

## PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS EM UMA BEBIDA LÁCTEA FERMENTADA DE AVEIA

SILVANA DE SOUZA SIGALI<sup>1</sup>; MARIA FERNANDA FERNANDES SIQUEIRA<sup>2</sup>;  
JOICE DA SILVA RAMSON<sup>3</sup>; KAROLINE MOREIRA MARQUES<sup>4</sup>; GRACIELA  
VOLZ LOPES<sup>5</sup>; ÂNGELA MARIA FIORENTINI<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – silvanasigali@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – maria.fernanda.fs97@gmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – joice.zootecniaufpel@gmail.com

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – marqueskarline16@gmail.com

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – graciela.lopes@ufpel.edu.br

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas – angefiore@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

As bactérias ácido-láticas (BAL) são um grupo heterogêneo de microrganismos que produzem ácido lático a partir do metabolismo de carboidratos frequentemente utilizados na fermentação de alimentos. Apresentam características de bactérias Gram-positivas, catalase negativa, não formadoras de esporos, ácido tolerantes e aeróbias facultativas ou microaerófilas (AYIVI *et al.* 2020; WANG *et al.*, 2021; WERNING *et al.*, 2022).

Durante a fermentação, as BAL, além de produzir ácidos orgânicos, também tem a capacidade de formar, bacteriocinas, diacetil, acetaldeído, assim como enzimas glicolíticas, lipolíticas e proteolíticas (LIMA *et al.*, 2008). Algumas espécies de BAL, durante a fermentação, podem também produzir biopolímeros como exopolissacarídeos (EPS), que apresentam diversas possibilidades de aplicação em vários segmentos industriais como alimentos, cosméticos, farmacêutico, têxtil, petroleiro e agricultura (KAUR & DEY, 2023; WERNING *et al.*, 2022).

Os EPS vêm ganhando espaço nas pesquisas na área de alimentos, em virtude do potencial tecnológico que propiciam, atuando como emulsificante e estabilizante, tanto em emulsões de óleo em água, quanto água em óleo (BIBI *et al.*, 2021). Também podem ser utilizados na retenção da umidade, alteração na reologia, promovendo firmeza e alterando propriedades biomecânicas dos alimentos (KAUR & DEY, 2023). Esses benefícios são interessantes na indústria de laticínios melhorando a viscosidade de leites fermentados, enquanto que na indústria de cereais e panificação, podem ser substitutos para gomas alimentares semi-sintéticas como a hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) (GALLE *et al.*, 2012).

O genoma das bactérias ácido-láticas possui um ou mais grupos de genes responsáveis pela síntese de EPS. Esses grupos de genes geralmente incluem aqueles envolvidos na síntese de nucleotídeos de açúcar, genes que codificam glicosiltransferases e genes que regulam a produção de polissacarídeos (WANG *et al.*, 2021).

Algumas cepas de BAL da espécie *Streptococcus thermophilus* são produtoras de EPS. O EPS produzido por *S. thermophilus* é considerado seguro e é amplamente utilizado a fim de aprimorar as características reológicas e atributos sensoriais tais como odor, sabor e textura de alimentos fermentados (MIZUNO *et al.*, 2020).

O objetivo do trabalho foi determinar a influência da temperatura na concentração de EPS produzido pela bactéria ácido-lática comercial *S. thermophilus* TA40 em uma bebida láctea fermentada, contendo extrato de aveia.

## 2. METODOLOGIA

A formulação base da bebida láctea fermentada seguiu os procedimentos de KLAJN *et al.*, (2021), com modificações. Para a produção do extrato de aveia, 500 g de flocos de aveia foram deixados em imersão em 750 mL de água por 1 h. Após o período, os flocos foram lavados com água, com a finalidade de remover o amido em excesso, até que um resíduo límpido fosse obtido. Os flocos lavados foram então processados por 2 minutos com 750 mL de água gelada. O material processado foi coado em tecido de *voil*. O extrato de aveia foi mantido sob refrigeração, até ser incorporado na bebida láctea.

A bebida láctea foi produzida com 40% de leite em pó integral reconstituído (12,5% em água), 30% de soro de leite reconstituído (8,3% em água), 30% do extrato de aveia preparado anteriormente e 10% de sacarose, na sequência submetida ao tratamento térmico de 90 °C por 5 min.

A mistura foi resfriada a 42 °C e 0,03% da cultura produtora de EPS *S. thermophilus* TA40 (Danisco) foi adicionada. Foram testadas 3 temperaturas de fermentação: T1 (38 °C), T2 (42 °C) e T3 (50 °C) por 6 h, até pH igual ou menor que 4,5.

Para a extração de EPS das bebidas lácteas seguiu-se as metodologias sugeridas por DABOUR *et al.*, (2005), com modificações propostas por Ali *et al.*, (2020), LIMA *et al.*, (2008) e BENGGOA *et al.*, (2023), sendo realizada nos 3 tratamentos.

Um volume de 15 mL de amostra da bebida láctea foi transferido para um tubo falcon e fervido em banho-maria a 100 °C por 30 min com o objetivo de inativar enzimas e células bacterianas. Foi então centrifugado a 5.000 x g, 4 °C por 20 min. Um volume de 6 mL do sobrenadante foi recuperado e, ao mesmo, foi adicionado 1 mL de ácido tricloroacético 80% e permaneceu em repouso a 4 °C por 1 h, onde as proteínas foram precipitadas. As amostras foram centrifugadas a 7.000 x g, 20 °C por 35 min e 2 mL do sobrenadante, novamente foi recuperado. Ao sobrenadante, foram adicionados 4 mL de etanol P.A. e mantido em repouso a 4 °C/24 h. O EPS precipitado foi recolhido através de centrifugação a 7.000 x g, 4 °C por 20 min. O sobrenadante foi descartado, e o EPS precipitado foi ressuspensionado em 5 mL de água destilada, após levado a uma etapa de diálise em membrana de 3500 kDa, onde permaneceu em um agitador por 48 h a 4 °C, a fim de remover resquícios de ácido tricloroacético, sais e açúcares de baixo peso molecular.

Do conteúdo remanescente no interior da membrana, 1 mL foi recolhido em um tubo e quantificado pela metodologia do fenol-ácido sulfúrico proposta por DUBOIS *et al.*, (1956). Foram adicionados ao 1 mL uma solução de fenol 5% (0,5 mL) e ácido sulfúrico 95% (2,5 mL). O tubo foi mantido em repouso por 10 min e, após o período, agitado por 30 s, em vórtex. Após a homogeneização, o tubo foi levado ao banho-maria a 25 °C/20 min e as leituras realizadas em espectrofotômetro de placas de 96 poços em comprimento de onda de 490 nm. Os resultados foram obtidos, através da curva padrão de glicose. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA) com variância significativa ( $p < 0,05$ ) e teste de Tukey.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na produção de EPS por *S. thermophilus* TA40, avaliada em três diferentes temperaturas, os resultados obtidos demonstram que a produção a 42 °C foi inferior, enquanto que a 38 °C houve uma recuperação na síntese de EPS, mas em nenhuma delas foi superior à observada a 50 °C (Tabela 1).

Tabela 1 - Produção de exopolissacarídeos (EPS) por *Streptococcus thermophilus* TA40 em uma bebida láctea fermentada com extrato de aveia.

Temperatura	38 °C	42 °C	50 °C
Produção de EPS (mg/L)	42,0984±1,63 <sup>ab</sup>	34,8550±1,96 <sup>b</sup>	53,3150±3,13 <sup>a</sup>

Valores expressos em média e desvio padrão das triplicatas.

Letras diferentes indicam diferença significativa entre os valores.

Fonte: A autora, 2024.

Utilizando condições de fermentação de 42 °C/12 h, DE VUYST *et al.*, (1998) produziram leites fermentados utilizando quatro cepas de *S. thermophilus* (480, LY03, BTC e Sfi20) e encontraram valores de 24 mg/L, 32 mg/L, 26 mg/L e 20 mg/L, respectivamente, sendo o valor de 32 mg/L (*S. thermophilus* LY03) o único que corrobora com este estudo. Já RODRÍGUEZ *et al.*, (2009), em uma condição de 37°C por 16 h, encontraram valores de EPS de 166 mg/L para a cepa *S. thermophilus* CRL 804 e 39 mg/L para *S. thermophilus* CRL 1190, sendo este último, um valor ainda abaixo do encontrado neste estudo para condições de fermentação semelhantes. Também a 37°C/24 h, WA *et al.*, (2022), encontraram um valor de 15,1 mg/L, quase três vezes menor do que o encontrado neste estudo.

#### 4. CONCLUSÕES

A concentração de EPS obtida na fermentação conduzida a 50 °C foi superior às demais temperaturas testadas, sendo particularmente relevante, pois atende às exigências sensoriais/reológicas necessárias para a bebida, demonstrando potencial para melhorar a textura do produto. Portanto, a temperatura de 50 °C é a mais eficaz para maximizar a produção de EPS por *S. thermophilus* TA40 e, conseqüentemente, para o desenvolvimento de um produto de qualidade superior.

Os autores agradecem o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALI, P.; SHAH, A. A.; HASAN, F.; HERTKORN, N.; GONSIOR, M.; SAJJAD, W.; CHEN, F. A glacier bacterium produces high yield of cryoprotective exopolysaccharide. **Frontiers in Microbiology**, vol. 10, 2020.
- AYIVI, R. D.; GYAWALI, R.; KRASTANOV, A.; ALJALOU, S. O.; WORKU, M.; TAHERGORABI, R.; SILVA, R. C. da; IBRAHIM, S. A. Lactic acid bacteria: food safety and human health applications. **Dairy**, vol. 1, no. 3, p. 202–232, 2020.
- BENGOA, A. A.; DUEÑAS, M. T.; PRIETO, A.; GARROTE, G. L.; ABRAHAM, A. G. Exopolysaccharide-producing *Lactocaseibacillus paracasei* strains isolated from kefir as starter for functional dairy products. **Frontiers in Microbiology**, vol. 14, 2023.
- BIBI, A.; XIONG, Y.; RAJOKA, M. S. R.; MEHWISH, H. M.; RADICETTI, E.; UMAIR, M.; SHOUKAT, M.; KHAN, M. K. I.; AADIL, R. M. Recent advances in the production of exopolysaccharide (EPS) from *Lactobacillus* spp. and Its Application in the Food Industry: A Review. **Sustainability**, vol. 13, no. 22, p. 12429, 2021.
- DABOUR, N.; LAPOINTE, G. Identification and molecular characterization of the chromosomal exopolysaccharide biosynthesis gene cluster from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SMQ-461. **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 71, no. 11, p. 7414–7425, 2005.

- 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 growth-associated biosynthesis. **Journal of Applied Microbiology**, vol. 84, no. 6, p. 1059–1068, 1998.
- DUBOIS, Michel.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, Fred. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, vol. 28, no. 3, p. 350–356, 1956.
- GALLE, S.; SCHWAB, C.; DAL BELLO, F.; COFFEY, A.; GÄNZLE, M. G.; ARENDT, E. K. Influence of in-situ synthesized exopolysaccharides on the quality of gluten-free sorghum sourdough bread. **International Journal of Food Microbiology**, vol. 155, no. 3, p. 105–112, 2012.
- KAUR, N.; DEY, P. Bacterial exopolysaccharides as emerging bioactive macromolecules: from fundamentals to applications. **Research in Microbiology**, vol. 174, no. 4, p. 104024, 2023.
- KLAJN, V. M.; AMES, C. W.; DA CUNHA, K. F.; LORINI, A.; HACKBART, H. C. dos S.; FILHO, P. J. S.; CRUXEN, C. E. dos S.; FIORENTINI, Â. M. Probiotic fermented oat dairy beverage: viability of *Lactobacillus casei*, fatty acid profile, phenolic compound content and acceptability. **Journal of Food Science and Technology**, vol. 58, no. 9, p. 3444–3452, 2021.
- LIMA, L. F. O.; HABU, S.; GERN, J. C.; NASCIMENTO, B. M.; PARADA, J.-L.; NOSEDA, M. D.; GONÇALVES, A. G.; NISHA, V. R.; PANDEY, A.; SOCCOL, V. T.; SOCCOL, C. R. Production and characterization of the exopolysaccharides produced by *Agaricus brasiliensis* in submerged fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, vol. 151, no. 2-3, p. 283–294, 2008.
- MIZUNO, H.; TOMOTSUNE, K.; ISLAM, M. S.; FUNABASHI, R.; ALBARRACÍN, L.; IKEDA-OHTSUBO, W.; ASO, H.; TAKAHASHI, H.; KIMURA, K.; VILLENA, J.; SASAKI, Y.; KITAZAWA, H. Exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* ST538 modulate the antiviral innate immune response in porcine intestinal epitheliocytes. **Frontiers in Microbiology**, vol. 11, 2020.
- RODRÍGUEZ, C.; MEDICI, M.; RODRÍGUEZ, A. V.; MOZZI, F.; FONT DE VALDEZ, G. Prevention of chronic gastritis by fermented milks made with exopolysaccharide-producing *Streptococcus thermophilus* strains. **Journal of Dairy Science**, vol. 92, no. 6, p. 2423–2434, 2009.
- WA, Y.; CHANYI, R. M.; NGUYEN, H. T. H.; GU, R.; DAY, L.; ALTERMANN, E. Extracellular polysaccharide extraction from *Streptococcus thermophilus* in fermented milk. **Microbiology Spectrum**, vol. 10, no. 2, 2022.
- WANG, L.; GU, Y.; ZHENG, X.; ZHANG, Y.; DENG, K.; WU, T.; CHENG, H. Analysis of physicochemical properties of exopolysaccharide from *Leuconostoc mesenteroides* strain XR1 and its application in fermented milk. **LWT**, vol. 146, p. 111449, 2021.
- WERNING, M. L.; HERNÁNDEZ-ALCÁNTARA, A. M.; RUIZ, M. J.; SOTO, L. P.; DUEÑAS, M. T.; LÓPEZ, P.; FRIZZO, L. S. Biological functions of exopolysaccharides from lactic acid bacteria and their potential benefits for humans and farmed animals. **Foods**, vol. 11, no. 9, p. 1284–1284, 2022.