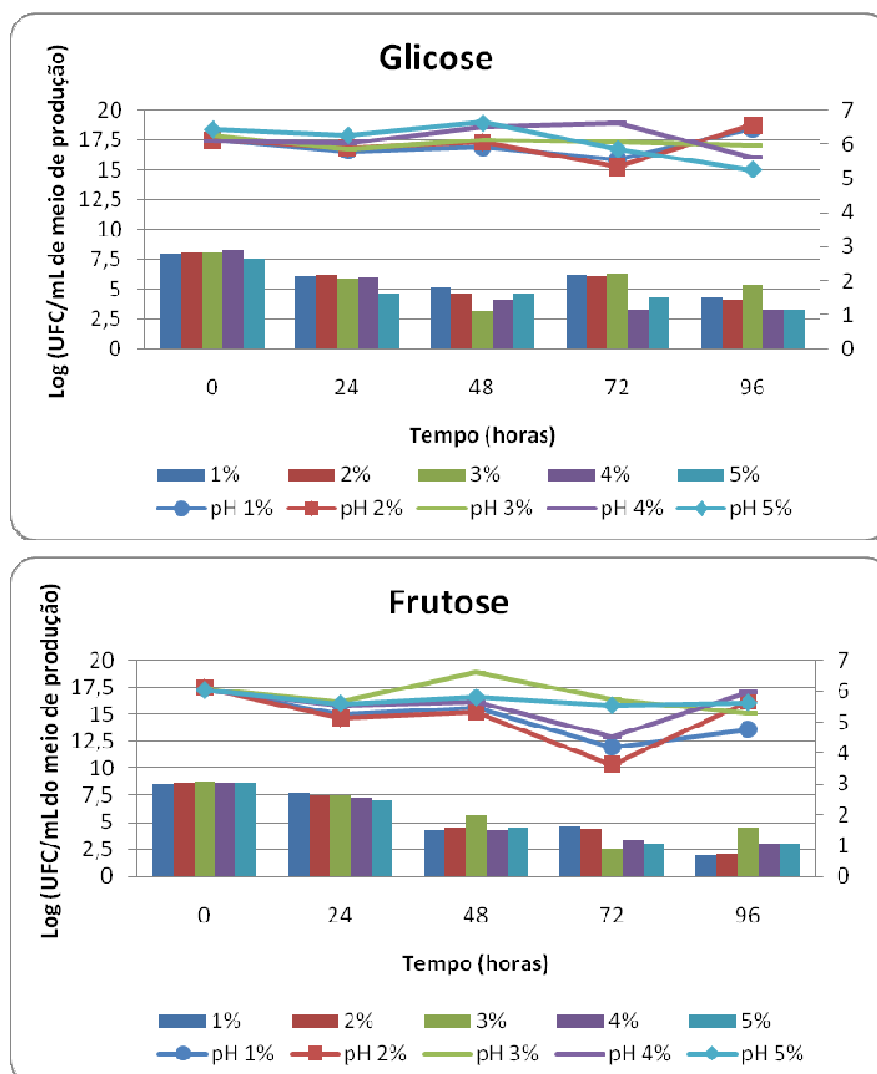


Figura 6. Comportamento do pH *versus* a enumeração de células viáveis de *Lactobacillus helveticus* em LDR 10% acrescido de diferentes concentrações de glicose e frutose (1, 2, 3, 4 e 5%), após 24, 48, 72 e 96 horas de fermentação a 37°C e 100 rpm.

Lactobacillus helveticus é uma bactéria capaz de metabolizar a lactose presente no meio de fermentação, reduzindo o pH do meio pela produção de ácidos orgânicos. É caracterizada como uma bactéria homofermentativa produzindo ácido lático como principal metabólito (70 a 90%). Por isso, o pH do meio apresentou o comportamento observado (Figura 6). Porém, a elevação do pH após 72 horas pode ser resultado da quebra de determinados compostos formados pela síntese metabólica realizada pelo

microrganismo. E como foi verificada uma diminuição do número de células viáveis nos meios com 96 horas de fermentação (Figura 6) o pH mais elevado dessas amostras pode ser também resultado da liberação de aminoácidos constituintes das células microbianas, após a morte celular.

Em trabalhos anteriores (ROSSI, 2001; BARROS, 2005) com a cultura de *Lactobacillus helveticus* utilizada neste estudo, foi verificada menor habilidade em diminuir o pH do meio em até 50 horas de incubação, mas após esse período, foi capaz de atingir valores de pH tão baixos quanto 3,98 comparado com as outras cepas estudadas nesses trabalhos.

A queda no número de células viáveis após 24 horas pode ter ocorrido devido ao maior tempo de incubação, escassez de nutrientes do meio ou por se encontrarem na fase de declínio de crescimento (Figura 6).

Um estudo realizado por Sanchez e colaboradores (2006) verificou a influência de diferentes fontes de carbono no crescimento microbiano de *Lactobacillus pentosus* LPS26 e sua produção de EPS. Foram observadas maiores contagens de células viáveis em meio com manitol ($2,4 \times 10^9$ ufc.mL⁻¹) em contraste com meio contendo frutose ($1,5 \times 10^8$ ufc.mL⁻¹), porém não houve nenhuma diferença significativa quando comparada com o meio contendo glicose, durante a fermentação realizada em meio semidefinido (pH 6,0) suplementado com uma concentração de 30 g.L⁻¹ da fonte de carbono e incubação a 30°C, por 72 horas. No presente trabalho (Figura 6) pode-se verificar uma maior contagem para as fermentações realizadas com glicose quando comparadas com frutose, porém inferiores às do trabalho acima citado. Tal fato mostra que o crescimento microbiano e a quantidade de EPS produzido estão relacionados tanto às fontes de carbono quanto ao microrganismo utilizado e que o efeito do pH na produção de EPS depende das condições experimentais e da cepa utilizada (DE VUYST; DEGEEST, 1999).

5.1.2 Açúcares totais e açúcares redutores

A determinação de açúcares totais foi realizada pelo método proposto por Dubois e colaboradores (1956) que emprega o reagente fenol-sulfúrico, o qual atua com os açúcares totais presentes na amostra formando uma coloração castanha cuja intensidade dependerá da concentração dos açúcares. Já a metodologia de Somogyi (1952) e Nelson (1944), utilizada para as análises de açúcares redutores, baseia-se no fato de que os

glicídeos redutores em meio alcalino são transformados em enedióis, os quais reduzem o íon cúprico a cuproso. O óxido cuproso assim formado reduz o arsênio-molíbídico a óxido de molibdênio de coloração azul, cuja intensidade é proporcional a quantidade de açúcares existentes na amostra.

Nas análises realizadas (Figura 7) verifica-se uma diminuição da concentração de açúcares totais ao longo do tempo de fermentação, com exceção de alguns pontos dentro o período de avaliação. Os dados do tempo inicial (0h) são os valores iniciais de concentração de açúcares presentes no meio, tais dados são a somatória das porcentagens de glicose ou frutose adicionadas mais o percentual de lactose (em torno de 4,9 g/L) presente no LDR 10%, preparado e esterilizado separadamente das fontes de carbono.

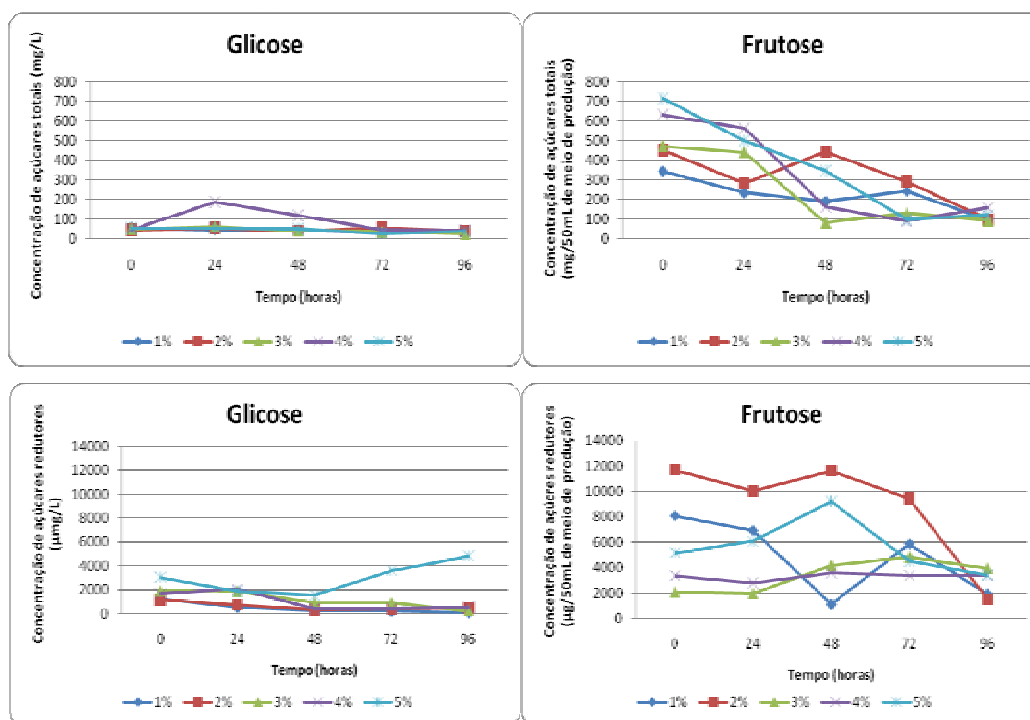


Figura 7. Concentração de açúcares totais e redutores resultantes em LDR 10% acrescido de diferentes concentrações de glicose e frutose (1, 2, 3, 4 e 5%), respectivamente, por 24, 48, 72 e 96 horas de fermentação a 37°C e 100 rpm, por *Lactobacillus helveticus*. Os gráficos referentes à glicose se encontram melhor detalhados no Apêndice (Figura 20).

Como visualizado na Figura 7, a concentração de 4% de glicose apresentou alguns dados com pequenas variações entre os valores de açúcares totais ao longo do tempo, e para a frutose tal comportamento foi observado na concentração 2%. Após avaliação pode-se inferir que os monômeros de açúcar presentes no meio de fermentação foram utilizados pela bactéria para formação de novas células bacterianas e polímeros.

A Figura 7 também mostra dados referentes à concentração dos açúcares redutores presentes no meio fermentado após a interrupção dos cultivos. Pode-se verificar que ao longo do tempo de incubação a quantidade de açúcares diminuiu, com exceção da concentração 5% de glicose.

A Figura 8 mostra o aspecto dos EPS precipitados após a adição de álcool anidro (4°C). Estes permitiram estabelecer as concentrações fixas de carbono de ambas as fontes, glicose e frutose, para serem utilizadas na etapa seguinte da pesquisa. Uma vez que, segundo García-Ochoa e colaboradores (2000), uma massa de EPS mais compacta deve-se a produção de um EPS de cadeia mais longa e, portanto, uma maior viscosidade e melhor qualidade do EPS obtido. Na etapa seguinte foram adicionadas fontes de nitrogênio juntamente com a fonte de carbono ao meio de fermentação.

Observando-se os EPS precipitados, ilustrados na Figura 8, na concentração 2% de glicose, nota-se que estes apresentam aspecto mais homogêneo, tanto com relação à quantidade quanto em relação à homogeneidade da massa, por isso a concentração 2% de glicose foi selecionada para a próxima etapa. Para a frutose também manteve-se a concentração 2% em virtude da similaridade dos resultados obtidos, juntamente com o aspecto visual. Tal similaridade de produção com as outras concentrações e considerando-se os custos do processo, fez com que se optasse por esta concentração (2%).

A Tabela 2 mostra os valores das contagens de células viáveis, expressa em ufc.mL^{-1} , em comparação com as quantidades de EPS produzido pelas culturas que tiveram o meio de fermentação suplementado com 2% de glicose e 2% de frutose, selecionadas para a etapa seguinte da pesquisa.

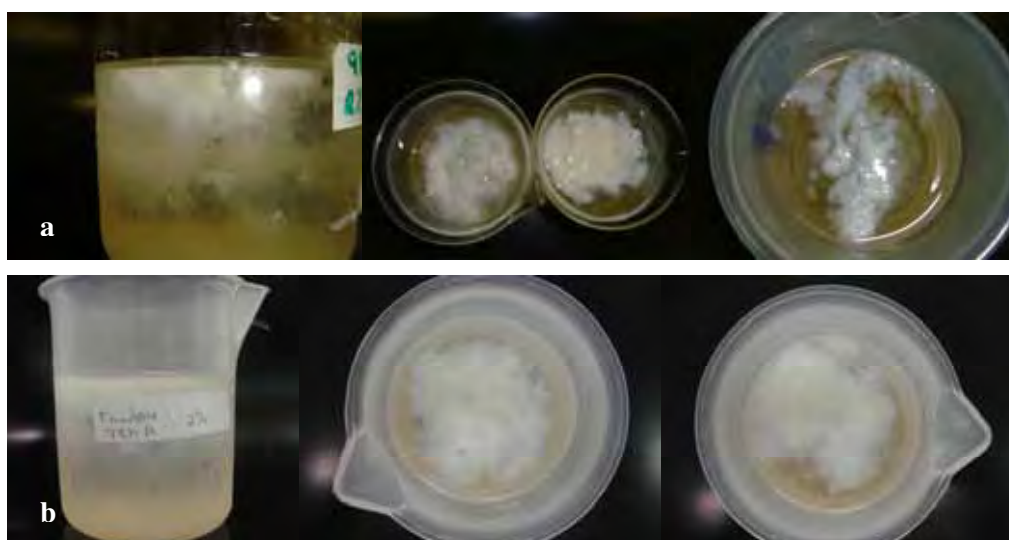


Figura 8. Aspecto dos EPS produzidos por *L. helveticus* e obtidos após adição de álcool anidro (4°C), utilizando como meio de fermentação LDR 10% acrescido de 2% de glicose (a) e 2% de frutose (b), após 48 horas de fermentação a 37°C e 100 rpm.

Tabela 2. Valores de pH, EPS e contagem de células obtidos na fermentação de LDR 10% adicionado de 2% de glicose e 2% de frutose (p/v), respectivamente, por *Lactobacillus helveticus*, após 24, 48, 72 e 96 horas de fermentação a 37°C e 100 rpm

Fonte de Carbono (2%)	Tempo de incubação (h)	pH	EPS (g/50mL de meio de produção)	Contagem de células (ufc.mL ⁻¹)
Glicose	0	6,12	-	1,2 x 10 ⁸
	24	5,89	0,3502	1,9 x 10 ⁷
	48	6,06	0,5989	4,4 x 10 ⁶
	72	5,33	0,5389	1,2 x 10 ⁶
	96	6,56	0,5250	1,0 x 10 ⁴
Frutose	0	6,11	-	4,6 x 10 ⁸
	24	5,13	0,6938	3,0 x 10 ⁷
	48	5,33	0,7864	2,8 x 10 ⁴
	72	3,62	0,8625	2,4 x 10 ⁴
	96	5,66	0,7616	1,2 x 10 ²

5.2 ADIÇÃO DAS FONTES DE NITROGÊNIO

Nesta segunda etapa da pesquisa verificou-se a influência de três diferentes fontes de nitrogênio, sulfato de amônio, extrato de levedura e peptona de carne, na produção de EPS. Cada uma das fontes testadas apresenta composição distinta, sendo que as duas últimas possuem em torno de 11% de nitrogênio total em sua formulação.

Os experimentos foram realizados utilizando-se a mesma metodologia anteriormente citada, diferenciando-se somente pela adição das fontes de nitrogênio. Ao meio de fermentação (LDR 10%) foi adicionada a concentração 2% de glicose e 2% de frutose, e as respectivas fontes de nitrogênio nas concentrações de 1, 2, 3, 4 e 5% (p/v). Ambas as fontes (carbono/nitrogênio) foram esterilizadas, separadamente uma da outra, em 10mL de água destilada e posteriormente adicionadas ao LDR (10%).

5.2.1 Sulfato de Amônio - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Na Figura 9 podem ser observadas elevadas produções de EPS em todos os períodos de tempo avaliados (24, 48, 72 e 96 horas), onde os valores máximos foram obtidos pelas concentrações 4% e 5% de sulfato de amônio para ambas as fontes de carbono na concentração 2%.

Macedo e colaboradores (2002) verificaram que o rendimento da produção de EPS por *L. rhamnosus* foi significativamente influenciada pela adição de sais, que aumentou de 2,8 para 5,7 vezes em comparação com permeado de soro de leite suplementado com extrato de levedura. Tais dados corroboram com os apresentados neste trabalho (Figura 9), pois a produção de EPS foi, em alguns casos, superior a três vezes à da produção sem a fonte de nitrogênio (Figura 5), por exemplo, o meio fermentado contendo 2% de glicose e acrescido de 5% de sulfato de amônio, após 96 horas de incubação.

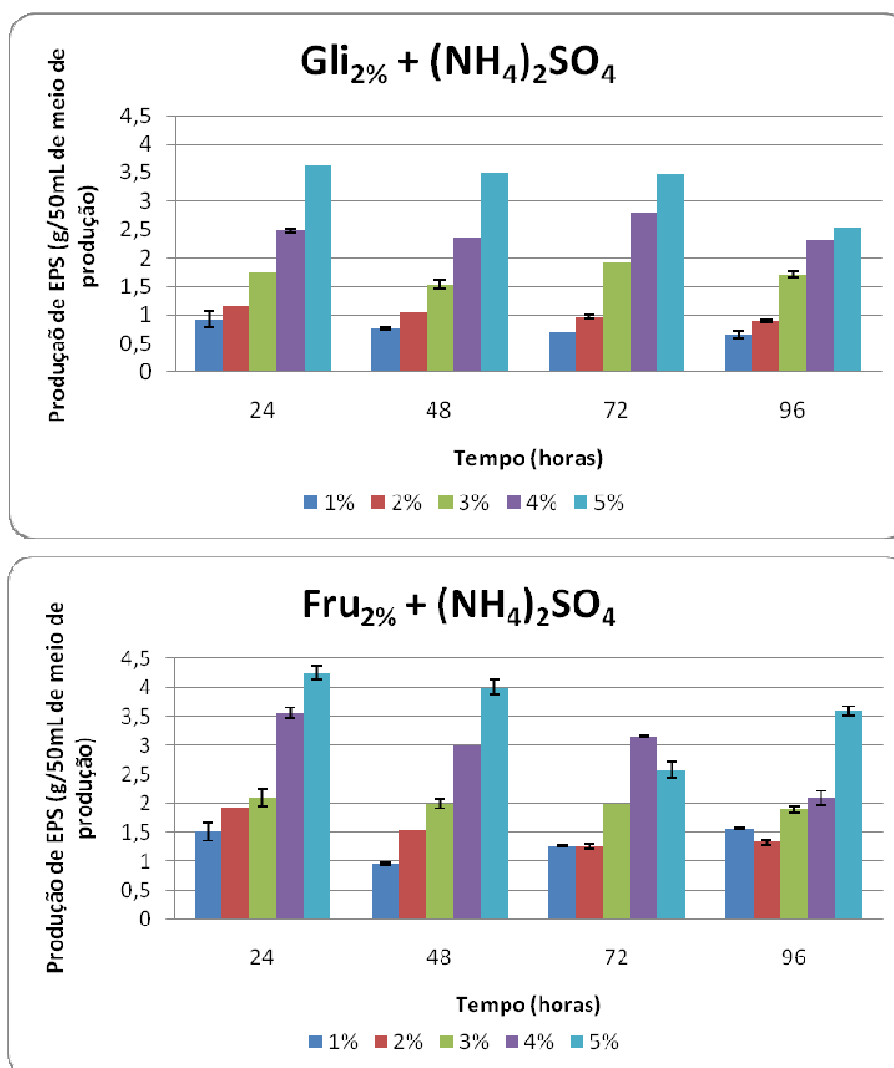


Figura 9. Produção EPS (g/50mL de meio de produção) por *Lactobacillus helveticus* em LDR 10% acrescido de diferentes concentrações de sulfato de amônio (1, 2, 3, 4 e 5%), em meio de produção contendo 2% de glicose e 2% de frutose, respectivamente, após 24, 48, 72 e 96 horas de fermentação a 37°C e 100 rpm. I = desvio padrão das três repetições de cada experimento. Fotos dos biopolímeros produzidos se encontram no Apêndice (Figura 21).

5.2.1.1 pH e viabilidade celular de *Lactobacillus helveticus*

Na Figura 10 observa-se a contagem de células viáveis de *Lactobacillus helveticus* e o respectivo comportamento do pH ao longo das 96 horas de incubação. Os dados apresentados mostram maiores contagens para a menor concentração de sulfato de

amônio (1%), adicionada ao meio com glicose. Com isso, pode-se deduzir que a concentração da fonte de nitrogênio foi um fator limitante ao crescimento microbiano e possivelmente influenciou a quantidade de EPS produzido, visto que maiores quantidades de EPS foram observados nos experimentos com maiores concentrações de sulfato de amônio (Figura 9). Os pH nestas fermentações ficaram em torno de 5,0 e 6,0 (Figura 10).

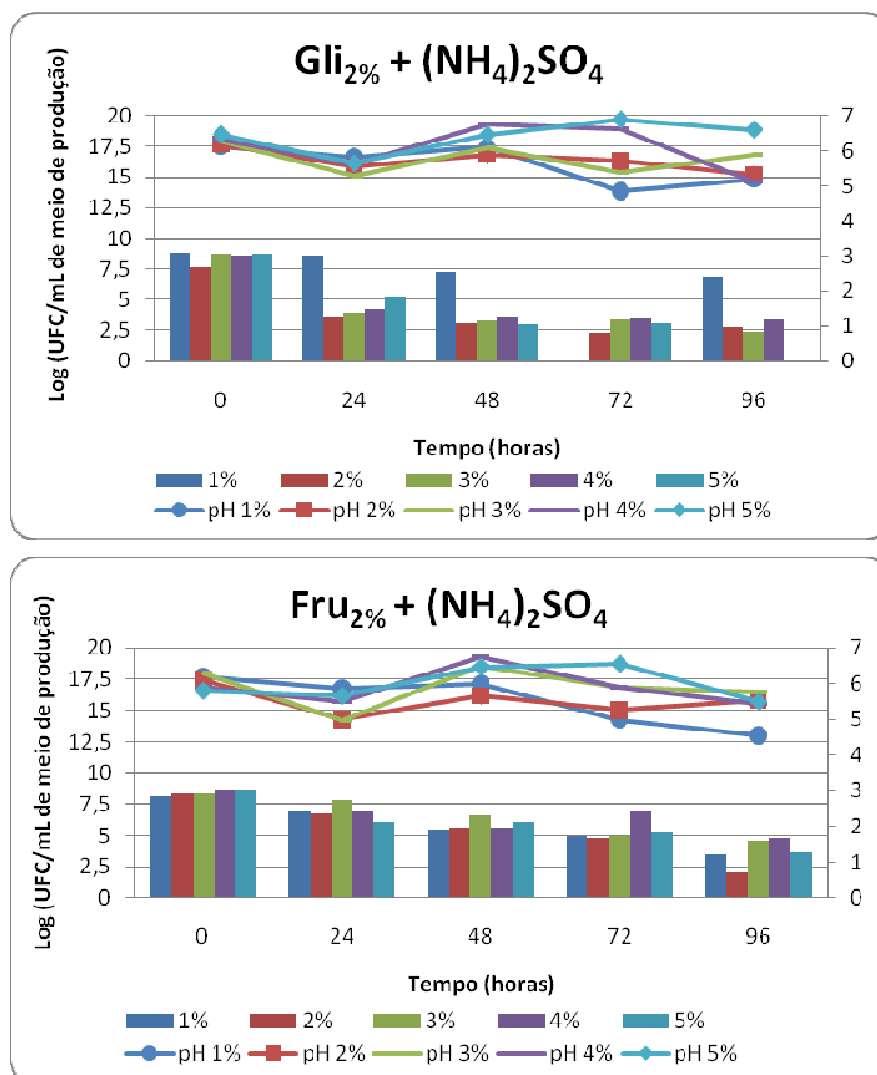


Figura 10. Comportamento do pH *versus* a enumeração de células viáveis de *Lactobacillus helveticus* em LDR 10% acrescido de diferentes concentrações de sulfato de amônio (1, 2, 3, 4 e 5%) em meio contendo 2% de glicose e 2% frutose, respectivamente, na produção de EPS por *Lactobacillus helveticus*, após 24, 48, 72 e 96 horas de fermentação a 37°C e 100 rpm.

Por outro lado, quando se analisa na Figura 10 as fermentações utilizando frutose e sulfato de amônio, pode ser notado crescimento semelhante em cada tempo de fermentação para todas as concentrações da fonte de nitrogênio. Os valores de pH ficaram em torno de 5,0 e 6,0 (Figura 10).

Macedo e colaboradores (2002) observaram que a adição de concentrados orgânicos de nitrogênio, vitaminas ou aminoácidos, separadamente ao meio de fermentação, não favoreceu o crescimento microbiano quando comparado com o grupo controle, mas a combinação desses suplementos favoreceu o crescimento dos microrganismos ($9,0 \times 10^9$ ufc.mL⁻¹). Em nosso trabalho também não foi verificado um aumento populacional somente com a adição de um sal ao meio de fermentação (Figura 10), mas em contrapartida, os valores de produção de EPS foram maiores quando comparados com a fermentação somente com a fonte de carbono.

5.2.1.2 Açúcares totais e açúcares redutores

Os dados referentes à concentração final de açúcares totais e redutores são mostrados na Figura 11. É possível observar que houve decréscimo da concentração ao longo do tempo de fermentação. Como a concentração inicial de açúcar foi igual para todos os experimentos com as diferentes concentrações de sulfato de amônio, observa-se agora a influência de tal concentração na produção de EPS (Figura 9), visualizada também pelo consumo dos açúcares presentes no meio (Figura 11).

Na Figura 11 verifica-se a diminuição da concentração de açúcares totais ao longo do tempo de incubação para ambos os experimentos, apesar de que a fermentação do meio suplementado com frutose ter apresentado maiores quantidades de EPS quando comparado com glicose os valores de açúcares restantes foram próximos. Entretanto, em alguns casos os valores dos açúcares redutores foram ainda elevados (Figura 11). Isto pode estar relacionado à aparência do precipitado, uma vez que foi difícil de secar e, portanto, o valor registrado pode ter sido maior (Figura 9).

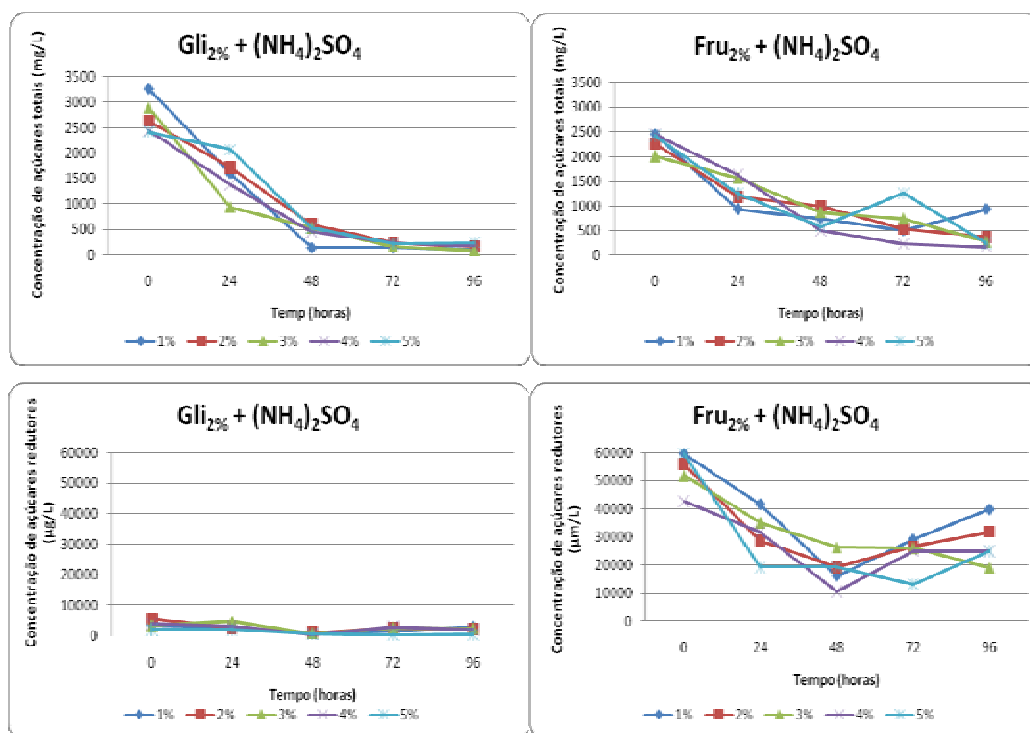


Figura 11. Concentração de açúcares totais e redutores resultantes em LDR 10% acrescido de diferentes concentrações de sulfato de amônio (1, 2, 3, 4 e 5%) em meio de produção contendo 2% de glicose e 2% de frutose, respectivamente, após 24, 48, 72 e 96 horas de fermentação a 37°C e 100 rpm, por *Lactobacillus helveticus*. O gráfico referente à determinação de açúcares redutores no meio de fermentação com glicose adicionada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se encontra melhor detalhado no Apêndice (Figura 22).

5.2.2 Peptona de carne

Na figura 12 observa-se produtividades similares nas cinco concentrações de peptona de carne para os experimentos com frutose, e para glicose uma produção que aumentou gradualmente ao elevar-se a concentração da fonte de nitrogênio. Nas concentrações 2 e 4% de peptona de carne com glicose verifica-se claramente um aumento da produção de EPS durante a incubação, assim como nos experimentos com concentrações 3 e 4% com frutose.

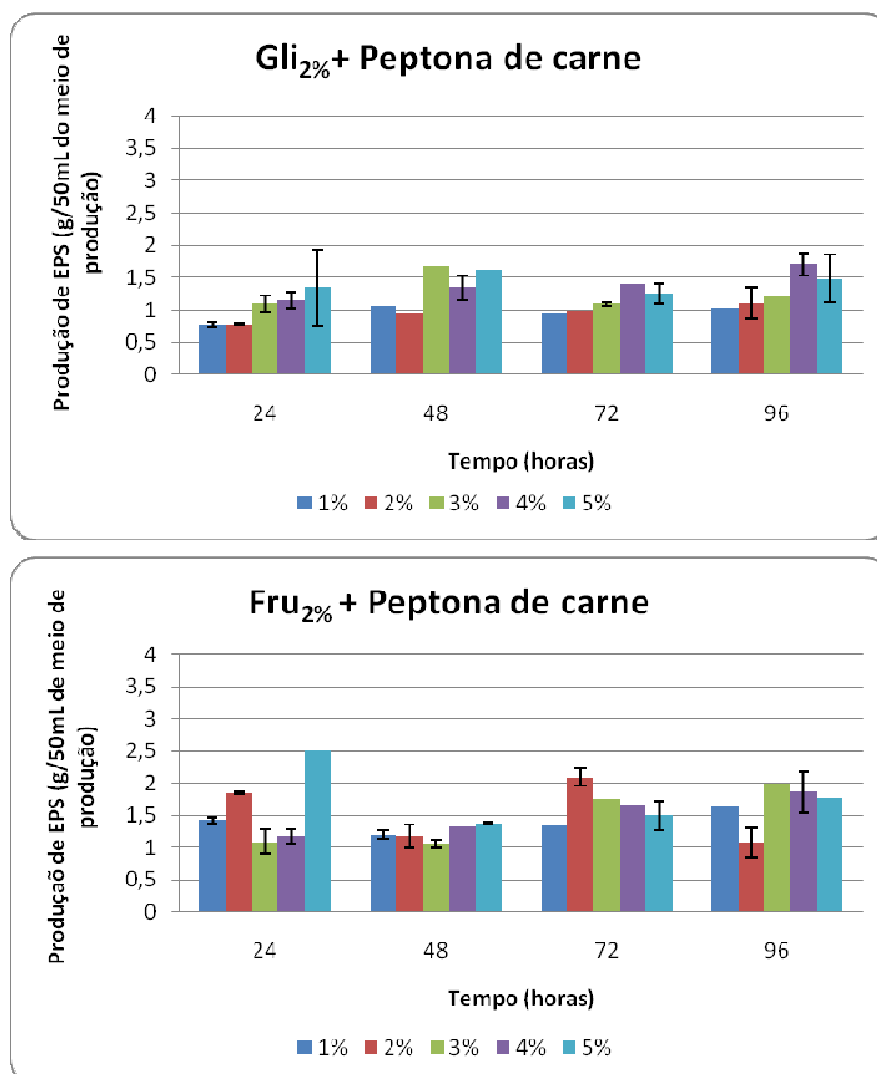


Figura 12. Produção EPS (g/50mL de meio de produção) por *Lactobacillus helveticus* em LDR 10% acrescido de diferentes concentrações de peptona de carne (1, 2, 3, 4 e 5%), em meio de produção contendo 2% de glicose e 2% de frutose, respectivamente, após 24, 48, 72 e 96 horas de fermentação a 37°C e 100 rpm. I = desvio padrão das três repetições de cada experimento. Fotos dos biopolímeros produzidos se encontram no Apêndice (Figura 23).

Tais resultados corroboram com alguns estudos que indicam a influência positiva da suplementação do meio de fermentação com peptonas, essas que favorecem tanto o crescimento microbiano quanto a síntese de EPS.

5.2.2.1 pH e viabilidade celular de *Lactobacillus helveticus*

O comportamento do pH pode ser observado na Figura 13. Nesta observam-se diferentes comportamentos daqueles observados nas fermentações sem adição de uma fonte de nitrogênio ao meio (Figura 6). Verifica-se que o pH diminuiu ao decorrer do tempo de fermentação, revelando a acidificação do meio pelo consumo dos nutrientes presentes e liberação de ácido láctico. Este comportamento pode ser facilmente visualizado nos experimentos com concentrações 1, 2, 3 e 4% de peptona de carne com frutose (Figura 13). Estudos revelam que o aumento da concentração de nitrogênio no meio favorece a produção de EPS, até certo ponto, e causa uma diminuição do pH no meio.

A contagem de células viáveis após a fermentação em meio contendo glicose não apresentou o mesmo comportamento para as cinco concentrações de peptona de carne (1, 2, 3, 4 e 5%), diferenciando-se já nas primeiras 24 horas de incubação. Para a fermentação com frutose o crescimento microbiano foi similar entre as concentrações de peptona, diminuindo o número de células ao longo do tempo de incubação empregado (Figura 6).

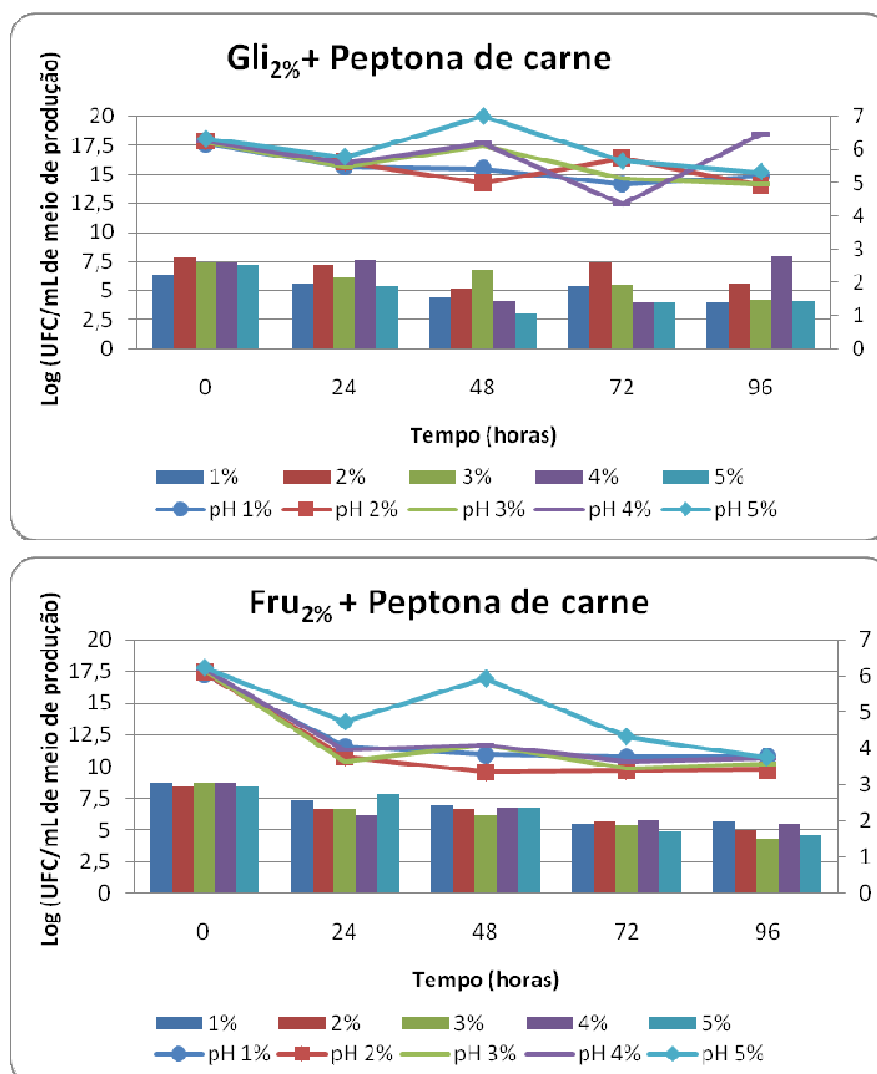


Figura 13. Comportamento do pH *versus* a enumeração de células viáveis de *Lactobacillus helveticus* em LDR 10% acrescido de diferentes concentrações de peptona de carne (1, 2, 3, 4 e 5%) em meio contendo 2% de glicose e 2% frutose, respectivamente, na produção de EPS por *Lactobacillus helveticus*, após 24, 48, 72 e 96 horas de fermentação a 37°C e 100 rpm.

5.2.2.2 Açúcares totais e açúcares redutores

A Figura 14 mostra a concentração de açúcares totais ao longo do tempo de incubação, onde pode-se observar que ocorre uma diminuição da concentração das fontes de carbono adicionadas das concentrações de peptona de carne, citadas no item anterior

(5.2.2.1), apresentando comportamentos parecidos podendo-se relacionar a uma maior produção de EPS, já que resultou em uma menor quantidade de açúcares totais no meio de fermentação.

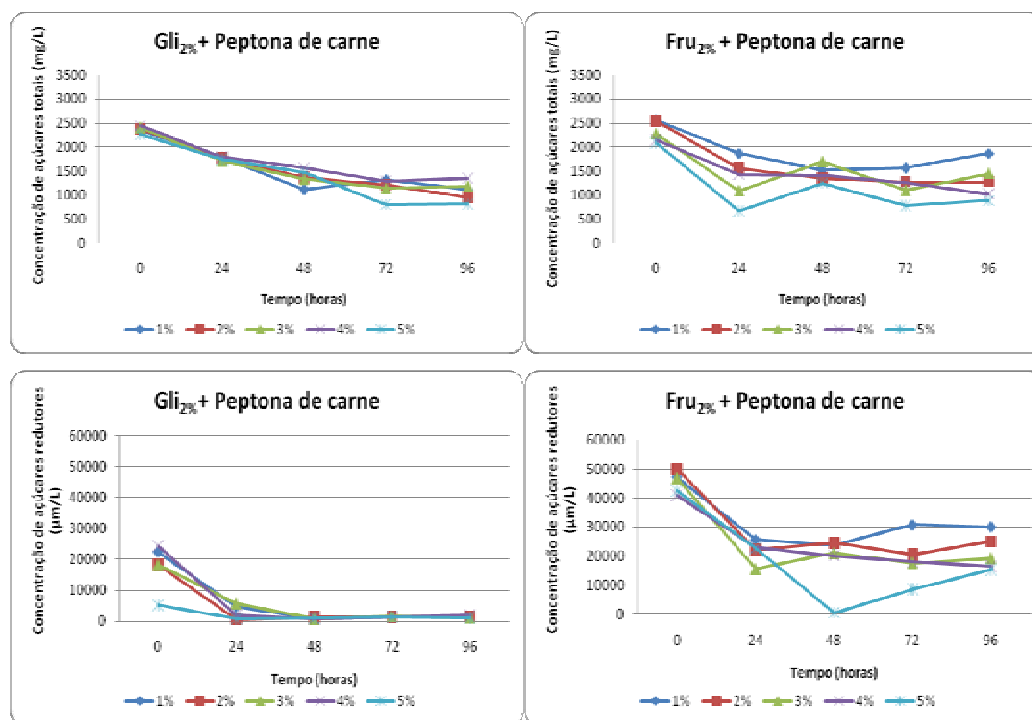


Figura 14. Concentração de açúcares totais e redutores resultantes em LDR 10% acrescido de diferentes concentrações de peptona de carne (1, 2, 3, 4 e 5%) em meio de produção contendo 2% de glicose e 2% de frutose, respectivamente, após 24, 48, 72 e 96 horas de fermentação a 37°C e 100 rpm, por *Lactobacillus helveticus*. O gráfico referente à determinação de açúcares redutores no meio de fermentação com glicose adicionada de peptona de carne se encontra melhor detalhado no Apêndice (Figura 24).

A determinação dos açúcares redutores também está expressa na Figura 14, onde pode ser observado que ao longo da fermentação o substrato disponível para a bactéria foi sendo consumido por ela. Assim como houve uma diminuição da concentração de açúcares totais a concentrações de açúcares redutores também diminuiu, já considerando que os açúcares redutores estão inseridos no total de açúcares do meio. Porém observa-se que nos experimentos utilizando frutose a quantidade de açúcares

reduzidores presentes é maior quando comparado com a glicose. Esta diferença encontra-se na faixa de 20000 µg/L entre os experimentos realizados. Em contrapartida, não foi verificada grandes diferenças na produção de EPS ao analisarem-se as fermentações com glicose e frutose adicionadas de diferentes concentrações de peptona de carne. Isto pode estar relacionado à aparência do precipitado, uma vez que foi difícil de secar e, portanto, o valor registrado pode ter sido maior (Figura 12).

5.2.3 Extrato de levedura

Quando o meio contendo glicose foi adicionado de extrato de levedura como fonte de nitrogênio, a produtividade foi similar para cada tempo de fermentação, exceto para 24 horas. Entretanto, este comportamento não foi observado para frutose (Figura 15).

Segundo estudos, extratos de levedura são vantajosos em relação a muitas peptonas purificadas como fonte de compostos nitrogenados, uma vez que também fornecem vitaminas e componentes de base de ácido nucléicos (AMRANE; PRIGENT, 1998; CHIARINI; MARA; TABACCHIONI, 1992).

Degeest; De Vuyst (1999) demonstraram que para *S. thermophilus* a mais alta produção de EPS (1,142 mg/L) ocorreu com uma concentração inicial de lactose igual a 7,5% e um complexo de nitrogênio de 4,2 g.L⁻¹ (3,0% de peptona e 1,2% de extrato de levedura). Em nosso trabalho, apesar de terem sido empregadas as fontes de nitrogênio separadamente uma da outra, a melhor produção ocorreu com 5 e 2% de peptona de carne e com 1 e 2% de extrato de levedura, utilizando-se glicose e frutose como fonte de carbono, respectivamente.

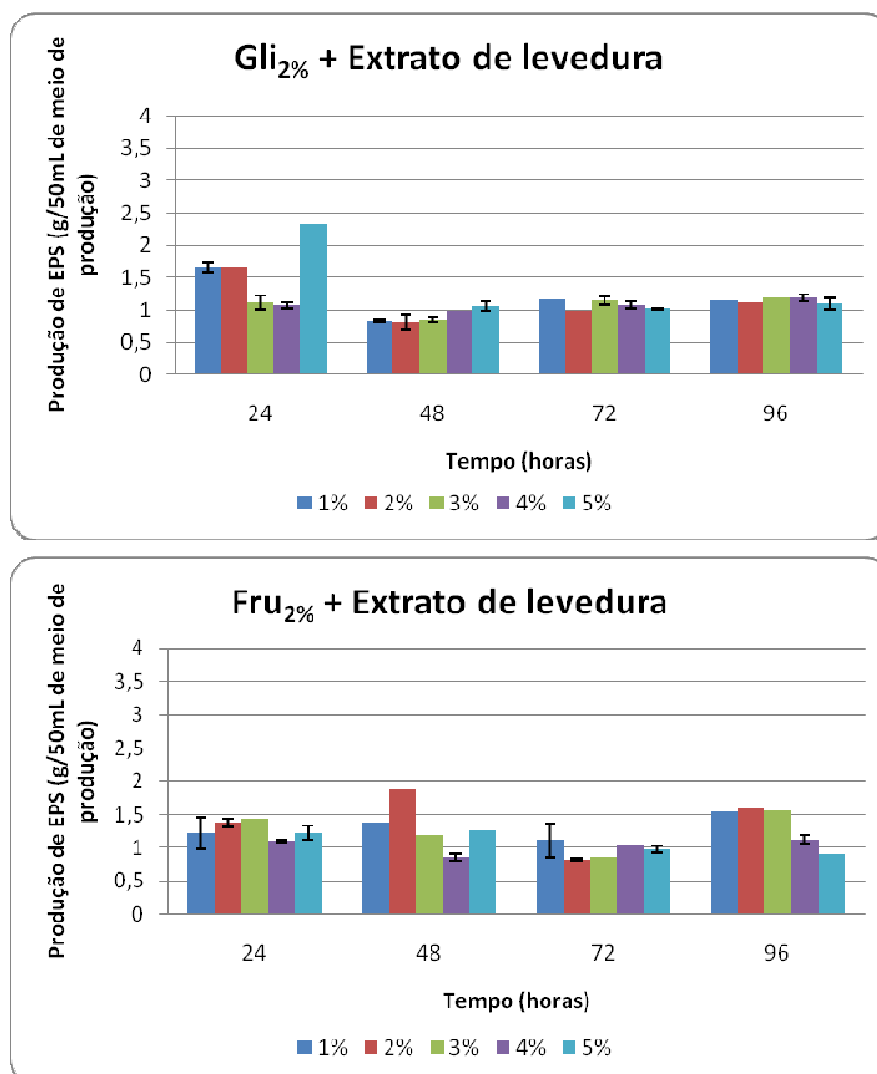


Figura 15. Produção EPS (g/50mL de meio de produção) por *Lactobacillus helveticus* em LDR 10% acrescido de diferentes concentrações de extrato de levedura (1, 2, 3, 4 e 5%), em meio de fermentação contendo 2% de glicose e 2% de frutose, respectivamente, após 24, 48, 72 e 96 horas de fermentação a 37°C e 100 rpm. I = desvio padrão das três repetições de cada experimento. Fotos dos biopolímeros produzidos se encontram no Apêndice (Figura 25 e 26).

5.2.3.1 pH e viabilidade celular de *Lactobacillus helveticus*

O comportamento do crescimento microbiano em relação às medidas de pH pode ser observado na Figura 16. Nesta observa-se uma diminuição do pH com o passar do

tempo de incubação, porém, mantendo-se constante após as 24 horas iniciais (Figura 16). Já as contagens de células diminuíram ao longo do tempo de incubação.

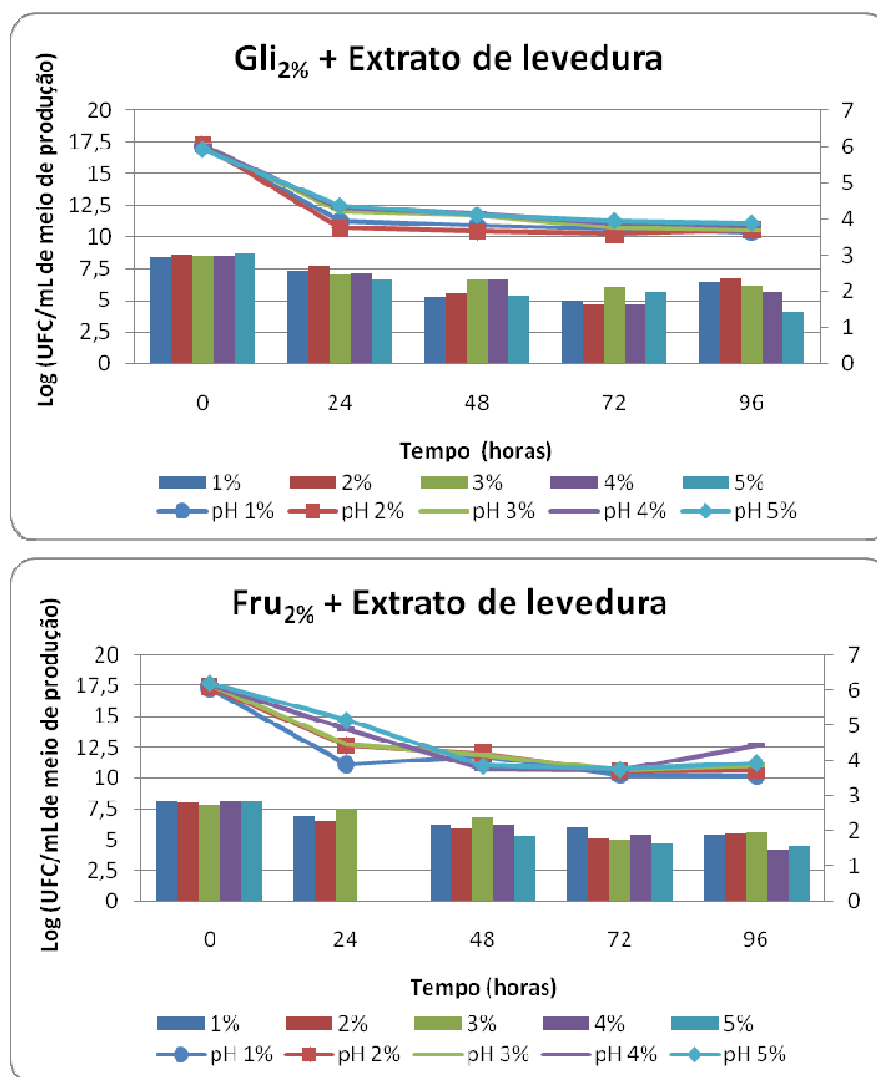


Figura 16. Comportamento do pH *versus* a enumeração de células viáveis de *Lactobacillus helveticus* em LDR 10% acrescido de diferentes concentrações de diferentes concentrações de extrato de levedura (1, 2, 3, 4 e 5%) em meio contendo 2% de glicose e 2% frutose, respectivamente, na produção de EPS por *Lactobacillus helveticus*, após 24, 48, 72 e 96 horas de fermentação a 37°C e 100 rpm.

Em um estudo foi observado que a suplementação do meio de fermentação com extrato de levedura (2 a 30 g.L⁻¹) comportou-se como um fator limitante ao crescimento microbiano, verificando-se que à medida que a concentração de extrato de levedura foi aumentada até 20 g.L⁻¹ o tempo de crescimento aumentou ligeiramente, indicando ser o suplemento de nitrogênio um fator decisivo para o crescimento e conseqüente síntese de EPS (AMRANE; PRIGENT, 1998).

5.2.3.2 Açúcares totais e açúcares redutores

Na Figura 17 pode-se observar o comportamento do consumo das fontes de carbono adicionadas de extrato de levedura. No meio com frutose e extrato de levedura ocorreram maiores determinações na quantidade de açúcares redutores nos últimos tempos de fermentação avaliados. Isto possivelmente se deve à presença de glico-hidrolases, responsáveis pela liberação de monômeros da cadeia do polímero produzido.

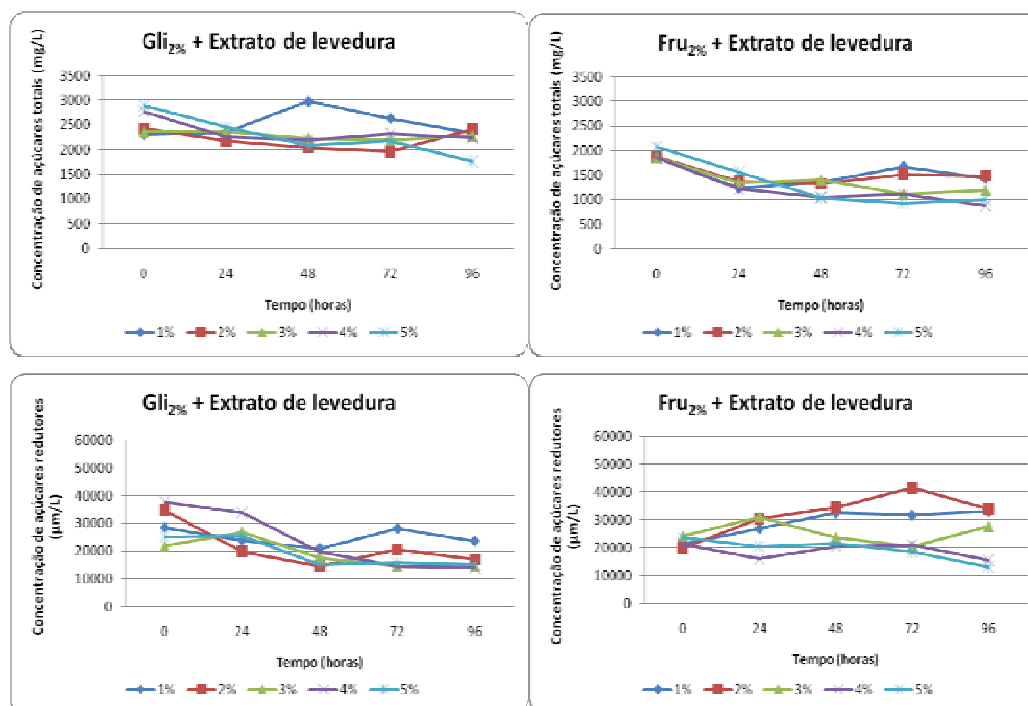


Figura 17. Concentração de açúcares totais e redutores resultantes em LDR 10% acrescido de diferentes concentrações de extrato de levedura (1, 2, 3, 4 e 5%) em meio de produção contendo 2% de glicose e 2% de frutose, respectivamente, após 24, 48, 72 e 96 horas de fermentação a 37°C e 100 rpm, por *Lactobacillus helveticus*.

6 CONCLUSÕES

— Das fontes de carbonos selecionadas e testadas nesta pesquisa, frutose favoreceu maiores quantidades de EPS por *Lactobacillus helveticus*, quando comparada à glicose, em todos os tempos de fermentação avaliados (24, 48, 72 e 96 horas).

— A produção máxima de EPS foi obtida pela fermentação em LDR 10% suplementado com 4% de frutose e após 72 horas de incubação, com valor igual a 1,23 g/50mL de meio de produção.

— A suplementação do meio de fermentação (LDR 10%) com glicose propiciou uma produtividade máxima de 0,59 g/50mL de meio de produção na concentração 2% e após 48 horas de incubação.

— Nas fermentações de LDR 10% contendo 2% de glicose ou 2% de frutose e acrescido da fonte de nitrogênio sulfato de amônio, a produção de EPS aumentou proporcionalmente ao aumento da concentração da fonte de nitrogênio.

— A quantidade máxima produzida foi de 3,63 para o meio contendo glicose e 4,25 g/50mL de meio de produção no meio contendo frutose, e com concentração 5% de sulfato de amônio para ambas.

— Nas fermentações em meio suplementado com peptona de carne e extrato de levedura as quantidades de EPS produzidas foram menores se comparadas com às do meio acrescido de sulfato de amônio.

— Peptona de carne utilizada como fonte de nitrogênio, nas concentrações 5 e 2%, com 2% glicose e 2% de frutose, respectivamente, foram consideradas as melhores.

— Extrato de levedura promoveu as melhores produções nas concentrações 1 e 2%, para 2% glicose e 2% de frutose, respectivamente.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Em trabalhos futuros envolvendo a produção de exopolissacarídeos por *Lactobacillus helveticus* sugere-se a avaliação da produção do biopolímero a partir da fermentação de meios acrescidos de misturas de diferentes fontes de nitrogênio, favorecendo-se com isso, elevadas produções de EPS.

A caracterização química do polímero produzido também é necessária, assim poderá ser confirmada a composição citada por alguns autores que tal polímero é composto por D-glicose e D-galactose.

A caracterização reológica do polímero produzido a partir do meio fermentado também somaria dados à pesquisa com *Lactobacillus helveticus* autóctone.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMRANE, A.; PRIGENT, Y. Influence of yeast extract concentration on batch cultures of *Lactobacillus helveticus*: growth and production coupling. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 14, p. 529-534. 1998.

ASLIM, B.; YUKSEKDAG, Z. N.; BEYATLI, Y.; MERCAN, N. Expolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* strains under different growth conditions. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 21: 673-677. 2005.

ARNAUD, A.; GIRAUD, J. P. Bioquímica microbiana. In: SCRIBAN, R. **Biotechnologia**. São Paulo: Mande, cap.2, p. 47-102, 1985.

BARROS, J. J. C. **Aptidões tecnológicas de *Lactobacillus helveticus* isolados de soro-fermento natural – perspectivas à manufatura do parmesão**. 2005. 47p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras. 2005.

BROADBENT, J. R.; MCMAHONA, D. J.; OBERGB, C. J.; WELKER, D. L. Use of exopolysaccharide-producing cultures to improve the functionality of low fat cheese. **International Dairy Journal**, v.11, p. 433-439, 2001.

CANDIOTI, M. C.; HYNES, E.; QUIBERONI, A.; PALMA, S. B.; SABBAG, N.; ZALAZAR, C. A. Reggianito Argentino cheese: influence of *Lactobacillus helveticus* strains isolated from natural whey cultures on cheese making and ripening processes. **Review Elsevier**, 2002.

CERNING, J. Production of exopolysaccharides by lactic acid bacteria and dairy propionibacteria. **Lait**, v.75, p.463-472, 1995.

CERNING, J.; BOUILLANNE, C.; LANDON, M.; DESMAZEAUD, M. J. Isolation and characterization of exopolysaccharides from slime-forming mesophilic lactic acid bacteria. **Journal of Dairy Science**, v.75, p. 692-699, 1992.

CERNING, J. Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 87, p.113-130, 1990.

CERNING J, BOUILLANNE M, DESMAZEAUD M, LANDON M. Exocellular polysaccharide production by *Streptococcus thermophilus*. **Biotechnology Lett**, v.10, p.255-260, 1988.

CHIARINI, L.; MARA, L.; TABACCHIONI, S. Influence of growth supplements on lactic acid production in whey ultrafiltrate by *Lactobacillus helveticus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 461-464. 1992.

COLTRO, A. L.; GARCIA-CRUZ, C. H. Exopolissacarídeos bacterianos: Produção e composição. **Higiene Alimentar**, v.112, p.38-45, 2006.

DEGEEST, B.; DE VUYST, L. Correlation of activities of the enzymes alpha-phosphoglucomutase UDP-galactose 4-epimerase, and UDP-glucose pyrophosphorylase with exopolysaccharide biosynthesis by *Streptococcus thermophilus* LY03. **Applied Environmental Microbiology**, v.66, p.3519-3527, 2000.

DEGEEST, B.; DE VUYST, L. Indication that the nitrogen source influences both amount and size of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* LY03 and modelling of the bacterial growth and exopolysaccharide production in a complex medium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 2863-2870. 1999.

DE VUYST, L.; DEGEEST, B. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v.23, p.153-177, 1999.

DE VUYST, L.; VANDERVEKEN, F.; VAN DE VEN, S.; DEGEEST, B. Production by and isolation of exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* grown in a milk medium and evidence for their grown-associated biosynthesis. **Journal of Applied Microbiology**, v.84, n.6, p.1059-1068, 1998.

DUBOC, P.; MOLLET, B. Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. **International Dairy Journal**, v.11, p.759-768, 2001.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERTS, P. A; SMITH, F. Colorimetric method for determination sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, p.350-356, 1956.

ERNANDES, F. M. P. G. **Produção de levana por *Bacillus subtilis* e *Zymomonas mobilis* utilizando três meios sintéticos e um alternativo (caldo de cana-de-açúcar)**. São José do Rio Preto, 2006. 93 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Campus de São José do Rio Preto, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. 2006.

FOLKENBERG, D. M.; DEJMEK, P.; SKRIVER, A.; GULDAGER, H. S.; IPSEN, R. Sensory and rheological screening of exopolysaccharide producing strains of bacterial yoghurt cultures. **International Dairy Journal**, v.16, p.111-118, 2006.

FORTINA, M. G.; NICASTRO, G.; CARMINATI, D. NEVIANI, E.; MANACHINI, P. L. *Lactobacillus helveticus* heterogeneity in natural cheese starters: the diversity in phenotypic characteristics. **Journal of Applied Microbiology**, v.84, p.72-80, 1998.

FURTADO, M. M. **Isolamento de bactérias lácticas de leite cru e soro de queijo de leite cru da região do Serro, Minas Gerais**. 1990. 95p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 1990.

FURTADO, M. M. **A arte e ciência do queijo**. 2 ed. São Paulo: Globo, 1990a. 297p.

GAMAR, L.; BLONDEAN, K.; SIMONET, J. M. Physiological approach to extracellular polysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* strain C83. **Journal of Applied Microbiology**, v.83, p.281-287, 1997.

- GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V. E.; CASAS, J. A.; GÓMEZ, E. Xanthan gum: production, recovery, and properties. **Biotechnology Advances**, v. 18, n. 7, p. 549-579. 2000.
- GARRITY, G. M.; BELL, J. A.; LILBURN, T. The Revised Road Map to the Manual. In: Brenner, Krieg, Staley and Garrity (ed.), **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2 ed., vol. 2, The Proteobacteria, Part A, Introductory Essays. New York: Springer, 2005. p. 159-220.
- GASSEM, M. A.; SCHMIDT, K. A.; FRANK, J. F. Exopolysaccharide production from whey lactose by fermentation with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. **Journal of Food Science**, v.62, p.171-173, 1997.
- GASSEM, M. A.; SCHMIDT, K. A.; FRANK, J. F. Exopolysaccharide production in different media by lactic acid bacteria. **Cultured Dairy Products Journal**, v.30, p.18-21, 1995.
- GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, v.125, p.1401-1412, 1995.
- HASSAN, A. N.; FRANK, J. F.; CORREDIG, M. Microstructure of feta cheese made using different cultures as determined by confocal scanning laser microscopy. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 7, p. 2725-2753, 2002.
- HASSAN, A. N.; FRANK, J. F.; FARMER, M. A.; SCHMIDT, K. A.; SHALABI, S. I. Formation of yogurt microstructure and three-dimensional visualization as determined by confocal scanning laser microscopy. **Journal of Dairy Science**, v. 78, p. 2629-2636, 1995.
- HÉBERT, E. M.; RAYA, R. R.; TAILLIEZ, P.; GIORI, G. R. Characterization of natural isolates of *Lactobacillus* strains to be used as starter cultures in dairy fermentations. **International Journal of Food Microbiology**, v.59, p.19-27, 2000.
- KARASOVÁ, P.; SPIWOK, V.; MALA, S.; KRÁLOVA, B.; RUSSEL, N. Beta-galactosidase activity in psychotrophic microorganisms and their potential use in food industry. **Czech Journal Food Science**, v. 20, n. 2, p. 43-47, 2002.
- KENNY, O.; FITZGERALD, R. J.; O'CUINN, G.; BERESFORD, T.; JORDAN, K. Growth phase and growth medium effects on the peptides activities of *Lactobacillus helveticus*. **International Dairy Journal**, v. 13, n. 7, p. 509-516, 2003.
- KIMMEL, S. A.; ROBERTS, R. F.; ZIEGLER, G. R. Optimization of exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* RR grown in a semidefined medium. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.659-664, 1998.
- KOKSOY, A.; KILIC, M. Use of hydrocolloids in textural stabilization of a yoghurt drink, ayran. **Food Hydrocolloids**, v.18, p.593-600, 2004.

- KUMAR, A. S.; MODY, K.; JHA, B. Bacterial exopolysaccharides – a perception. **Journal of Basic Microbiology**, v.47, p.103-117, 2007.
- LIN, T. Y.; CHANG CHIEN, M. F. Exopolysaccharides production as affected by lactic acid bacteria and fermentation time. **Food Chemistry**, v.100, p.1419-1423, 2007.
- LOOIJESTEIJN, P. J.; HUGENHOLTZ, J. Uncoupling of growth and exopolysaccharide production by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NIZO B40 and optimization of its synthesis. **Journal Bioscience Bioengineering**, v. 88, p. 178–182, 1999.
- LOOIJESTEIJN, P. J.; BOELS, I. C.; KLEEREBEZEM, M.; HUGENHOLTZ, J. Regulation of exopolysaccharide production by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* by the sugar source. **Applied Environmental Microbiology**, v.6, p.5003-5008, 1999.
- LOOIJESTEIJN, E.; HUGENHOLTZ, J.; SMITH, M. R. Physiology of exopolysaccharide (EPS) production by *Lactococcus lactis*. **Texture of fermented milk products and dairy desserts**, Vicenza, Itália, Maio 5-6, 1998.
- LOW, D.; AHLGREN, J. A.; HORNE, D.; MCMAHON, D. J.; OBERG, C. J.; BROADBENT, J. R. Role of *Streptococcus thermophilus* MR- 1C capsular exopolysaccharide in cheese moisture retention. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.2147-2151, 1998.
- LUCEY, J. A.; TAMEHANA, M.; SINGH, H.; MUNRO, P. A. Stability of model acid milk beverage: effect of pectin concentration, storage temperature and milk heat treatment. **Journal of Texture Studies**, n.3, v.30, p.305-318, 1999.
- MACEDO, M. G.; LACROIX, C.; GARDNER, N. J.; CHAMPAGNE, C. P. Effect of medium supplementation on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M in whey permeate. **International Dairy Journal**, v.12, p.419-426, 2002.
- MACURA, D.; TOWNSLEY, P. M. Scandinavian ropy milk: Identification and characterization of endogenous ropy lactic streptococci and their extracellular excretion. **Journal of Dairy Science**, v.67, p.735-744, 1984.
- MAN, J. C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M. A medium for the cultivation of lactobacilli. **Journal of Applied Bacteriology**, v.23, n.2, p. 130-135, 1960.
- MARSHALL, V. M.; RAWSON, H. L. Effects of exopolysaccharide-producing strains of thermophilic lactic acid bacteria on the texture of stirred yoghurt. **International Journal of Food Science and Technology**, v.34, p.137-143, 1999.
- MARSHALL, V. M.; COWIE, E. N.; MORETON, R. S. Analysis and production of two exopolysaccharides from *Lactobacillus lactis* subsp. *cremoris* LC330. **Journal of Dairy Research**, v.62, p.621-628, 1995.
- MARTINS, L. O.; BRITO, L. C.; SÁ-CORREIA, I. Roles of Mn^{2+} , Mg^{2+} and Ca^{2+} on alginate biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa*. **Enzyme Microbial Technology**, v.12, p.794-799, 1990.

MOZZI, F., OLIVER, G., SAVOY DE GIORI, G. S., FONT DE VALDEZ, G. F. Influence of temperature on the production of exopolysaccharides by thermophilic lactic acid bacteria. **Milchwissenschaft**, v.50, p.80-82, 1995.

NELSON, N. A photometric adaptation of Somogyi method for determination of glucose. **Biochemistry**, v.153, p.375-380, 1944.

PERRY, D. B.; MCMAHON, D. J.; OBERG, C. J. Manufacture of low fat mozzarella cheese using exopolysaccharide-producing starter cultures. **Journal of Dairy Science**, v.81, p.563-566, 1998.

PERRY, D. B.; MCMAHON, D. J.; OBERG, C. J. Effect of exopolysaccharide producing cultures on moisture retention in low-fat mozzarella cheese. **Journal of Dairy Science**, v.80, p.799-805, 1997.

PETRY, S.; FURLAN, S.; CREPEAU, M. J.; CERNING, J.; DESMAZEAUD, M. Factors affecting exocellular polysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* grown in a chemically defined medium. **Applied Environmental Microbiology**, v.66, p.3427- 3431, 2000.

RAWSON, H. L.; MARSHALL, V. M. Effect of 'ropy' strain of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* on rheology of stirred yogurt. **International Journal of Food Science and Technology**, v.32, p.213-220, 1997.

ROBIJN, G. W.; THOMAS, J. R.; HAAS, H.; VAN DER BERG, D. J. C.; KAMERLING, J. P.; Vliegenthart, J. F. G. The structure of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus helveticus* 766. **Carbohydrate Research**, v.276, v.1, p.137-154, 1995.

ROSSI, D. A. **Isolamento, identificação e caracterização da biodiversidade de *Lactobacillus helveticus* isolados de soro-fermento de laticínios brasileiros**. 2001. 99p. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras. 2001.

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.

SÁNCHEZ, J. I.; MARTÍNEZ, B.; GUILLÉN, R.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R.; RODRÍGUEZ, A. Culture conditions determine the balance between two different exopolysaccharides produced by *Lactobacillus pentosus* LPS26. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 12, p. 7495–7502. 2006.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. São Paulo: Varela: 3 ed., 2007. 544p.

SNEATH, P. H. A.; MAIR, N. S.; SHARP, M. E.; HOLT, J. G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Willians & Wilkins, v.2, 1986. 787p.

STAAF, M.; YANG, Z.; HUTTUNEN, E.; WIDMALM, G. Structural elucidation of the viscous exopolysaccharide produced by *Lactobacillus helveticus* Lb161. **Carbohydrate Research**, v.326, n.2, p.113-119, 2000.

STAAF, M.; WIDMALM, G.; YANG, Z.; HUTTUNEN, E. Structural elucidation of an extracellular polysaccharide produced by *Lactobacillus helveticus*. **Carbohydrate Research**, v.291, p.155-164, 1996.

STINGELE, F.; LEMOINE, J.; NEESER, J. R. *Lactobacillus helveticus* Lh59 secretes an exopolysaccharide that is identical to the one produced by *Lactobacillus helveticus* TN-4, a presumed spontaneous mutant of *Lactobacillus helveticus* TY1-2. **Carbohydrate Research**, v.302, n.4, p.197-202, 1997.

SOMOGYI, M. notes on sugar determination. **Journal of Biological Chemistry**, v.195, p.19, 1952.

SUTHERLAND, I. W. Bacterial exopolysaccharides. **Advances in Microbiology and Physiology**, v.8, p.143-213, 1972.

TORINO, M. I.; TARANTO, M. P.; SESMA, F.; FONT DE VALDEZ, G. Heterofermentative pattern and exopolysaccharide production by *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807 in response to environmental pH. **Journal of Applied Microbiology**, v.91, p.1-7, 2001.

TORINO, M. I.; MOZZI, F.; FONT DE VALDEZ, G. Exopolysaccharide biosynthesis by *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.68, p.259-265, 2005.

TORINO, M. I.; MOZZI, F.; SESMA, F.; FONT DE VALDEZ, G. Effect of stirring on growth and phosphopolysaccharide production by *Lactobacillus helveticus* ATCC15807 in milk. **Milchwissenschaft**, v.55, p. 204-206, 2000.

TORRIANI, S.; VESCOVO, M.; SCOLARI, G. An overview on *Lactobacillus helveticus*. **Annali di Microbiologia ed Enzymologia**, v.44, p. 163-191, 1994.

TOWLER, C. Sedimentation in a cultured milk beverage. **New Zealand Journal of Dairy Science and Technology**, n.3, v.19, p.205-211, 1984.

VLAHOPOULOU, I.; BELL, A. E.; WILBEY, R. A. Effects of starter culture and its exopolysaccharides on the gelation of glucono-d-lactone bovine and caprine milk. **International Journal of Dairy Technology**, v.54, p.135-140, 2001.

YAMAMOTO, Y.; NUNOME, T.; YAMAUCHI, R.; KATO, K.; SONE, Y. Structure of an exocellular polysaccharide of *Lactobacillus helveticus* TN-4, a spontaneous mutant strain of *Lactobacillus helveticus* TY1-2. **Carbohydrate Research**, v.275, n.2, p.319-332, 1995.

YAMAMOTO, Y.; MUROSALD, S.; YAMAUCHI, R.; KATO, K.; SONE Y. Structural study on an exocellular polysaccharide produced by *Lactobacillus helveticus* TY1-2. **Carbohydrate Research**, v.261, n.1, p.67-78, 1994.

YANG, Z.; STAAF, M.; HUTTUNEN, E.; WIDMALM, G. Structure of a viscous exopolysaccharide produced by *Lactobacillus helveticus* K16. **Carbohydrate Research**, v.329, n.2, p.465-469, 2000.

YANG, Z.; HUTTUNEN, E.; STAAF, M. WIDMALM, G.; TENHU, H. Separation, purification and characterisation of extracellular polysaccharides produced by slime-forming *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* strains. **International Dairy Journal**, v.9, p.631-638, 1999.

APÊNDICES

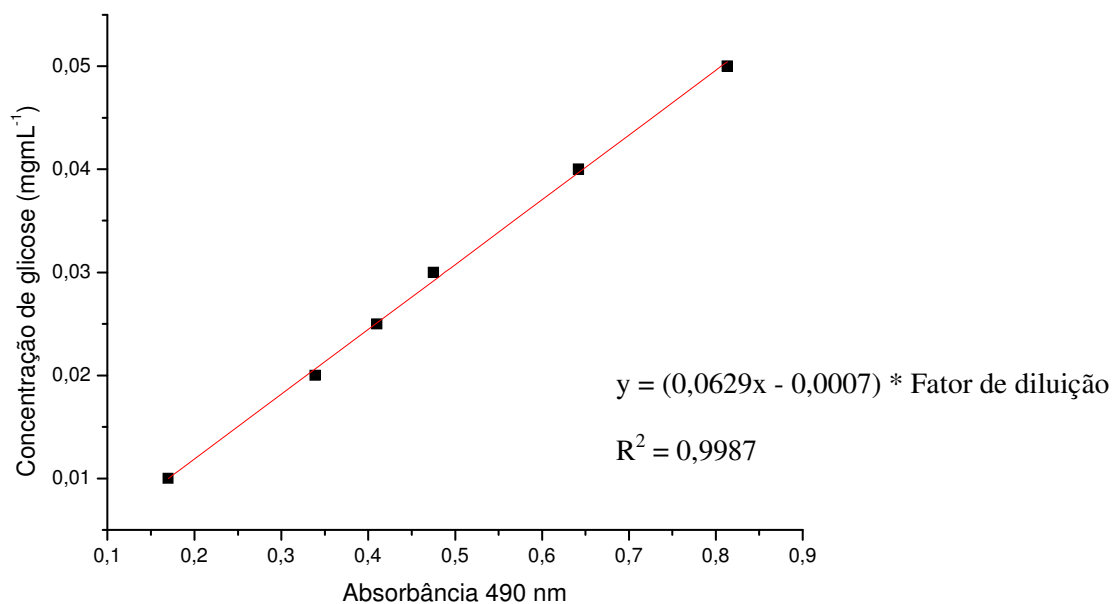


Figura 18. Curva de calibração para determinação de açúcares totais pelo método descrito por Dubois e colaboradores (1956).

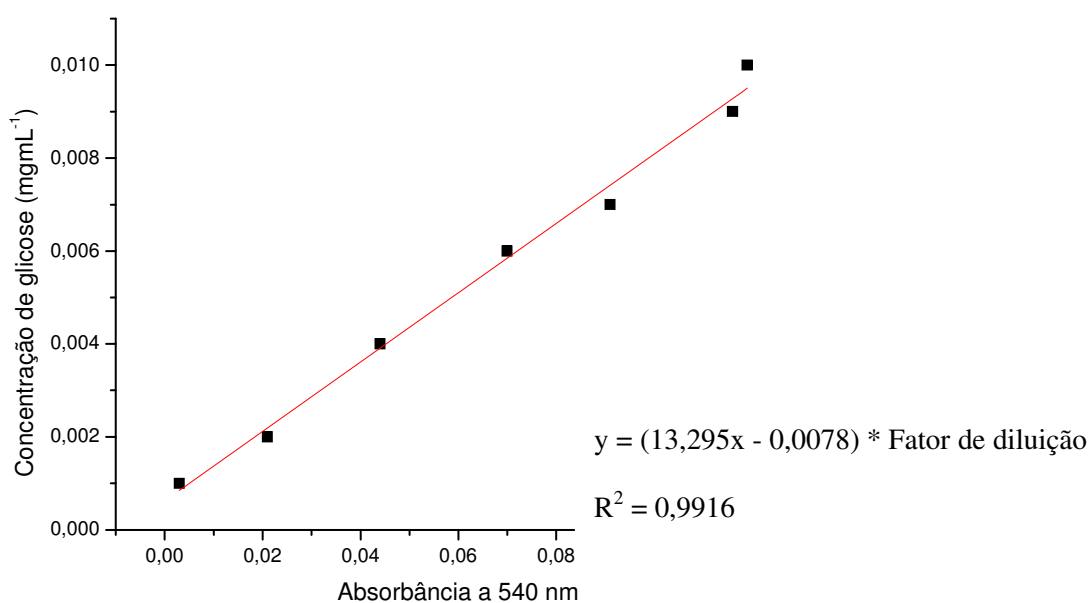


Figura 19. Curva de calibração para determinação de açúcares redutores pelo método de Somogyi (1952) e Nelson (1944).

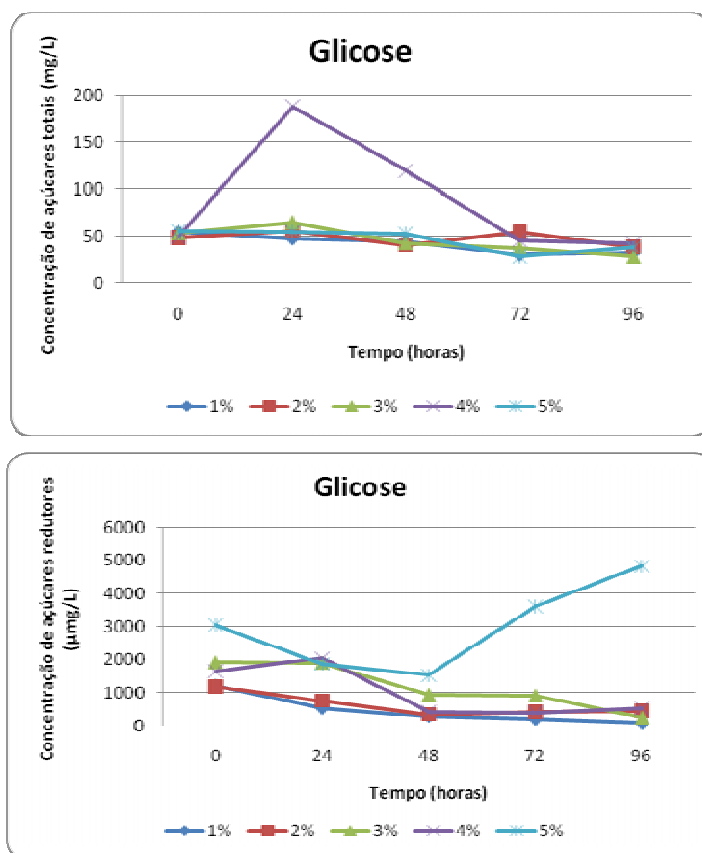


Figura 20. Concentração de açúcares totais e redutores resultantes em LDR 10% acrescido de diferentes concentrações de glicose (1, 2, 3, 4 e 5%), por 24, 48, 72 e 96 horas de fermentação a 37°C e 100 rpm, por *Lactobacillus helveticus*.



Figura 21. Exopolissacarídeos produzidos por *Lactobacillus helveticus* em LDR 10% acrescido de 2% de glicose e 2% de sulfato de amônio, após 48 horas de incubação a 37°C e 100 rpm.

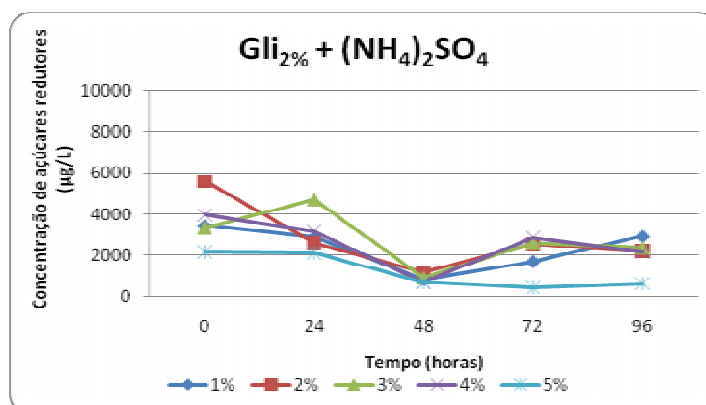


Figura 22. Concentração de açúcares redutores resultantes em LDR 10% acrescido de diferentes concentrações de sulfato de amônio (1, 2, 3, 4 e 5%) em meio de produção contendo 2% de glicose, após 24, 48, 72 e 96 horas de fermentação a 37°C e 100 rpm, por *Lactobacillus helveticus*.



Figura 23. Exopolissacarídeos produzidos por *Lactobacillus helveticus* em LDR 10% acrescido de 2% de glicose e 4% de peptona de carne, após 24 horas de incubação a 37°C e 100 rpm, e após a secagem e posterior rehidratação.

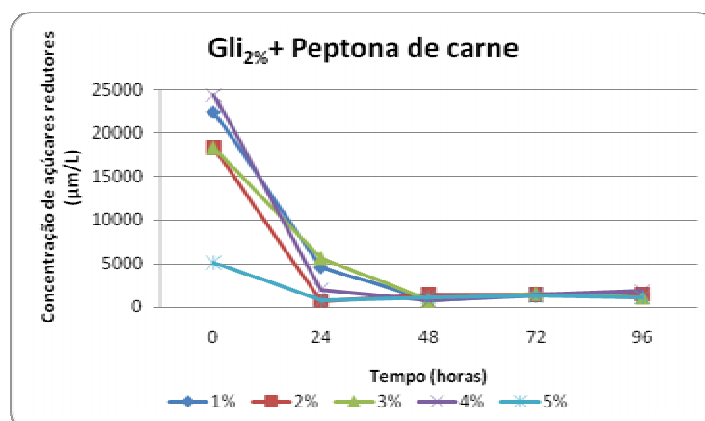


Figura 24. Concentração de açúcares redutores resultantes em LDR 10% acrescido de diferentes concentrações de peptona de carne (1, 2, 3, 4 e 5%) em meio de produção contendo 2% de glicose, após 24, 48, 72 e 96 horas de fermentação a 37°C e 100 rpm, por *Lactobacillus helveticus*.



Figura 25. Exopolissacarídeos produzidos por *Lactobacillus helveticus* em LDR 10% acrescido de 2% de frutose e extrato de levedura, a 37°C e 100 rpm, e após precipitação com álcool anidro (4°C).



Figura 26. Exopolissacarídeos produzidos por *Lactobacillus helveticus* em LDR 10% acrescido de 2% de glicose e extrato de levedura, a 37°C e 100 rpm, e após a secagem e posterior rehidratação.