

## PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS POR *Leuconostoc mesenteroides*: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA CONCENTRAÇÃO DE INÓCULO, TEMPERATURA E pH

CAROLINE KRAUSE BIERHALS<sup>1</sup>; MARIA FERNANDA FERNANDES  
SIQUEIRA<sup>1</sup>; SILVANA DE SOUZA SIGALI<sup>1</sup>; IGOR HENRIQUE DE LIMA COSTA<sup>1</sup>;  
GRACIELA VÖLZ LOPES<sup>1</sup>; ÂNGELA MARIA FIORENTINI<sup>1</sup>

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

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – maria.fernanda.fs97@gmail.com

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

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – igorhenr.98@gmail.com

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – gracielaavlopes@yahoo.com.br

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

### 1. INTRODUÇÃO

Os exopolissacarídeos (EPS) são biopolímeros, amplamente aplicados na indústria alimentícia e farmacêutica. Em virtude de suas características químicas e físicas, podem ser utilizados como agentes emulsificantes, estabilizantes e também, como material para fabricação de embalagens. Além de suas propriedades tecnológicas, os EPS são compostos bioativos que apresentam atividades biológicas como ação antioxidante e antimicrobiana, tornando-os uma alternativa natural e mais vantajosa frente ao uso de polímeros sintéticos (JIANG *et al.*, 2022).

A utilização de bactérias ácido-láticas (BAL) capazes de sintetizar EPS, são de grande interesse para a produção de alimentos, visto que características como textura e viscosidade podem ser melhoradas na presença destes compostos, contribuindo nas propriedades sensoriais e reológicas de alimentos fermentados (FELDMANE; SEMJONOV; CIPROVICA, 2013). Entretanto, a maioria das espécies de BAL (*Leuconostoc mesenteroides*, *Enterococcus* spp., entre outras) produtoras de EPS apresentam um baixo rendimento na síntese deste polímero, limitando sua aplicação em larga escala (LONG *et al.*, 2024).

Com isso, o estresse ambiental pode ser utilizado como estratégia para otimização da produção de EPS, pois quando expostas às condições extremas, as BAL sofrem alterações em seu metabolismo, levando ao aumento da síntese de EPS, como um mecanismo de defesa (NGUYEN *et al.*, 2020). Para isso, fatores como fonte de carbono e nitrogênio; condições de cultivo, incluindo pH, temperatura e oxigênio; além de tempo de incubação e concentração de inóculo podem estimular a produção de EPS, aumentando seu rendimento e garantindo sua funcionalidade (WERNING *et al.*, 2022).

Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da concentração de inóculo, temperatura e pH sobre a produção de EPS por *Leuconostoc mesenteroides*.

### 2. METODOLOGIA

A BAL em estudo, *Leuconostoc mesenteroides* KLM6, foi isolada de kefir e identificada através do sequenciamento do gene 16S do rDNA, em estudos anteriores, está mantida sob armazenamento a -70 °C.

A avaliação dos efeitos sobre a produção de EPS foi realizada a partir da alteração das condições de cultivo do isolado KLM6, em ágar MRS (De Man,

Rogosa e Sharpe) durante 24 h de fermentação. Os parâmetros utilizados foram a variação da concentração do inóculo adicionado ao meio (2,5%, 3% e 3,5%); temperatura (32 °C, 36 °C e 40 °C) e pH (5,0, 6,0 e 7,0) (LI *et al.*, 2014; VOSOUGH *et al.*, 2022). Os efeitos principais e de interação foram avaliados utilizando o Planejamento Completo do tipo 2<sup>3</sup>. Os níveis codificados utilizados foram: -1 e 1 na região 2<sup>3</sup>, e 0 no ponto central, totalizando 10 ensaios (Tabela 1). Além disso, foi realizado um ensaio controle a partir da fermentação do isolado KLM6 em meio MRS, com adição de 1% de inóculo ao meio, temperatura de 37 °C, sem alteração do pH, durante um período de 24 h. A concentração de EPS obtida foi determinada utilizando o método fenol-ácido sulfúrico com curva padrão de glicose (DUBOIS *et al.*, 1956).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração máxima de EPS obtida foi de 0,746 g/L pelo isolado KLM6 utilizando como parâmetros concentração de inóculo de 2,5%, temperatura de 40 °C e pH 5,0, o que corresponde a um aumento de 81,9% quando comparado ao ensaio controle (0,410 g/L). Na Tabela 1 é possível observar os valores reais e codificados das variáveis independentes e os resultados para produção de EPS de cada ensaio.

Tabela 1 – Produção de exopolissacarídeos (EPS) a partir da variação da concentração de inóculo, temperatura e pH por *Leuconostoc mesenteroides* KLM6

Ensaio	Concentração de inóculo (%)	Temperatura (°C)	pH	EPS (g/L)
1	2,5 (-1)	32 (-1)	5,0 (-1)	0,658
2	3,5 (+1)	32 (-1)	5,0 (-1)	0,678
3	2,5 (-1)	40 (+1)	5,0 (-1)	0,746
4	3,5 (+1)	40 (+1)	5,0 (-1)	0,666
5	2,5 (-1)	32 (-1)	7,0 (+1)	0,329
6	3,5 (+1)	32 (-1)	7,0 (+1)	0,452
7	2,5 (-1)	40 (+1)	7,0 (+1)	0,375
8	3,5 (+1)	40 (+1)	7,0 (+1)	0,266
9	3,0 (0)	36 (0)	6,0 (0)	0,690
10	3,0 (0)	36 (0)	6,0 (0)	0,620

Entretanto, na Figura 1 os dados indicam que somente o pH apresentou efeito positivo (~90%) sobre a produção de EPS, enquanto que as demais variáveis, não apresentaram efeitos relevantes, quando avaliadas isoladamente. A interação entre concentração de inóculo e temperatura apresentou um efeito de 5,7%, o que não é considerado suficiente, no entanto é possível aumentar esse efeito pela modificação dos valores das variáveis em questão.

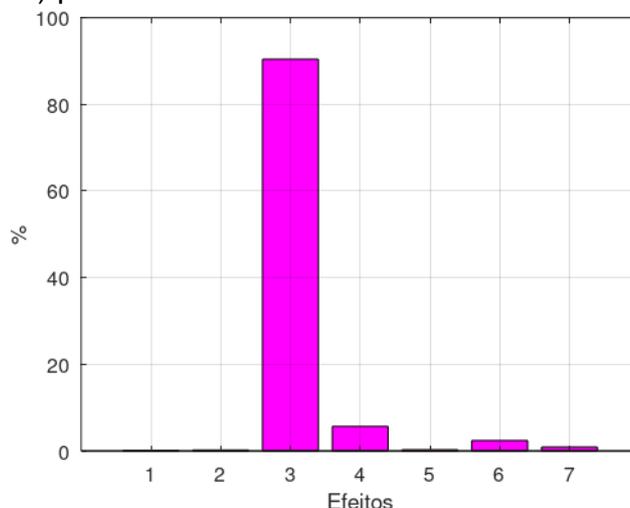
Portanto, a partir dos efeitos principais e de interação, foi possível observar que a produção de EPS é influenciada pelo pH do meio. Esse resultado indica que em condições adversas, como a variação do pH, a produção do biopolímero é

aumentada pelo isolado estudado. Da mesma forma, outro estudo relata que em condições específicas (pH de 5,7; temperatura de 25 °C) a síntese de EPS por cepas de *L. rhamnosus* é favorecida, aumentando a produtividade (OLEKSY-SOBCZAK;KLEWICKA, 2020).

DERDAK *et al.* (2022) avaliaram as condições ótimas de produção de EPS por um isolado de *L. mesenteroides* proveniente de leite cru e também não obtiveram um aumento da produção de EPS ao variar parâmetros como tempo de fermentação (18-48 h) e temperatura (30-37 °C), contudo obtiveram a máxima concentração de EPS (0,67 g/L) adicionando ao meio 6% de sacarose, 1% de inóculo e 2,5% de peptona. Por outro lado, JIANG *et al.* (2022) obtiveram alto rendimento de EPS a partir de *L. pentosus* utilizando uma maior concentração de inóculo (3,8%), pH ácido (6,28) e tempo de fermentação de 35,7 h.

Sabe-se que a síntese de EPS é influenciada por fatores ambientais, além do isolado utilizado e suas necessidades nutricionais. A estrutura, composição de monossacarídeos e propriedades funcionais dos EPS formados também podem ser diferentes de acordo com as condições de cultivo empregadas (JIANG *et al.*, 2022). Com isso, a produção deste biopolímero se torna muito variável e, a manipulação das condições de cultivo pode ser utilizada como alternativa para obtenção de uma maior concentração de EPS, aumentando seu rendimento e viabilizando sua aplicação na indústria de alimentos (THANH *et al.*, 2014).

Figura 1 – Efeitos das variáveis avaliadas para produção de exopolissacarídeos (EPS) pelo isolado *Leuconostoc mesenteroides* KLM6



- (1) concentração de inóculo; (2) temperatura; (3) pH; (4) interação entre concentração de inóculo e temperatura; (5) interação entre concentração de inóculo e pH; (6) interação entre temperatura e pH; (7) interação entre concentração de inóculo, temperatura e pH.

#### 4. CONCLUSÕES

Conclui-se que dentre os parâmetros estudados, somente o pH apresentou efeito positivo sobre a produção de EPS pelo isolado KLM6, apresentando um rendimento de 81,9%, superior ao obtido no ensaio controle. Entretanto, para que a produção deste biopolímero seja otimizada, um novo estudo se faz necessário, a fim de assegurar uma produção de EPS considerada viável, tanto economicamente quanto tecnologicamente.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DERDAK, R.; SAKOUI, S.; POP, O. L.; VODNAR, D. C.; ADDOUM, B.; ELMAKSSOUDI, A.; ERRACHIDI, F.; SUHAROSCHI, R.; SOUKRI, A.; KHALFI, B. E. Screening, optimization and characterization of exopolysaccharides produced by novel strains isolated from Moroccan raw donkey milk. **Food Chemistry: X**, v. 14, p. 100305–100305, 2022.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A. T.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350–356, 1956.
- FELDMANE, J.; SEMJONOV, P.; CIPROVICA, I. Potential of exopolysaccharides in yoghurt production. **International Journal of Nutrition and Food Engineering**, v. 7, n. 8, p. 767–770, 2013.
- JIANG, G.; HE, J.; GAN, L. M.; LI, X.; TIAN, Y. Optimization of Exopolysaccharides Production by *Lactiplantibacillus pentosus* B8 Isolated from Sichuan PAOCAI and Its Functional Properties. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 58, p. 195–205, 2022.
- LI, W.; JI, J.; RUI, X.; YU, J.; TANG, W.; CHEN, X.; JIANG, M.; DONG, M. Production of exopolysaccharides by *Lactobacillus helveticus* MB2-1 and its functional characteristics in vitro. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, n. 2, p. 732-739, 2014.
- LONG, X.; HOU, X.; LI, S.; CHEN, A.; ZHANG, Z.; SHEN, G. Fermentation Optimization and *In-Vitro* Antioxidant Activity of Exopolysaccharides Produced by *Leuconostoc suionicum* LSBM1 Using Sugar Beet Molasses. **Sugar Tech.**, 2024.
- NGUYEN, P. T.; NGUYEN, T. T.; BUI, D. C.; HONG, P. T.; HOANG, Q. K.; NGUYEN, H. T. Exopolysaccharide production by lactic acid bacteria: the manipulation of environmental stresses for industrial applications. **AIMS microbiology**, v. 6, n. 4, p. 451–469, 2020.
- 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.
- THANH, N. H.; RAZAFINDRALAMBO, H.; BLECKER, C.; N'YAPO, C.; THONART, P.; DELVIGNE, F. Stochastic exposure to sub-lethal high temperature enhances exopolysaccharides (EPS) excretion and improves *Bifidobacterium bifidum* cell survival to freeze-drying. **Biochemical Engineering Journal**, v. 88, p. 85–94, 2014.
- VOSOUGH, P. R.; DOVOM, M. R. E.; NAJAFI, 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. 101-869, 2022.
- 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**, v. 11, n. 9, p. 1284, 2022.