

# BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁCTICAS PROVENIENTES DE KEFIR: PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS E PERFIL FERMENTATIVO

CAROLINE KRAUSE BIERHALS<sup>1</sup>; MARIA FERNANDA FERNANDES SIQUEIRA<sup>2</sup>; SILVANA SIGALI<sup>3</sup>; PEDRO FERNANDES VIANA<sup>4</sup>; GRACIELA VÖLZ LOPES<sup>5</sup>; ÂNGELA MARIA FIORENTINI<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [carolinekbierhals@gmail.com](mailto:carolinekbierhals@gmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – [maria.fernanda.fs97@gmail.com](mailto:maria.fernanda.fs97@gmail.com)

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – [silvanasilgali@gmail.com](mailto:silvanasilgali@gmail.com)

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – [fernandes199921@gmail.com](mailto:fernandes199921@gmail.com)

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – [gracielaavlupes@yahoo.com.br](mailto:gracielaavlupes@yahoo.com.br)

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas – [angefiore@gmail.com](mailto:angefiore@gmail.com)

## 1. INTRODUÇÃO

O kefir é uma bebida obtida através da fermentação do leite por um complexo grupo de microrganismos, como leveduras, bactérias acéticas e bactérias ácido-láticas (BAL) (KIM et al., 2019). As BAL são bactérias Gram-positivas, catalase negativa e geralmente reconhecidas como GRAS (*Generally Recognized As Safe*), devido a sua ampla e segura aplicação em alimentos (YOU et al., 2020).

Durante o processo fermentativo, as BAL produzem ácido láctico como principal metabólito, além de outros ácidos orgânicos e também ácidos graxos, bacteriocinas e exopolissacarídeos (EPS) (LYNCH et al., 2018).

Os EPS são compostos de interesse para a indústria de alimentos, pois podem ser utilizados como viscosificantes, estabilizantes, agentes emulsificantes ou gelificantes. A sua aplicação visa alterar e melhorar características sensoriais dos alimentos, como aparência, textura e propriedades reológicas. Quando consumidos, podem oferecer benefícios à saúde do consumidor, atuando como imunoestimulante e apresentando efeitos antitumorais (CAGGIANIELLO; KLEEREBEZEM; SPANO, 2016; KODALI; DAS; SEN, 2009; PATEL et al., 2010; POLAK-BERECKA et al., 2013).

Levando em consideração que, o rendimento e a composição do EPS sintetizado por BAL depende da fonte de carbono presente no meio, o perfil fermentativo é um teste tecnológico importante, pois avalia a expressão de enzimas do isolado em potencial (OLEKSY-SOBCZAK; KLEWICKA, 2020).

O objetivo do estudo foi avaliar as características tecnológicas de isolados de BAL quanto à produção de exopolissacarídeos, bem como o seu perfil fermentativo, visando sua futura aplicação no desenvolvimento de alimentos fermentados com propriedades reológicas e sensoriais melhoradas.

## 2. METODOLOGIA

Os isolados foram obtidos através de 5 amostras de kefir provenientes de diferentes cidades da região Sul do Rio Grande do Sul. Neste estudo, após comprovação de segurança microbiológica, foram testados 15 isolados para produção de EPS e, somente aqueles que apresentaram resultado positivo, foram testados para o perfil fermentativo, o que corresponde a 8 isolados.

A capacidade de produção de EPS pelos isolados foi verificada através do teste utilizando o meio CRA (*Congo Red Agar*), preparado com caldo BHI 37 g/L, sacarose 50 g/L, ágar 10 g/L e indicador vermelho congo 8 g/L. Os isolados foram estriados em meio CRA e incubados a 37 °C por 24 h. Como controle positivo e negativo foram utilizados *S. aureus* ATCC 25923 e *S. epidermidis* ATCC 12228,

respectivamente. Para a leitura dos resultados, as colônias negras com uma consistência seca e cristalina indicavam que o isolado apresentava capacidade produtora de EPS (FREEMAN; FALKINER; KEANE, 1989).

O perfil fermentativo foi realizado utilizando meio de cultura base com adição do carboidrato testado (Glicose, sacarose, galactose, maltose, manose e frutose) em uma concentração de 10% e acrescido de um indicador de pH (púrpura de bromocresol). Os isolados foram estriados nas placas suplementadas que, após, foram incubadas a 37 °C durante 24h-48h. A leitura do resultado foi verificada pela mudança de coloração para amarelo, indicando resultado positivo ou coloração vermelho-rosada, indicando resultado negativo (LIMA et al., 2009).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

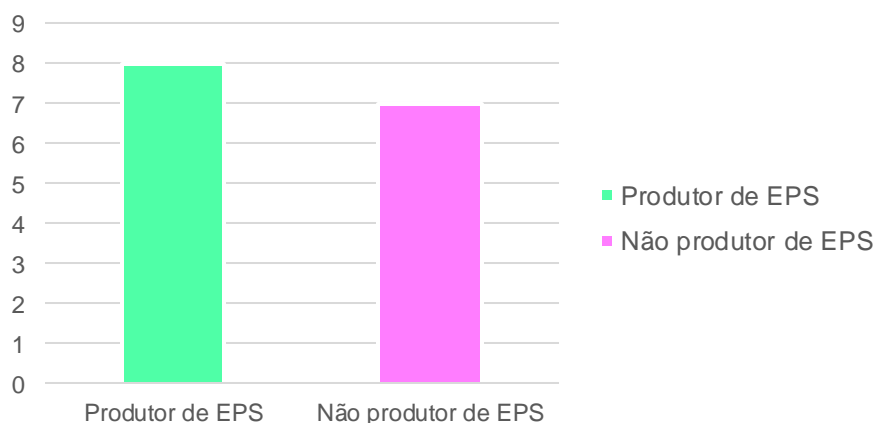
Nas últimas décadas, poucos EPS bacterianos relevantes foram identificados para aplicações industriais e comerciais, entre eles estão a celulose e a xantana. Embora os polissacarídeos de origem vegetal continuem a dominar o mercado global de EPS, a busca por novos polissacarídeos ou fontes alternativas é necessária, pois estes metabólitos podem ser usados em produtos de alto valor, como alimentos, produtos farmacêuticos, medicamentos e cosméticos (VOSOUGH et al., 2022).

Na produção de alimentos, os EPS podem influenciar, positivamente, nas características reológicas e sensoriais de produtos fermentados, devido à sua capacidade de se ligar à água e reter a umidade do alimento (MENDE; ROHM; JAROS, 2016). Sendo assim, a produção deste metabólito por BAL é uma característica importante para uma futura aplicação destes isolados no desenvolvimento de alimentos fermentados com propriedades tecnológicas melhoradas.

De acordo com You et al. (2020), existem cerca de 30 espécies de BAL relatadas na literatura como produtoras de EPS, dentre elas estão *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. helveticus*, *L. lactis* e *S. thermophilus*. Além de cepas isoladas de kefir como *L. paracasei*, *L. kefirgranum*, *L. kefiranofaciens* e *L. parakefir*.

Na figura 1, são apresentados os resultados do teste de produção de EPS, onde 8 isolados provenientes de kefir foram capazes de produzir EPS, o que corresponde a um percentual de 53%. Este resultado corrobora com o estudo de Vosough et al. (2022), que, avaliaram a produção de EPS de 143 isolados de Kishk e obtiveram resultado positivo para 55,2% dos isolados testados.

**Figura 1** - Produção de Exopolissacarídeos (EPS) por isolados de bactérias ácido-láticas provenientes de amostras de kefir

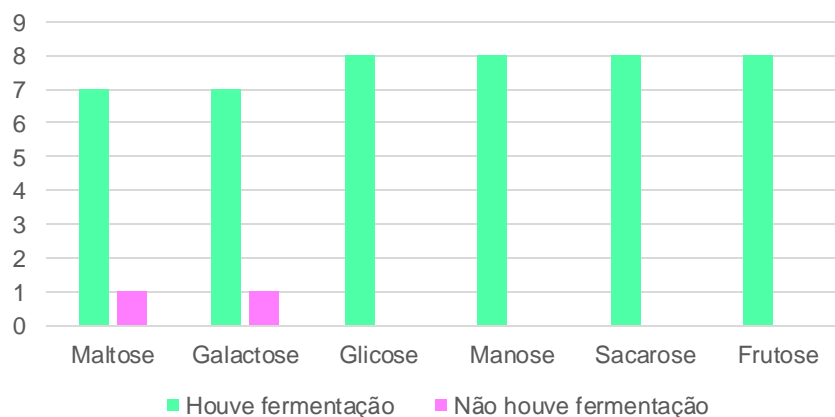


Sabe-se que os principais determinantes para a síntese de EPS são as condições de cultivo. A composição do meio de crescimento, temperatura e pH podem influenciar, diretamente, no rendimento e composição química destes metabólitos. As BAL podem produzir EPS com estruturas amplamente variadas, dependendo da cepa, bem como da fonte de carbono utilizada no meio (VUYST; DEGEEST, 1999; RUAS-MADIEDO; SALAZAR; CLARA, 2009). Portanto, se torna extremamente necessário, o conhecimento sobre o perfil fermentativo destes isolados em potencial que, futuramente, poderão ser aplicados na produção de alimentos.

No presente estudo, somente um isolado não foi capaz de fermentar todos os carboidratos suplementados, individualmente, no meio. Enquanto que, os demais isolados foram capazes de utilizar, como fonte de energia, todos os carboidratos testados, conforme mostra a Figura 2.

Oleksy-Sobczak; Klewicka (2020), avaliaram o perfil fermentativo de três isolados de BAL, e obtiveram resultado positivo para todos os isolados testados, utilizando como fonte de carbono glicose, maltose, galactose, lactose, frutose e sacarose.

**Figura 2** – Perfil fermentativo, em relação aos carboidratos avaliados, de isolados de bactérias ácido-láticas provenientes de diferentes amostras de kefir



#### 4. CONCLUSÕES

Em síntese, 53% (8/15) dos isolados foram capazes de produzir EPS e 87,5% (7/8) foram capazes de fermentar todos os carboidratos suplementados, individualmente, no meio de cultivo. Portanto, os isolados de BAL provenientes de kefir apresentaram resultados satisfatórios nos testes tecnológicos realizados neste estudo. Posteriormente, estes isolados serão identificados através do sequenciamento do gene 16S do rRNA e, submetidos à otimização da sua produção de EPS, através de alterações nas condições de cultivo, a fim de aumentar a produção deste metabólito, possibilitando que seus benefícios sejam maximizados.

Agradecimentos: Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CAGGIANIELLO, G.; KLEEREBEZEM, M.; SPANO, G. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: From health-promoting benefits to stress tolerance mechanisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 9, p. 3877–3886, 2016.
- FREEMAN, D. J.; FALKINER, F. R.; KEANE, C. T. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. **Journal of clinical pathology**, v. 42, n. 8, p. 872-874, 1989.
- KIM, D.; JEONG, D.; KANG, I.; LIM, H.; CHO, Y.; SEO, K. Modulation of the intestinal microbiota of dogs by kefir as a functional dairy product. **Journal of Dairy Science**, South Korea, v. 102, n. 5, p. 3903–3911, 2019.
- KODALI, V. P.; DAS, S.; SEN, R. An exopolysaccharide from a probiotic: Biosynthesis dynamics, composition and emulsifying activity. **Food Research International**, v. 42, n. 5–6, p. 695–699, 2009.
- LIMA, K. G. C.; KRUGER, M. F.; BEHRENS, J.; DESTRO, M. T.; LANDGRAF, M.; GOMBOSSY DE MELO FRANCO, B. D. Evaluation of culture media for enumeration of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium animalis* in the presence of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, n. 2, p. 491-495, 2009.
- LYNCH, K. M.; ZANNINI, E.; COFFEY, A.; ARENDT, E. K. Lactic Acid Bacteria Exopolysaccharides in Foods and Beverages: Isolation, Properties, Characterization, and Health Benefits. **Annual Review of Food Science and Technology**, Ireland, v. 9, n. 1, p. 155–176, 2018.
- MENDE, S.; ROHM, H.; JAROS, D. Influence of exopolysaccharides on the structure, texture, stability and sensory properties of yoghurt and related products. **International Dairy Journal**, Germany, v. 52, p. 57–71, 2016.
- OLEKSY-SOBCZAK, M.; KLEWICKA, E. Optimization of Media Composition to Maximize the Yield of Exopolysaccharides Production by *Lactobacillus rhamnosus* Strains. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 12, p. 774-783, 2020.
- POLAK-BERECKA, M.; WAŚKO, A.; SKRZYPEK, H.; KREFT, A. Production of exopolysaccharides by a probiotic strain of *Lactobacillus rhamnosus*: Biosynthesis and purification methods. **Acta Alimentaria**, v. 42, n. 2, p. 220–228, 2013.
- RUAS-MADIEDO, P.; SALAZAR, N.; CLARA, G. Biosynthesis and chemical composition of exopolysaccharides. **See Ullrich**, p. 279, 2009.
- VOSOUGH, P. R.; DOVOM, M. R. E.; NAJAF, M. B. H.; JAVADMANESH, A.; MAYO, B. Biodiversity of exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria from Iranian traditional Kishk and optimization of EPS yield by *Enterococcus* spp. **Food Bioscience**, v. 49, p. 101869, 2022.
- VUYST, L.; DEGEEST, B. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 23, n. 2, p. 153–77, 1999.
- YOU, X.; YANG, L.; ZHAO, X.; MA, K.; CHEN, X.; ZHANG, C.; WANG, G.; DONG, M.; RUI, X.; ZHANG, Q.; LI, W. Isolation, purification, characterization and immunostimulatory activity of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus pentosus* LZ-R-17 isolated from Tibetan kefir. **International Journal of Biological Macromolecules**, China, v. 158, p. 408–419, 2020.