

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE AGRONOMIA ELISEU MACIEL
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AGROINDUSTRIAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

Dissertação



**Isolamento e caracterização de bactérias ácido-láticas potencialmente
produtoras de exopolissacarídeos provenientes de kefir**

Caroline Krause Bierhals
Bacharela em Engenharia Bioquímica

Pelotas, 2024

Caroline Krause Bierhals

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos da
Universidade Federal de Pelotas,
como requisito parcial à obtenção do
título de Mestre em Ciência e
Tecnologia de Alimentos

Orientador: Profa. Dra. Ângela Maria Fiorentini

Co-Orientador (es): Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva

Profa. Dra. Graciela Völz Lopes

Pelotas, 2024

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação da Publicação

B586i Bierhals, Caroline Krause

Isolamento e caracterização de bactérias ácido-láticas potencialmente produtoras de exopolissacarídeos provenientes de kefir [recurso eletrônico] / Caroline Krause Bierhals ; Ângela Maria Fiorentini, orientadora ; Wladimir Padilha da Silva, Graciela Völz Lopes, coorientadores. — Pelotas, 2024.

69 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2024.

1. Alimentos lácteos. 2. *Leuconostoc mesenteroides*. 3. Condições de cultivo. 4. Otimização. 5. Espessantes. I. Fiorentini, Ângela Maria, orient. II. Silva, Wladimir Padilha da, coorient. III. Lopes, Graciela Völz, coorient. IV. Título.

CDD 641.37

Caroline Krause Bierhals

**Isolamento e caracterização de bactérias ácido-láticas potencialmente
produtoras de exopolissacarídeos provenientes de kefir**

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 28/02/2024

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Ângela Maria Fiorentini – Presidente

Doutora em Ciências dos Alimentos pela Universidade Federal de Santa Catarina/UFSC

Profa. Dra. Angelita da Silveira Moreira – Membro titular

Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas/UFPEL

Profa. Dra. Isabela Schneid Kroning – Membro titular

Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Pelotas/UFPEL

Profa. Dra. Khadija Bezerra Massaut – Membro titular

Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Pelotas/UFPEL

Dedico este trabalho aos meus pais, meus
irmãos e meus avós

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, à Deus por ter me dado forças e amparo nos momentos difíceis.

Aos meus pais Claudete e Claudemiro, pelo amor, pelo apoio e por serem meu alicerce sempre.

Aos meus irmãos Lucas e Mateus, que são tudo pra mim. Obrigada pelos conselhos e amizade.

Às minhas avós Silda e Nilza pelo carinho e incentivo. Ao meu avô Décio, que apesar de não estar mais presente fisicamente, acompanhou minha trajetória e sempre me apoiou e cuidou.

À minha orientadora Profa. Dra. Ângela Maria Fiorentini, pela oportunidade, pelo comprometimento, pelos ensinamentos e por me auxiliar a conduzir este trabalho da melhor maneira possível.

Aos co-orientadores Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva e Profa. Dra. Graciela Volz Lopes, por viabilizar a realização das análises microbiológicas e pelas contribuições no estudo.

À todos da equipe do Laboratório de Processamento de Produtos de Origem Animal (LPOA). Agradeço às colegas Maria, Silvana, Patrícia e Khadija, e ao estagiário Pedro pela ajuda e amizade.

À CAPES e ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA) pela bolsa concedida e oportunidade de crescimento profissional.

Aos meus amigos e familiares pela compreensão, carinho e cuidado.

Resumo

BIERHALS, Caroline Krause. Isolamento e caracterização de bactérias ácido-láticas potencialmente produtoras de exopolissacarídeos provenientes de kefir. 2024. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2024.

As bactérias ácido-láticas (BAL) são comumente utilizadas na indústria de alimentos devido ao seu potencial probiótico e tecnológico, podendo atuar como culturas iniciadoras e/ou adjuntas. São produtoras de ácidos orgânicos, como ácido lático, além de outros metabólitos importantes como bacteriocinas, vitaminas e exopolissacarídeos (EPS). Os EPS produzidos por BAL apresentam diversas aplicações na indústria de alimentos (espessantes, estabilizantes), bem como fornecem benefícios como promotores de saúde. Assim, o estudo teve como objetivo isolar e caracterizar bactérias ácido-láticas, provenientes de diferentes amostras de kefir, com potencial de produção de exopolissacarídeos, bem como avaliar as condições ótimas de cultivo para aumento da produção de exopolissacarídeos. A partir do leite fermentado e grãos de kefir (5), foram selecionados 44 isolados, utilizando meio seletivo (ágar MRS) para BAL, através dos testes de coloração de Gram e catalase. Posteriormente, esses isolados foram avaliados quanto aos aspectos de segurança microbiológica como atividade das enzimas Dnase, hemolisina, gelatinase e susceptibilidade à antimicrobianos de uso clínico. Também foram realizados os testes de fermentação de carboidratos e produção de EPS em placas, a fim de avaliar seu potencial tecnológico. Os isolados que se mostraram seguros microbiologicamente e apresentaram as características tecnológicas desejadas foram identificados molecularmente através do sequenciamento do gene 16S do rDNA e comparação com os dados depositados no *Genbank*. Na etapa de produção de EPS, o isolado KLM6 apresentou maior capacidade de sintetizar EPS comparado com os demais isolados, produzindo 0,410 g/L. O mesmo foi identificado como *Leuconostoc mesenteroides* e selecionado para a avaliação dos efeitos de concentração de inóculo, temperatura e pH na produção de EPS. A produção de EPS foi influenciada apenas pelo pH, obtendo produção máxima de 0,746 g/L em pH 5, sendo que a concentração de inóculo e a temperatura não apresentaram efeitos sobre a síntese do biopolímero. A partir da análise dos efeitos principais e de interação, foi realizada uma etapa de otimização das condições de cultivo que indicou um aumento de 105,1% no rendimento de EPS (pH 5 e temperatura de 50,5 °C) comparado com os resultados obtidos utilizando parâmetros não ideais. Portanto, o kefir pode ser considerado uma importante matriz alimentar para isolar bactérias ácido-láticas com potencial de produção de EPS, e a alteração das condições de cultivo como pH e temperatura apresentam efeito determinante no aumento da produção desse metabólito, permitindo sua futura aplicação de forma eficiente na indústria de alimentos.

Palavras-chave: alimentos lácteos, condições de cultivo, espessantes, otimização, produção

Abstract

BIERHALS, Caroline Krause. Isolation and characterization of lactic acid bacteria potentially producing exopolysaccharides from kefir. 2024. 69 s. Dissertation (Master's in Food Science and Technology) – Postgraduate Program in Food Science and Technology, Department of Agroindustrial Science and Technology, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2024.

Lactic acid bacteria (LAB) are commonly used in the food industry due to their probiotic and technological potential, and can act as starter and/or adjunct cultures. They produce organic acids, such as lactic acid, as well as other important metabolites such as bacteriocins, vitamins and exopolysaccharides (EPS). The EPS produced by LAB have diverse applications in the food industry (thickeners, stabilizers), as well as providing benefits as health promoters. Thus, the study aimed to isolate and characterize lactic acid bacteria, coming from different kefir samples, with potential for exopolysaccharide production, as well as evaluating the optimal cultivation conditions to increase exopolysaccharide production. From fermented milk and kefir grains (5), 44 isolates were selected, using selective medium (MRS agar) for LAB, through Gram and catalase staining tests. Subsequently, these isolates were evaluated for microbiological safety aspects such as the activity of the enzymes Dnase, hemolysin, gelatinase and susceptibility to antimicrobials for clinical use. Carbohydrate fermentation and EPS production tests on plates were also carried out in order to evaluate its technological potential. The isolates that proved to be microbiologically safe and presented the desired technological characteristics were molecularly identified through sequencing of the 16S rDNA gene and comparison with data deposited in Genbank. In the EPS production stage, isolate KLM6 showed a greater capacity to synthesize EPS compared to the other isolates, producing 0.410 g/L. It was identified as *Leuconostoc mesenteroides* and selected to evaluate the effects of inoculum concentration, temperature and pH on EPS production. EPS production was influenced only by pH, obtaining a maximum production of 0.746 g/L at pH 5, with inoculum concentration and temperature having no effect on biopolymer synthesis. Based on the analysis of the main and interaction effects, a stage of optimization of the cultivation conditions was carried out, which indicated an increase of 105.1% in the EPS yield (pH 5 and temperature of 50.5 °C) compared to the results obtained using non-ideal parameters. Therefore, kefir can be considered an important food matrix to isolate lactic acid bacteria with EPS production potential, and changing cultivation conditions such as pH and temperature have a determining effect on increasing the production of this metabolite, allowing its future application in efficiently in the food industry.

Keywords: dairy foods, growing conditions, thickeners, optimization, production

Sumário

1. Introdução	10
2. Objetivos	12
2.1 Objetivo Geral	12
2.2 Objetivos específicos	12
3. Revisão da literatura	13
3.1 Kefir	13
3.2 Bactérias ácido-láticas (BAL)	14
3.3 Exopolissacarídeos produzidos por BAL	17
3.3.1 Condições de cultivo	18
3.3.2 Propriedades fisiológicas de EPS	19
3.4 Aplicação de BAL e EPS na indústria de alimentos	20
4. Material e Métodos	23
4.1. Material	23
4.2. Métodos	23
4.2.1 Isolamento e caracterização de bactérias ácido-láticas (BAL)	23
4.2.2 Avaliação dos parâmetros de segurança microbiológica	24
4.2.2.1 Produção da enzima catalase	24
4.2.2.2 Atividade da enzima DNase	24
4.2.2.3 Atividade Hemolítica	24
4.2.2.4 Atividade da enzima gelatinase	25
4.2.2.5 Susceptibilidade a antimicrobianos de uso clínico	25
4.2.3 Avaliação de propriedades tecnológicas	26

4.2.3.1 Avaliação da produção de exopolissacarídeos (EPS)	26
4.2.3.2 Fermentação de carboidratos.....	26
4.2.4 Análises moleculares	27
4.2.4.1 Identificação de gênero e espécie	27
4.2.4.2 Identificação do gene que codifica EPS	27
4.2.5 Produção, obtenção e quantificação de EPS em meio de cultura	28
4.2.6 Avaliação dos efeitos da concentração de inóculo, temperatura e pH na produção de EPS.....	29
4.2.7 Otimização da produção de EPS a partir da variação de pH e temperatura.....	30
5. Resultados e discussão	33
5.1 Isolamento e caracterização de bactérias ácido-láticas (BAL) provenientes de kefir	33
5.2 Testes de segurança microbiológica	33
5.3 Testes tecnológicos	36
5.3.1 Avaliação da produção de exopolissacarídeos (EPS)	36
5.3.2 Fermentação de carboidratos.....	37
5.4 Avaliação genotípica	40
5.4.1 Identificação de gênero e espécie dos isolados de BAL.....	40
5.4.2 Identificação do gene que codifica a produção de EPS.....	41
5.5 Produção e quantificação de EPS.....	42
5.6 Avaliação dos efeitos da concentração de inóculo, temperatura e pH na produção de EPS.....	44
6. Referências	53

1. Introdução

O kefir é um produto lácteo, obtido através da fermentação do leite por um complexo grupo de microrganismos, como leveduras, bactérias acéticas e bactérias ácido-láticas, envolvidos em uma matriz de exopolissacarídeos e proteínas (Kim *et al.*, 2019). A ingestão do produto obtido, denominado leite fermentado, proporciona benefícios à saúde que podem estar associados aos microrganismos presentes no produto, e também aos metabólitos gerados durante a fermentação (Bengoa *et al.*, 2019).

O grupo de bactérias ácido-láticas (BAL) tem se destacado quanto ao seu potencial tecnológico e promotor de saúde, conforme estudos já realizados por Plessas *et al.* (2020); Talib *et al.* (2019) e You *et al.* (2020). As BAL são bactérias Gram-positivas, geralmente reconhecidas como seguras (GRAS - *Generally Recognized As Safe*), possibilitando sua utilização como culturas adjuntas com potencial probiótico e como culturas iniciadoras em processos fermentativos. Além da produção de ácido láctico como produto final da fermentação, as BAL produzem diversos metabólitos importantes, como outros ácidos orgânicos, ácidos graxos, bacteriocinas e exopolissacarídeos (You *et al.*, 2020; Lynch *et al.*, 2018).

Os exopolissacarídeos (EPS) produzidos por BAL, são compostos de interesse, em virtude de seu potencial em diversas aplicações na indústria de alimentos, principalmente melhorando a viscosidade de leites fermentados e de seus efeitos como promotores de saúde (Xiao *et al.*, 2021). De acordo com Saadat; Khosroushahi; Gargari (2019), EPS produzidos por diferentes BAL apresentam propriedades imunomoduladoras, anticancerígenas, antioxidantes, além de apresentarem, também, a capacidade de prevenir a adesão de patógenos, pois evitam a formação de biofilmes bacterianos.

Na produção de alimentos, EPS podem influenciar positivamente, nas características reológicas e sensoriais de produtos fermentados, devido à capacidade de se ligar a água e reter a umidade do alimento, atuando como viscosificantes, estabilizantes, agentes emulsificantes ou gelificantes (Mende; Rohm; Jaros, 2016; Costa *et al.*, 2010).

A produção e o rendimento de EPS de origem microbiana pode ser influenciada pelas condições ambientais adversas, fatores como fonte de carbono e nitrogênio; condições de cultivo, incluindo pH, temperatura e oxigênio; além de tempo de incubação (Vuyst; Degeest, 1999; Ruas-Madiedo; Salazar; Clar, 2009).

Portanto, a busca por novos isolados de BAL produtores de EPS é importante para futura aplicação em alimentos, entretanto, é necessário avaliar os fatores que podem ser utilizados como propulsores, através da otimização das condições de cultivo, para obtenção de uma maior concentração de EPS.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Isolar e caracterizar bactérias ácido-láticas, provenientes de diferentes amostras de kefir, com potencial de produção de exopolissacarídeos, bem como avaliar as condições ótimas de cultivo para aumento da produção de exopolissacarídeos.

2.2 Objetivos específicos

- Isolar e caracterizar quanto à morfologia, presença da enzima catalase e propriedades tecnológicas, as bactérias ácido-láticas de kefir (leite fermentado e grãos);
- Avaliar quanto aos aspectos de segurança microbiológica dos isolados de BAL;
- Identificar, molecularmente, os isolados selecionados pelo sequenciamento do gene 16S do rDNA;
- Identificar a presença do gene priming-GT nos isolados, relacionado com a enzima glicosil transferase, responsável pela produção de exopolissacarídeos;
- Otimizar as condições de produção de EPS do isolado que apresentar maior produção do metabólito, frente às variáveis pH e temperatura.

3. Revisão da literatura

3.1 Kefir

O termo kefir provém da palavra turca “kef”, que significa “um sabor agradável” (Arslan, 2015). Originário da região do Cáucaso, o kefir é consumido em muitas regiões, incluindo Rússia, Europa, Ásia, América do Sul e América do Norte (Nejati; Junne; Neubauer, 2020; Plessas *et al.*, 2016).

O kefir é uma bebida com baixo teor alcoólico, composta por ácido láctico, ácido acético, etanol e CO₂, produzida através da fermentação de leveduras, bactérias acéticas e bactérias ácido-láticas, integradas em uma matriz de polissacarídeos e proteínas (Kim *et al.*, 2019). Os grãos de kefir são definidos como massas irregulares gelatinosas com variações em relação à cor e ao tamanho, variando entre amarelo e branco e apresentando entre 3 a 35 mm de diâmetro, respectivamente (Rosa *et al.*, 2017).

Em relação à composição química, normalmente os grãos de kefir são constituídos por água (890-900 g/kg), gordura (2 g/kg), proteína (30 g/kg), açúcares (60 g/kg) e cinzas (7 g/kg), podendo variar dependendo dos grãos (Garrote; Abraham; Antoni, 1997).

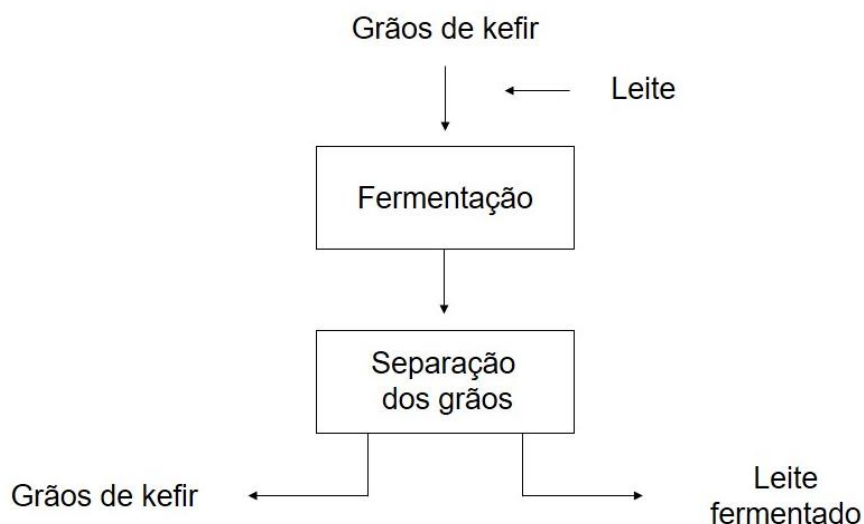
Os benefícios referentes ao consumo dessa bebida fermentada estão diretamente relacionados aos microrganismos presentes nos grãos de kefir e aos metabólitos produzidos durante o processo fermentativo. Com isso, a ingestão regular de kefir pode beneficiar o consumidor por meio de efeitos antioxidantes, antialérgicos, antitumorais, anti-inflamatórios, anti-hipertensivos, além de auxiliar na redução dos níveis de colesterol e apresentar atividade antimicrobiana (Nejati *et al.*, 2020).

As características do kefir são resultantes da simbiose de mais de 50 espécies de bactérias ácido-láticas, leveduras e bactérias acéticas. A maior proporção presente nos grãos pertence às bactérias ácido-láticas correspondendo à 10⁸-10⁹ UFC/g, seguidas por leveduras (10⁷-10⁸ UFC/g) e bactérias acéticas (10⁵-10⁶ UFC/g), que utilizam seus bioprodutos como fonte de energia e fatores de crescimento microbiano (Kim *et al.*, 2019; Bengoa *et al.*, 2018)

Dentre esses microrganismos estão os gêneros bacterianos *Lactobacillus**, *Lactococcus*, *Leuconostoc* e *Streptococcus*, e os gêneros de leveduras *Kluyveromyces*, *Candida*, *Saccharomyces* e *Komagataella pastoris* (Plessas *et al.*, 2016). Contudo, fatores como a origem dos grãos, os métodos de processamento e as condições de armazenamento podem influenciar na microbiota complexa dos grãos de kefir (Wang *et al.*, 2021).

A produção tradicional de kefir é realizada em temperatura ambiente (~25°C) a partir da inoculação dos grãos em leite pasteurizado integral, semidesnatado ou desnatado durante 24 h (Cassanego *et al.*, 2017). Ao final da fermentação, os grãos de kefir são coados e podem ser reutilizados para uma nova fermentação, conforme demonstrado na Figura 1. Já o leite fermentado, deve ser mantido sob refrigeração e consumido em até 5 dias (Schawn *et al.*, 2015).

Figura 1 – Fluxograma da produção de kefir



Fonte: O autor, 2023

3.2 Bactérias ácido-láticas (BAL)

As BAL fazem parte de um grupo heterogêneo de microrganismos Gram-positivos, catalase negativa e geralmente reconhecidos como seguros (GRAS - *Generally Recognized As Safe*), devido à sua ampla e segura aplicação em alimentos. Diferentes gêneros como *Streptococcus*, *Lactococcus*,

Lactobacillus e *Leuconostoc* fazem parte deste grupo. Porém, recentemente, novos gêneros foram incluídos, onde o gênero *Lactobacillus* recebeu nova classificação taxonômica, sendo 261 espécies avaliadas e subdivididas em 25 gêneros, dos quais 23 são gêneros novos (ex. *Lacticaseibacillus*, *Latilactobacillus*, *Liquorilactobacillus*, *Ligilactobacillus*, *Lactiplantibacillus* e *Furfurilactobacillus*) e apenas 38 espécies permaneceram classificadas dentro do gênero *Lactobacillus* (Zheng *et al.*, 2020).

Espécies de BAL são comumente encontradas em alimentos lácteos fermentados, entretanto podem estar presentes em outros alimentos (matéria-prima *in natura*, produtos artesanais) e em diversos ambientes, fazendo parte da microbiota de humanos, animais, plantas e solo (Rodríguez *et al.*, 2019; Duar *et al.*, 2017). Estudos como os de Xia *et al.* (2021) obtiveram 61 isolados de BAL de dez geleias de rosas fermentadas e, a partir desses isolados, testes probióticos *in vitro* foram realizados comprovando o potencial probiótico. Da mesma forma, Topçu; Kaya; Kaban (2020) estudaram as propriedades probióticas de 80 isolados de BAL procedentes de bacon. Plessas *et al.* (2020) realizaram o isolamento de dez novos isolados de BAL, provenientes de grãos de kefir e avaliaram seu potencial probiótico.

Em outro estudo, Habib *et al.* (2022) prospectaram BAL de diferentes fontes e comprovaram a capacidade de sintetizar EPS por todas as cepas probióticas isoladas. Assim como You *et al.* (2020), que isolaram três cepas probióticas de grãos de kefir tibetano capazes de produzir EPS utilizando leite pasteurizado como meio de cultivo.

As BAL podem ser aplicadas em alimentos, em consequência do potencial probiótico, como os principais gêneros *Lactobacillus*, *Lacticaseibacillus* e, como culturas iniciadoras em processos fermentativos (*Lactobacillus*, *Streptococcus*) (Bintsis, 2018).

O potencial probiótico das BAL se deve aos benefícios que esses microrganismos podem gerar à saúde do hospedeiro, quando administrados em quantidades adequadas (FAO/OMS, 2002; Hill *et al.*, 2014). Os probióticos presentes nos alimentos oferecem ao consumidor vantagens como regulação

da resposta imune, manutenção de uma microbiota intestinal saudável e menores níveis de colesterol (Villalobos *et al.*, 2020).

Durante o processo fermentativo, ou as BAL podem produzir apenas ácido láctico como principal produto gerado, classificando-as como homofermentativas, ou podem produzir, além de ácido láctico, ácido acético, etanol e CO₂, caracterizando-as como heterofermentativas (Giraffa; Chanishvili; Widyastuti, 2010). Produzem também metabólitos bioativos que apresentam efeitos promotores de saúde (Harutoshi, 2013). Dentre esses estão enzimas, vitaminas (Folato), peptídeos bioativos, ácido gama-aminobutírico, ácido linoleico conjugado, bacteriocinas e exopolissacarídeos (EPS) (Linares *et al.*, 2017).

As BAL capazes de produzir EPS são de grande interesse para a indústria de laticínios, visto que características como textura e viscosidade dos alimentos fermentados podem ser melhoradas na presença destes compostos. Da mesma forma, os EPS contribuem nas propriedades sensoriais do alimento devido à sua capacidade de inibir a sinérese, problema que compromete a qualidade dos lácteos fermentados (Feldmane; Semjonovs; Ciprovica, 2013).

Outro ponto importante é que, quando consumidos, os alimentos contendo EPS favorecem o desenvolvimento de microrganismos benéficos à saúde intestinal e a produção de compostos bioativos (Salazar *et al.*, 2011; Hamet *et al.*, 2016).

De acordo com Patel; Majumder; Goyal (2012), as BAL produtoras de EPS são frequentemente utilizadas para a produção de iogurte, queijo, leite acidificado e sobremesas à base de leite. Entretanto, ainda se torna necessária a busca por novas fontes de polissacarídeos microbianos, visto que o rendimento e produção deste metabólito depende do microrganismo e das condições de cultivo utilizadas (Williams; Wimpenny, 1977). Dentre os EPS microbianos, aqueles produzidos por BAL têm se destacado devido à sua variabilidade estrutural e gama de aplicações (Silva, 2022).

3.3 Exopolissacarídeos produzidos por BAL

Os EPS produzidos por BAL são biopolímeros lineares de cadeia longa, possuem um alto peso molecular e apresentam cadeias laterais, formadas por ligações α - e β -glicosídicas. São responsáveis por proteger as células bacterianas contra condições desfavoráveis do meio, como variações de temperatura e pH; fatores biológicos e, além disso, auxiliam na colonização do meio devido à sua capacidade de adesão nas células e formação de biofilmes (Berthold-Pluta *et al.*, 2019).

Cerca de 165 espécies de *Lactobacillus* foram reconhecidas como produtoras de EPS, incluindo *L. plantarum*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. casei*, *L. brevis*, *L. curvatus*, *L. helveticus*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus* e *L. johnsonii* (Badel; Bernardi; Michaud, 2011). Resultados obtidos para outros gêneros demonstraram a capacidade de produção e aumento da produtividade de EPS por otimização dos parâmetros de cultivo. (Vosough *et al.*, 2022) avaliaram a capacidade produtora de EPS a partir de algumas cepas de *Enterococcus*, além de maximizar a síntese destes compostos. Da mesma forma, Buksa; Kowalczyk; Boreczek (2021) obtiveram a produção de EPS, sob condições padronizadas, através de quatro cepas de *Weissella confusa/cibaria*, obtendo o maior rendimento (47,1%), utilizando a linhagem 3MI3.

EPS podem ser excretados pelas células bacterianas para o meio extracelular ou podem ficar ligados à superfície celular, formando uma cápsula (Patel; Majumder; Goyal, 2012). A biossíntese de EPS pode ser controlada através da regulação da expressão gênica das enzimas e proteínas supracitadas envolvidas no processo como glucansucrase, levansucrase e glicosiltransferase (Ciszek-Lenda, 2011; Dertli *et al.*, 2016).

Levando em consideração sua composição química, os EPS podem ser classificados em dois grupos: homopolissacarídeos (HoPS), constituídos por um único tipo de subunidade de açúcar com iguais ou diferentes ligações, e heteropolissacarídeos (HePS), formados por unidades repetidas de dois ou mais tipos de resíduos de monossacarídeos (Angelin; Kavitha, 2020; Rajoka *et al.*, 2020).

Os HoPS são sintetizados a partir da sacarose através da ação da enzima glicansucrase. Devido à presença de glicose, frutose ou galactose em sua cadeia, os HoPS são conhecidos como glucanos, frutanos ou poligalactanos (Monsan *et al.*, 2001; Badel; Bernardi; Michaud, 2011). Já os HePs possuem estruturas mais complexas formadas geralmente por glicose, galactose e ramnose. Sua síntese ocorre através da polimerização de precursores de nucleotídeo de açúcar, como o UDP-glicose e UDP-galactose, podendo apresentar também grupos fosfato e acetil em sua cadeia (Vuyst; Degeest, 1999; Welman; Maddox, 2003).

Cepas de *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* e *Enterococcus* são comumente produtoras de HePS e podem ser isoladas de produtos lácteos fermentados, do trato gastrointestinal humano e fezes. Dentre as BAL produtoras de HoPS, podemos citar as cepas de *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* e *Weissella*, encontradas no trato gastrointestinal animal, vegetais e bebidas fermentadas (Xu *et al.*, 2019).

3.3.1 Condições de cultivo

Condições ambientais adversas, 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 afetar o rendimento e produção de EPS (Werning *et al.*, 2022). Segundo Nguyen *et al.* (2020), quando expostas às condições extremas, as BAL sofrem alterações em seu metabolismo, levando ao aumento da síntese de EPS, como um mecanismo de defesa.

Considerando uma aplicação tecnológica para esse metabólito, é imprescindível que a produção seja eficiente, não somente para aumentar o rendimento, mas também para garantir sua funcionalidade. Para isso, o estresse ambiental pode ser utilizado como estratégia para otimização da produção de EPS (Werning *et al.*, 2022). Vosough *et al.* (2022) otimizaram a produção de EPS através da variação dos valores de pH e temperatura utilizando isolados de *Enterococcus* e obtiveram produção máxima de 3,15 g/L com suplementação de sacarose como fonte de carbono. Da mesma forma,

Jiang *et al.* (2022) avaliaram tempo de fermentação, pH inicial e concentração de inóculo para otimização de EPS por *Lactiplantibacillus pentosus* B8, obtendo uma produção de 1,4 g/L.

Visto que esses metabólitos são produzidos pelas BAL para facilitar sua adaptação no meio, a manipulação das condições de cultivo pode ser utilizada para obtenção de uma maior concentração de EPS, permitindo otimizar a produção de EPS, aumentando seu rendimento e possibilitando sua aplicação, na indústria de alimentos (Thanh *et al.*, 2014).

3.3.2 Propriedades fisiológicas de EPS

A aplicação de BALS produtoras de EPS em alimentos além de melhorar as características reológicas e sensoriais, oferecem benefícios à saúde do consumidor através da atividade imunomoduladora, antioxidante, antitumoral, propriedade antibacteriana e capacidade de redução dos níveis de colesterol sanguíneo (Ryan *et al.*, 2015; Yildiz; Karatas, 2018).

As funções fisiológicas, bem como as propriedades tecnológicas destes compostos, dependem de características estruturais como peso molecular, composição dos monossacarídeos, padrão de ligação do açúcar, grupo funcional e substituintes não carboidratos (Xu *et al.*, 2018). A partir disso, diversos estudos vêm sendo realizados a fim de investigar os efeitos benéficos que o consumo de alimentos contendo EPS podem trazer.

Na literatura, há relatos de que a colonização de cepas probióticas no trato gastrointestinal é facilitada pela produção de EPS, visto que a camada de EPS formada permite uma maior tolerância às condições adversas como pH ácido, presença de sais biliares e enzimas digestivas, além da adesão deste metabólito às células epiteliais intestinais (Caggianiello; Kleerebezem; Spano, 2016; Darilmaz, 2013; London *et al.*, 2014).

Já em estudos que analisaram as propriedades antioxidantes de EPS, como Almalki (2020), foi observado uma atividade antioxidante superior a 60%, comparado ao padrão, ao avaliar EPS produzido por *Lactobacillus lactis* isolado de leite fermentado. A atividade antioxidante dos EPS se deve à sua

capacidade de estimular o aumento dos níveis de enzimas antioxidantes como a catalase e a superóxido dismutase (Lynch *et al.*, 2018; Pan; Mei, 2010).

Os EPS microbianos também podem ter efeitos antitumorais como foi demonstrado no estudo realizado por Sheng *et al.* (2022), onde EPS produzidos por *Lactobacillus pantheris* TCP102 inibiram a proliferação de células de câncer de cólon humano, câncer de ovário e câncer gástrico. A atividade antitumoral dos três EPS testados variou de moderada a forte, apresentando taxa de inibição de até 71,55% contra células A-2780 (câncer de ovário), durante 72h de tratamento. A diferença de inibição constatada pode estar relacionada à composição de monossacarídeos, peso molecular e tipos de ligação glicosídica do EPS.

De acordo com Saadat *et al.* (2019), os exopolissacarídeos tem a capacidade de estimular o sistema imunológico através de, principalmente, linfócitos T, linfócitos B, macrófagos e indução da liberação de interleucina por células NK, promovendo um efeito antitumoral. Podem apresentar também efeitos apoptóticos e antiangiogênicos devido sua influência na expressão de c-Myc, c-Fos e fator de crescimento endotelial vascular, atuando, desta forma, como adjuvante anticarcinogênico.

Já o efeito hipocolesterolêmico foi avaliado por Gawande *et al.* (2021), que utilizaram cepas de BAL produtoras de EPS, e obtiveram uma diminuição de até 85% do colesterol. Este resultado pode ser atribuído ao EPS produzido, visto que, em condições gastrointestinais, o mesmo apresentou melhor desempenho do que as próprias BAL. Podendo assim, ser considerado um promissor agente hipocolesterolêmico para aplicação em alimentos.

3.4 Aplicação de BAL e EPS na indústria de alimentos

Na indústria de alimentos, os EPS produzidos por BAL são compostos de interesse, pois além dos efeitos benéficos à saúde, 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 (viscosidade, cremosidade)

(Caggianiello; Kleerebezem; Spano, 2016; Prabhakar; Das; Sen, 2009; Patel *et al.*, 2010; Polak-Berecka *et al.*, 2013).

A viscosidade conferida aos produtos lácteos através da adição de BAL produtoras de EPS é resultado da capacidade do EPS de se ligar à água e interagir com as proteínas do leite, característica importante ao paladar do consumidor, que espera uma textura homogênea. Além disso, dependendo da concentração, a viscosidade do fermentado pode aumentar devido à formação de uma rede polimérica ocasionada pelo complexo EPS-EPS ou EPS-proteínas (Lynch *et al.*, 2018).

Quando adicionados em produtos à base de cereais, como pães, os EPS melhoram a qualidade do alimento, aumentando a maciez do miolo, o volume da massa e também a vida útil do produto. Isso acontece em virtude da sua capacidade de se ligar à água e interagir com componentes do glúten ou amido (Lacaze; Wick; Cappelle, 2007; Xu *et al.*, 2020).

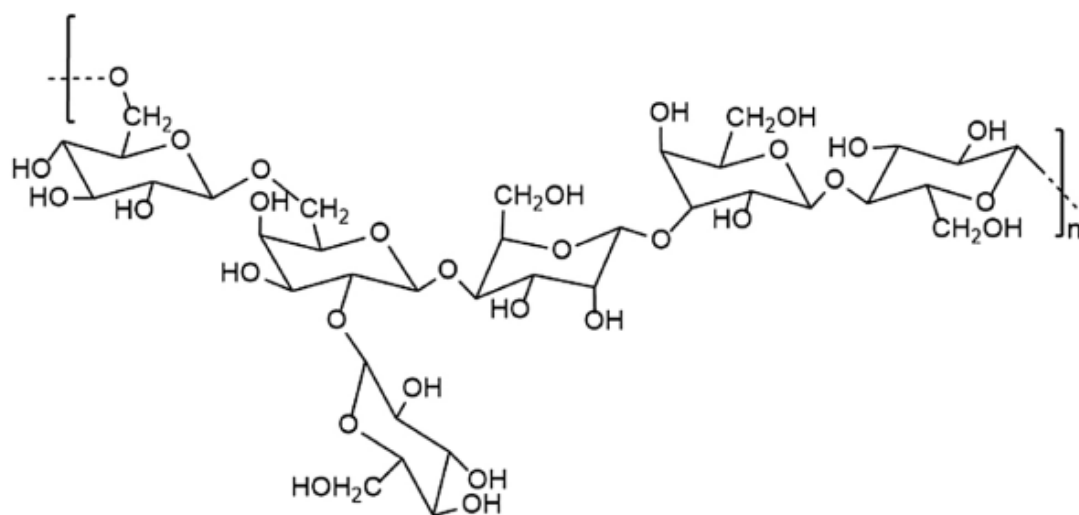
A produção de EPS *in situ* por BAL durante a fermentação traz benefícios à indústria de alimentos, pois reduz a sinérese, aumenta a firmeza, além de melhorar propriedades emulsionantes e espessantes, podendo dispensar a adição de outros polissacarídeos no alimento. Entretanto, estes compostos também podem ser purificados e utilizados como bioingrediente, permitindo a aplicação de uma concentração conhecida, mantendo o processo de produção do alimento mais controlado (Lynch *et al.*, 2018).

Dentre os polissacarídeos, o kefiran, representado na Figura 2, é um importante metabólito que pode ser utilizado como aditivo alimentar e agente gelificante, devido à sua capacidade de formar géis em baixas temperaturas (Rimada; Abraham, 2006; Zavala *et al.*, 2015). Ainda pode ser utilizado para produção de filmes comestíveis, visto que embalagens adequadas podem ser fabricadas por meio destes filmes, possibilitando uma melhoria na qualidade e propriedades físico-químicas dos alimentos, aumento da vida útil e efeitos promotores de saúde (Piermaria *et al.*, 2009, 2011; Zolfi *et al.*, 2015).

O kefiran é um EPS ramificado, solúvel em água, formado por unidades iguais de glicose e galactose, encontrado nos grãos de kefir. Possui massa molecular variando de 55 a 10.000 kDa dependendo das condições de

purificação e isolamento (Kooiman, 1968; Júnior; Vieira; Anjos, 2020). Bactérias ácido-láticas do gênero *Lactobacillus*, como *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lactobacillus kefirgranum*, *Lactobacillus parakefir*, *Lactobacillus kefir* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, são responsáveis pela produção deste metabólito que pode ser altamente variável (Micheli *et al.*, 1999). Cheirsilp *et al.* (2018) produziram 0,48 g/L de kefiran utilizando *Lactobacillus kefiranofaciens* em condições ideais de fonte de carbono e nitrogênio.

Figura 2 - Representação da estrutura química do kefiran



Fonte: Micheli *et al.* (1999)

Além dos citados, diferentes tipos de EPS podem ser produzidos pelo gênero *Leuconostoc*. A bioatividade e propriedades tecnológicas destes compostos estão diretamente relacionadas à cepa e à estrutura química (Zikmanis *et al.*, 2020). *Leuconostoc mesenteroides* é considerada uma importante espécie produtora de EPS para a indústria de alimentos devido à sua aplicação em produtos fermentados, como vinhos (König; Uden; Fröhlich, 2009).

4. Material e Métodos

4.1. Material

Cinco amostras de kefir foram mantidas com a adição de leite UHT integral nos grãos de kefir e fermentação à temperatura ambiente ($\pm 25\text{ }^{\circ}\text{C}$), por 48 h. A bebida fermentada juntamente com os grãos foram armazenados após a fermentação, em refrigeração ($\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$) por sete dias e assim sucessivamente, até o início dos experimentos. As amostras foram doadas por consumidores das cidades de Rio Grande, Pelotas, São Lourenço do Sul e Pinheiro Machado, que produzem esse leite fermentado artesanalmente. O pH das amostras variou entre 3,5 a 4,1.

4.2. Métodos

4.2.1 Isolamento e caracterização de bactérias ácido-láticas (BAL)

O isolamento de BAL foi realizado a partir dos grãos de kefir e do leite fermentado das amostras de kefir, conforme metodologia de Vitola *et al.* (2018), com adição de azida sódica (HiMedia®, Brasil), com o objetivo de inibir a multiplicação de leveduras. A metodologia consistiu em homogeneizar 25 g e/ou 25 mL de cada amostra de kefir em 225 mL de água peptonada 0,1% (HiMedia®, Brasil) em *stomacher* durante 10 min. Posteriormente, uma alíquota de 1 mL de cada amostra foi adicionada em 9 mL de água peptonada 0,1%, para a realização de diluições decimais seriadas até a diluição 10^{-4} . Então, foi inoculado 0,1 mL de cada diluição em placas contendo ágar seletivo MRS (De Man, Rogosa e Sharpe) (Kasvi®, Brasil) e M17 (Himedia®, Brasil), adicionados de 0,02% de azida sódica (HiMedia®, Brasil) e espalhado com o auxílio de uma alça de Drigalski. As placas foram incubadas em jarras de anaerobiose, por um período de 72 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Após a etapa de incubação, foram selecionadas pelo menos 10 colônias de cada amostra de kefir, inoculadas em caldo MRS (Kasvi®, Brasil) com incubação de 24 h, que, posteriormente, passaram pelo processo de purificação utilizando ágar MRS e na sequência, foram submetidas aos testes de coloração de Gram. O teste de coloração de Gram (Laborclin®, Brasil) consistiu em corar um esfregaço bacteriano (obtido das colônias crescidas em

ágar), previamente fixado pelo calor em lâmina de vidro, com cristal violeta durante 1 min, seguido de lavagem com água corrente, adição de lugol por 1 min, lavagem com água corrente e exposição à solução descorante por 20 s. Posteriormente, o esfregaço foi corado com fucsina pelo período de 1 min, lavado com água corrente e seco levemente, a fim de retirar o excesso de umidade. Por fim, uma gota de óleo de imersão foi inserida sobre o esfregaço e a leitura dos resultados realizada em microscópio óptico (aumento de 400X e 1000X) (Holt, 1994).

4.2.2 Avaliação dos parâmetros de segurança microbiológica

4.2.2.1 Produção da enzima catalase

O método para avaliação da presença da enzima catalase nos isolados compreendeu em adicionar 2 gotas de H₂O₂ 3% (v/v) (Dinâmica®, Brasil) em lâmina de vidro, seguido da adição de uma alçada do isolado. O resultado foi observado através da produção e liberação de O₂, caracterizado pela formação de bolhas, no momento em que as células dos isolados entraram em contato com o reagente. Com isso, interpretou-se como catalase positiva a liberação de O₂ e, conseqüentemente, efervescência, e como catalase negativa a ausência de reação, não ocorrendo efervescência (Forsythe, 2013).

4.2.2.2 Atividade da enzima DNase

Os isolados, previamente ativados em caldo MRS por 24 h a 37 °C, foram inoculados em placas contendo ágar DNase (Acumedia®, Brasil), para determinação da produção da enzima DNase. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h, e a leitura dos resultados foi realizada após a adição de solução de ácido clorídrico 1N (Dinâmica®, Brasil). O resultado positivo para produção da enzima foi comprovado através do aparecimento de zonas transparentes ao redor da colônia dos isolados. As bactérias *S. aureus* ATCC 25923 e *L. sakei* subsp. *sakei* ATCC 15521 foram utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente (Kateete *et al.*, 2010).

4.2.2.3 Atividade Hemolítica

A presença de hemolisinas foi determinada a partir da ativação de bactérias ácido-láticas em caldo MRS (Kasvi®, Brasil) por 24 h a 37 °C e

posterior transferência dos isolados para ágar Trypticase Soy (TSA) (Kasvi®, Brasil) suplementado, previamente, com 7% de sangue de equino desfibrinado. Como controle positivo foi utilizado *L. monocytogenes* ATCC 7644. Após o período de 24 h de incubação a 37 °C, a reação hemolítica foi avaliada observando a lise parcial dos glóbulos vermelhos (α -hemólise) através do aparecimento de zonas verdes ao redor da colônia dos isolados, e a lise total (β -hemólise) através do aparecimento de zonas transparentes (Eaton; Gasson, 2001).

4.2.2.4 Atividade da enzima gelatinase

A atividade da enzima gelatinase foi determinada por meio da inoculação dos isolados, previamente ativados em caldo MRS (Kasvi®, Brasil) por 24 h a 37 °C, em tubos com meio de cultura preparado com 10 g/L de extrato de levedura (Kasvi®, Brasil), 15 g/L de triptona (Kasvi®, Brasil) e 120 g/L de gelatina (Dr.Oetker, Brasil). Após, os tubos foram incubados a 30 °C por 7 dias e, ao final deste período, os mesmos foram mantidos sob refrigeração a 8 °C por 30 min, o resultado foi observado a partir do estado físico do meio de cultivo.

O resultado positivo para a atividade da enzima foi indicado pela transformação do meio do estado sólido para o estado líquido, e o resultado negativo foi caracterizado pela permanência do meio em estado sólido. Como controle positivo e negativo foi utilizado *S. aureus* ATCC 25923 e *E. coli* ATCC 8739, respectivamente (Pereira *et al.*, 2009).

4.2.2.5 Susceptibilidade a antimicrobianos de uso clínico

A susceptibilidade dos isolados aos antimicrobianos foi avaliada pelo método de difusão em ágar, utilizando o meio de cultivo Mueller-Hinton (Kasvi®, Brasil) (CLSI, 2020). Os antimicrobianos (Laborclin®, Brasil) testados foram: ampicilina (10 µg), ciprofloxacina (5 µg), clorafenicol (30 µg), eritromicina (15 µg), gentamicina (10 µg), penicilina G (10 µg), vancomicina (30 µg) e tetraciclina (30 µg).

Os resultados foram avaliados através das medidas dos diâmetros das zonas de inibição, sendo considerados isolados resistentes (≤ 15 mm), com

sensibilidade intermediária (16-20 mm) ou sensíveis (≥ 21 mm), de acordo com Viková *et al.* (2006).

4.2.3 Avaliação de propriedades tecnológicas

4.2.3.1 Avaliação da produção de exopolissacarídeos (EPS)

A capacidade de produção de EPS pelos isolados foi verificada através do ágar CRA (Congo Red Agar), preparado com caldo BHI (Brain Heart Infusion) (Acumedia®, Brasil) 37 g/L, sacarose (Dinâmica®, Brasil) 50 g/L, ágar-ágar (Merck®, Brasil) 10 g/L e indicador vermelho congo (Vetec®, Brasil) 8 g/L. Para isso, os isolados foram inoculados em placas contendo meio CRA e incubados a 37 °C por 24 h em jarros de anaerobiose. 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 foram consideradas produtoras de EPS (Freeman; Falkiner; Keane, 1989). Somente os isolados que apresentaram resultado positivo nesta avaliação, seguiram para as próximas análises.

4.2.3.2 Fermentação de carboidratos

O teste foi realizado seguindo a metodologia descrita por Lima *et al.* (2009). Os testes de fermentação de carboidratos foram preparados utilizando meio de cultura base, preparado com 10 g/L de água peptonada (HiMedia®, Brasil), 1 g/L de extrato de carne (Kasvi®, Brasil), 5 g/L de NaCl (Dinâmica®, Brasil), 15 g/L de ágar-ágar (Merck®, Brasil) e 0,02 g/L do indicador de pH púrpura de bromocresol (Vetec®, Brasil), com adição do carboidrato testado (Dinâmica®, Brasil) (glicose, lactose, sacarose, galactose, maltose, manose e frutose) em uma concentração de 10%. Após incubação a 37 °C durante 24 h-48 h, a leitura do resultado foi verificada pela mudança de coloração para amarelo, indicando resultado positivo, ou coloração vermelho-rosada, indicando resultado negativo.

A partir da fermentação de carboidratos, os isolados foram avaliados quanto ao seu perfil homofermentativo ou heterofermentativo. Para isso, os isolados foram inoculados em tubos contendo meio MRS (Kasvi®, Brasil) suplementado com 3% de glicose (Dinâmica®, Brasil), acrescidos de tubo de Durham. Após incubação a 37 °C por 24h – 48 h, os isolados que se

multiplicaram, turvando o caldo, e não produziram gás foram caracterizados como homofermentativos, e os isolados que, além de turvar o caldo tiveram a capacidade de produzir gás, formando bolhas dentro do tubo de Durham, foram considerados heterofermentativos.

4.2.4 Análises moleculares

A extração do DNA genômico foi realizada conforme a metodologia proposta por Green *et al.* (2012). O protocolo é realizado utilizando pérolas de vidro, 1 mL de cultivo recente, além dos reagentes STES, fenol clorofórmio (Synth®, Brasil), etanol absoluto (Synth®, Brasil) e cloreto de sódio 5M (Synth®, Brasil). O *pellet* formado após a extração foi lavado com 125 µL de álcool 70% e incubado a 37 °C com *eppendorf* invertido para secagem. O armazenamento foi realizado em freezer (-20 °C) após eluição do *pellet* em 35 µL de água ultra pura e adição de 1 µL de RNase (Invitrogen®, Brasil).

4.2.4.1 Identificação de gênero e espécie

As amostras de DNA dos isolados selecionados foram enviadas à empresa ACTgene análises moleculares Ltda (Alvorada, Rio Grande do Sul, Brasil) para identificação genotípica por meio do sequenciamento do gene 16S do rDNA.

O programa Contig Express (Vector NTI, Invitrogen) foi usado para analisar o fragmento sequenciado e a ferramenta BLAST, do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), foi utilizada para comparar a similaridade do resultado com sequências depositadas no *GenBank* (NCBI BLAST).

4.2.4.2 Identificação do gene que codifica EPS

A identificação do gene que codifica EPS foi realizada através da amplificação de um fragmento de 189 pb do gene *priming* glicosiltransferase (*priming*-GT) utilizando *primers* (Gbt oligos®, Brasil) degenerados (Forward: 5' - TCATTTTATTCGTAAACCTCAATTGAYGARYTNCC-3', Reverse: 5' - AATATTATTACGACCTSWNAYYTGCCA-3') (Provencher *et al.*, 2003).

Para isso, os componentes para PCR foram 12,5 µL green master mix (Cellco®, Brasil), 2 µL de cada *primer*, 8,5 µL de água livre de nucleasse e 2 µL de DNA bacteriano (≈20 ng/µL), conforme instrução do fabricante do *mix* utilizado. O processo consiste nas etapas de incubação inicial (94 °C/9 min); 5

ciclos de: desnaturação inicial (94 °C/30 s), anelamento (62 °C/30 s) e extensão (72 °C/30 s); e 35 ciclos de: desnaturação (94 °C/30 s), anelamento (52 °C/30 s), extensão (72 °C/30 s) e extensão final (72 °C/10 min). Após o procedimento, os produtos amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose (Vosough *et al.* 2022). *Streptococcus thermophilus* e água foram utilizados como controle positivo e negativo, respectivamente.

4.2.5 Produção, obtenção e quantificação de EPS em meio de cultura

A verificação da produção de EPS foi realizada para os isolados que além de apresentarem o gene de produção de EPS, também apresentaram resultado positivo no teste tecnológico citado no item 4.2.3. Para isso, foi utilizada a metodologia proposta por Dabour *et al.* (2005) com modificações propostas por Ali *et al.* (2020) e Lima *et al.* (2008) em relação ao tempo de exposição ao etanol e à concentração de ácido tricloroacético utilizada. Os isolados foram cultivados em 500 mL de caldo MRS (Kasvi®, Brasil) e mantidos a 37 °C por 72 h, sob condições anaeróbicas. A obtenção do EPS produzido foi realizada após o período de incubação. Com esse propósito, o frasco foi colocado em banho-maria a 100 °C por 30 min para inativar as enzimas endógenas e dispersar o EPS ligado às células. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 5.000 *g* por 20 min a 4 °C, para separar as células microbianas bem como as proteínas solidificadas.

Foi adicionado ácido tricloroacético (Dinâmica®, Brasil) 80% (v/v) na amostra livre de células, em uma proporção 1:6 (v/v), para precipitação de proteínas, que foram retiradas através de centrifugação a 7.197 *g* por 35 min a 20 °C. O EPS suspenso no sobrenadante foi precipitado pela adição de dois volumes de etanol (Dinâmica®, Brasil) por volume de sobrenadante. E o conteúdo de EPS do sobrenadante, foi coletado via centrifugação a 7.197 *g* por 35 min a 4 °C e dissolvido em água destilada estéril.

Para realizar a quantificação de EPS, o método fenol-ácido sulfúrico modificado com glicose como padrão foi utilizado para a determinação do teor de açúcares totais das amostras. O método consiste em misturar 1 mL da amostra com 0,5 mL de solução aquosa de fenol (Dinâmica®, Brasil) a 5% (5

g/100 mL de água destilada). Seguido de adição de 2,5 mL de ácido sulfúrico (Dinâmica®, Brasil) (VI) a 95% (v/v), incubação a 20 ± 2 °C por 10 min e, agitação por 30 s. Posteriormente, as amostras foram incubadas por 20 min em banho-maria a 25 °C. A leitura da absorbância foi realizada no comprimento de onda $\lambda=490$ nm. Água destilada foi utilizada como controle de reação (Dubois *et al.*, 1956).

Dentre os isolados que apresentaram maior produção de EPS, somente um foi selecionado para a etapa de avaliação dos efeitos das condições de cultivo para produção de EPS.

4.2.6 Avaliação dos efeitos da concentração de inóculo, temperatura e pH na produção de EPS

Realizada a partir da alteração das condições de cultivo do isolado em meio MRS (Kasvi®, Brasil) 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 2^3 de acordo com a Tabela 1 e 2.

Tabela 1 - Variáveis e níveis decodificados dos experimentos do Delineamento Fatorial Completo para avaliação da produção de exopolissacarídeos

Variáveis decodificadas	Níveis decodificados		
	-1	0	+1
X1, concentração de inóculo (%)	2,5	3,0	3,5
X2, temperatura (°C)	32	36	40
X3, pH	5,0	6,0	7,0

Tabela 2 - Variáveis e níveis codificados dos experimentos do Delineamento Fatorial Completo para avaliação da produção de exopolissacarídeos

Ensaio	Níveis e variáveis codificados		
	X1	X2	X3
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
9	0	0	0
10	0	0	0

Para obtenção e quantificação do EPS produzido nesta etapa, as amostras passaram pelo mesmo processo descrito no item 4.2.5.

4.2.7 Otimização da produção de EPS a partir da variação de pH e temperatura

Realizada a partir da alteração das condições de cultivo do isolado em meio MRS (Kasvi®, Brasil) durante 24 h de fermentação. Com base nos resultados obtidos no item 4.2.6, a concentração de inóculo foi fixada em 3% e os parâmetros utilizados foram a variação da temperatura (30 °C, 36 °C e 42 °C) e pH (4,0, 5,0 e 6,0). Os efeitos principais e de interação foram avaliados utilizando o planejamento Fatorial do tipo Composto Central Rotacional (RCCD), com região quadrada (2^2), região estrela (pontos axiais - α) e ponto central (PC). Os níveis codificados utilizados foram: -1 e 1 na região 2^2 , -1,41 e 1,41 na região estrela, e 0 no PC. Foram utilizados quatro α e três repetições autênticas no PC, totalizando 11 experimentos (Tabelas 3 e 4). O número de experimentos (N) e α foram estimados utilizando o número de variáveis estudadas (k) e o número de repetições no PC, conforme as seguintes expressões matemáticas:

$$N=2^k+2*\alpha+PC \quad (1)$$

$$\alpha = \sqrt[4]{2^k} \quad (2)$$

Após o desenvolvimento do RCCD, em ordem aleatória, a produção de EPS foi avaliada, conforme apresentado no item 4.2.5. O Planejamento Experimental bem como a resposta foram avaliados no *software Design Expert* (versão 6.0.4) para obter um modelo preditivo univariado, sendo esse modelo avaliado quanto à significância da regressão e falta de ajuste por Análise de Variância (ANOVA) com 95% de confiança, e a precisão do modelo foi avaliada por coeficiente de determinação (R^2) e coeficiente de determinação ajustado (R^2_{ajustado}). O modelo preditivo foi estimado, conforme a seguinte expressão matemática:

$$y = \beta_0 + \sum_i \beta_i x_i + \sum_i \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j} \sum_j \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon_i \quad (3)$$

Onde y é a resposta ou variável dependente, x_i e x_j correspondem a variável independente, β_0 , β_i , β_{ii} e β_{ij} são os parâmetros do modelo de regressão, ou coeficientes, e ε_i o erro determinado.

O software Statistica (versão 7.0) foi utilizado para plotar a relação linear entre os valores previstos pelo modelo preditivo e os valores observados, além da superfície de resposta e curvas de contorno. Após a identificação da condição experimental, prevista pelo modelo preditivo como região ótima de trabalho para obtenção de máxima produção de EPS, foi realizado a validação experimental com três repetições autênticas. O resultado da validação e o previsto pelo modelo, foram avaliados em teste t de Student com 95% de confiança.

Tabela 3 - Variáveis e níveis decodificados dos experimentos do planejamento Fatorial do tipo Composto Central Rotacional para avaliação da produção de exopolissacarídeos

Variáveis decodificadas	Níveis decodificados		
	-1	0	+1
X1, temperatura (°C)	30	36	42
X2, pH	4,0	5,0	6,0

Tabela 4 - Variáveis e níveis codificados dos experimentos do planejamento Fatorial do tipo Composto Central Rotacional para avaliação da produção de exopolissacarídeos

Ensaio	Níveis e variáveis codificados	
	X1	X2
1	-1	-1
2	-1	+1
3	+1	-1
4	+1	+1
5	0	-1,41
6	0	+1,41
7	-1,41	0
8	+1,41	0
9	0	0
10	0	0
11	0	0

Para obtenção e quantificação do EPS produzido nesta etapa, as amostras passaram pelo mesmo processo descrito no item 4.2.5.

5. Resultados e discussão

5.1 Isolamento e caracterização de bactérias ácido-láticas (BAL) provenientes de kefir

A partir do isolamento realizado utilizando os grãos e o leite fermentado de cinco amostras de kefir de diferentes cidades da região Sul (RS/Brasil), foram obtidos 44 isolados. Desses, 41 isolados apresentaram características Gram-Positivas e catalase negativa, resultado importante na caracterização de BAL. Apenas 2 isolados apresentaram características Gram-Negativas e um isolado apresentou resultado positivo para a presença da enzima catalase e por esse motivo, foram excluídos do *screening*.

De acordo com Xu *et al.* (2023), o kefir é produzido através da fermentação de bactérias ácido-láticas, leveduras e bactérias acéticas, que atuam em simbiose, formando grãos elásticos e viscosos com tamanho variável (0,5 a 3 cm), forma irregular e que pode apresentar coloração entre branco e amarelo claro. You *et al.* (2020) confirmaram a presença de bactérias e leveduras nos grãos de kefir tibetano através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e realizaram o isolamento e caracterização de três BAL utilizando kefir como matriz.

Xu *et al.* (2023) obtiveram 64 isolados de leveduras e 108 de BAL, procedentes de seis amostras de kefir chinês, e identificaram as espécies *Lactobacillus helveticus*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lactococcus lactis* e *Saccharomyces cerevisiae*. Já Gong (2018) isolou 22 leveduras e 51 bactérias ácido-láticas de 10 amostras de kefir chinês e identificou espécies de leveduras como *Kluyveromyces marxianus* e *Saccharomyces cerevisiae*, e espécies de BAL como *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus kefir* e *Lactocaseibacillus casei*.

5.2 Testes de segurança microbiológica

Em relação aos testes de segurança empregados, dos 41 isolados testados, todos apresentaram resultado negativo para a presença de DNase, enzima capaz de degradar ácido nucleicos (Chaudhuri; Singh, 1992); 40 isolados apresentaram resultado negativo para a presença de gelatinase,

enzima capaz de hidrolisar gelatina, colágeno, caseína, hemoglobina e outros peptídeos bioativos (Thraill et al., 2009); 28 isolados apresentaram perfil γ -hemolítico, 12 isolados apresentaram perfil α -hemolítico e apenas um isolado apresentou perfil β -hemolítico. A hemolisina é uma enzima capaz de lisar eritrócitos do sangue humano, podendo provocar lise parcial das hemácias (α -hemólise) ou lise total (β -hemólise). Quando não há a presença de hemolisinas, o isolado é considerado γ -hemolítico (Pradhan; Mallappa; Grover, 2020). Sendo assim, os isolados (2/41) que apresentaram resultado positivo para a presença da enzima gelatinase e perfil β -hemolítico foram excluídos do *screening*.

Entretanto, no teste de susceptibilidade à antimicrobianos de uso clínico, apenas 14 isolados foram considerados seguros. Os outros 25 isolados apresentaram resistência a um ou mais antimicrobianos testados, sendo eles ampicilina (10 μ g), ciprofloxacina (5 μ g), clorafenicol (30 μ g), eritromicina (15 μ g), gentamicina (10 μ g), penicilina G (10 μ g), vancomicina (30 μ g) e tetraciclina (30 μ g).

Tabela 5 - Análise da susceptibilidade à antimicrobianos de uso clínico dos isolados de bactérias ácido-láticas de kefir (n=14)

Isolado	VAN	AMP	ERI	CIP	TET	CLO	GEN	PEN
KPP1	R	S	S	S	S	S	S	S
KLM1	R	S	S	S	S	S	S	S
KLM2	R	S	S	S	S	S	S	S
KLM3	R	S	S	S	S	S	S	S
KLM4	R	S	S	S	S	S	S	S
KLM5	R	S	S	S	S	S	S	S
KLM6	S	S	S	S	I	S	R	S
KLM7	R	S	S	S	S	S	S	S
KB3	R	S	S	S	S	S	S	S
KG2	R	S	S	S	S	S	S	S
KB1	R	S	S	S	S	S	S	S
KB2	R	S	S	S	S	S	S	S
KG1	R	S	S	S	S	S	S	S

KB4	R	S	S	S	S	S	S	S
VAN: Vancomicina; AMP: Ampicilina; ERI: Eritromicina; CIP: Ciprofloxacina; TET: Tetraciclina; CLO: Cloranfenicol; GEN: Gentamicina; PEN: Penicilina. S: Sensível; I: Intermediário; R: Resistente								

Apesar das BAL serem geralmente consideradas seguras (GRAS), a avaliação do potencial de virulência dos microrganismos prospectados é indispensável para garantir a segurança microbiológica dos isolados, principalmente se o objetivo for a aplicação dos mesmos em produtos alimentícios (Ferrari *et al.*, 2016).

Santos (2023) investigou a produção das enzimas DNase, coagulase e hemolisina em 84 isolados de soro-fermento de queijo. Todos os isolados apresentaram resultado negativo para DNase. A atividade hemolítica foi constatada em 40,45% dos isolados, sendo 5,95% considerados β -hemolíticos (lise total das hemácias) e 34,5% considerados α -hemolíticos (lise parcial das hemácias). Os demais 59,5% não apresentaram perfil hemolítico. Resultados que corroboram com os obtidos no presente estudo, visto que não foi observada a presença da enzima DNase e 68,3% apresentaram perfil γ -hemolítico, 29,3% apresentaram perfil α -hemolítico e 2,4% apresentaram perfil β -hemolítico.

A hemólise é um fator de virulência comumente encontrada em patógenos, entretanto a α -hemólise não é considerada um risco, pois ocorre através da reação do peróxido de hidrogênio, produzido pela bactéria, com a hemoglobina, oxidando-a em metemoglobina verde, cor característica do perfil α -hemolítico (Pradhan; Mallappa; Grover, 2020).

Lima; Carbonera; Helbig (2022) avaliaram o perfil de expressão de virulência fenotípica de 73 isolados de BAL provenientes de queijos artesanais e obtiveram resultado negativo para a presença da enzima gelatinase, o que se assemelha ao resultado obtido no presente estudo, pois 97,6% (40/41) apresentaram resultado negativo para a presença desta enzima.

A avaliação da resistência à antimicrobianos se faz necessária devido a preocupação acerca da troca de material genético entre espécies, especialmente quando se trata de bactérias patogênicas. No entanto, essa resistência pode ser intrínseca, expressa cromossomicamente e não

transferível, ou adquirida através de (i) mutações no genoma bacteriano; (ii) transferência de genes de resistência de plasmídeos ou outros elementos móveis. A resistência intrínseca não é preocupante, pois não é transferível para outros microrganismos, entretanto, a resistência adquirida é considerada um fator de risco pois pode ser disseminada entre bactérias, e tornar resistente, uma bactéria que normalmente seria susceptível a determinado antimicrobiano (Bernardeau *et al.*, 2008; Pradhan; Mallappa; Grover, 2020).

As BAL possuem resistência intrínseca à vancomicina e à gentamicina, característica intransferível entre espécies. Esta resistência pode ser atribuída à presença de enzimas relacionadas à d-alanina-d-alanina ligase, pois impedem a ligação da vancomicina na extremidade citoplasmática de suas paredes celulares ou a ausência de transporte de elétrons pelo citocromo, que permite a captação do antimicrobiano (Talib *et al.*, 2019; Tokatli *et al.*, 2015).

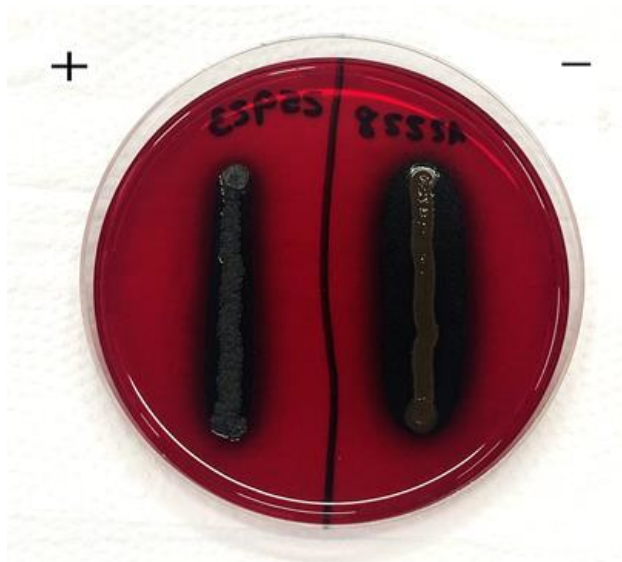
Talib *et al.* (2019) avaliaram 10 isolados de BAL de kefir quanto à sua resistência à antimicrobianos. Todos os isolados avaliados apresentaram resistência à vancomicina e a gentamicina e susceptibilidade à ampicilina, tetraciclina e penicilina. Resultado que corrobora com os resultados apresentados na Tabela 5.

5.3 Testes tecnológicos

5.3.1 Avaliação da produção de exopolissacarídeos (EPS)

A avaliação da produção de EPS foi realizada para os 14 isolados considerados seguros microbiologicamente. A produção de EPS foi observada em 57,1% (8/14) dos isolados testados, onde o resultado positivo foi considerado pelo aparecimento de colônias negras e opacas, conforme Figura 3.

Figura 3 - Avaliação fenotípica da produção de exopolissacarídeos de isolado de bactéria ácido-lática de kefir



Fonte: O autor, 2023

Um estudo realizado por Vousough *et al.* (2022) avaliou a capacidade de produção de EPS de 143 isolados de BAL de kishk, produto lácteo popular na culinária do oriente médio, e obteve resultado positivo para 55,2% (79/143) dos isolados testados, o que corrobora com os resultados obtidos no presente estudo. Os EPS bacterianos são compostos de interesse pois, podem ser utilizados em produtos de alto valor como alimentos, medicamentos e cosméticos. Apesar dos diversos relatos de BAL produtoras de EPS, é importante salientar que a síntese desses metabólitos depende da cepa utilizada e também das condições de cultivo empregadas como composição do meio, pH, temperatura e tempo de incubação (Patel *et al.*, 2012; Vosough *et al.* 2022).

5.3.2 Fermentação de carboidratos

O teste de fermentação de carboidratos foi realizado com os isolados selecionados no item 5.3.1. A Tabela 6 apresenta os resultados de cada isolado no teste de fermentação de carboidratos.

Tabela 6 - Teste de fermentação de carboidratos em isolados de bactérias ácido-láticas de kefir (n=8)

Isolado	MALTO	GA	GLI	MA	SA	FR	LA
KPP1	+	+	+	+	+	+	-
KLM1	+	+	+	+	+	+	+
KLM2	-	-	+	+	+	+	+
KLM3	+	+	+	+	+	+	+
KLM4	+	+	+	+	+	+	+
KLM5	+	+	+	+	+	+	+
KLM6	+	+	+	+	+	+	+
KLM7	+	+	+	+	+	+	+

MALTO: Maltose; GA: Galactose; GLI: Glicose; MA: Manose; SA: Sacarose FR: Frutose; LA: Lactose. (+): Positivo; (-): Negativo

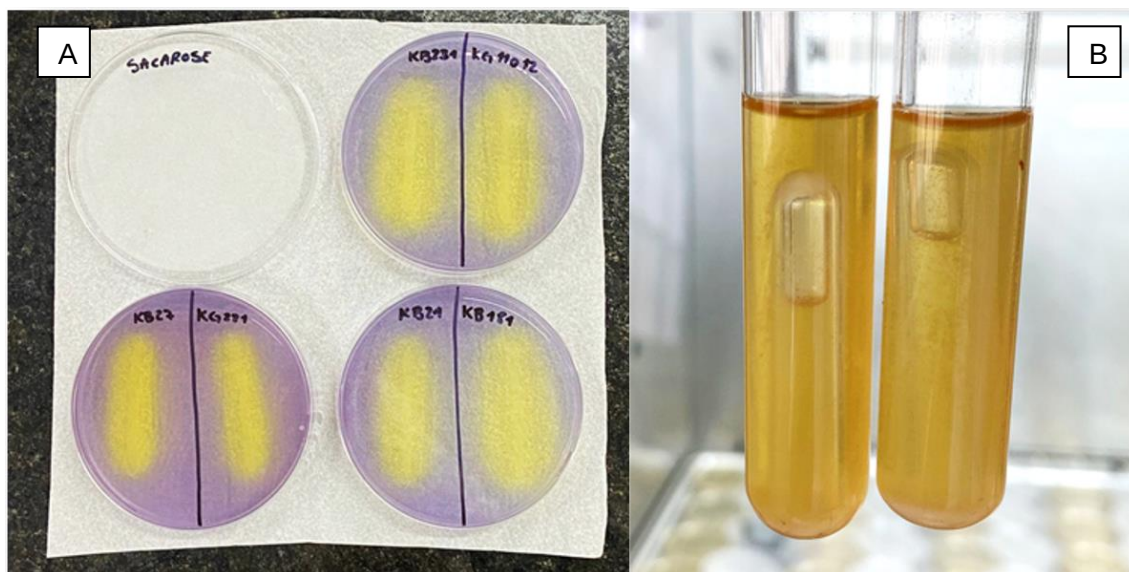
Dentre os 8 isolados testados, 6 isolados foram capazes de fermentar todos os carboidratos suplementados, individualmente, no meio de cultivo, conforme demonstrado na Figura 7A. Assim como Oleksy-Sobczak; Klewicka (2020), que avaliaram o perfil fermentativo de 3 isolados de BAL e obtiveram resultado positivo utilizando os mesmos carboidratos testados neste estudo.

Entretanto, o isolado KPP1 não foi capaz de utilizar, como fonte de carbono, a lactose suplementada no meio de cultivo. Enquanto que, o isolado KLM2 não foi capaz de fermentar os carboidratos maltose e galactose. Em relação à produção de gás, somente o isolado KPP1 não apresentou resultado positivo, todos os outros 7 isolados de BAL provenientes de kefir estudados, apresentaram resultado positivo, caracterizando-os como heterofermentativos (Figura 7B).

Islam *et al.* (2021) avaliaram a capacidade de fermentação de carboidratos de 11 espécies isoladas de leite cru, e encontraram que parte das espécies analisadas (3 e 5) não foram capazes de fermentar a maltose e galactose, respectivamente. Da mesma forma, parte dos isolados (45%) apresentaram perfil homofermentativo, caracterizado pela produção de ácido láctico como produto principal da fermentação, e o restante (55%) apresentou perfil heterofermentativo, caracterizado pela produção de ácido láctico, etanol e

CO₂, observado pela turvação do meio e produção de gás no interior de tubos de Durhan.

Figura 7- Fermentação de carboidratos (A) e produção de gás pela fermentação de glicose (B), dos isolados de bactérias ácido-láticas de kefir



Fonte: O autor, 2023

Sabe-se que a síntese de compostos de interesse, como EPS, é influenciada por condições de cultivo como fonte de carbono, temperatura e pH, que interferem tanto no rendimento quanto na composição química desses metabólitos (Vuyst; Degeest, 1999; Ruas-Madiedo; Salazar; Clar, 2009). Com isso, é importante salientar que a fonte de carbono considerada mais eficiente para a produção de EPS dependerá do isolado de BAL utilizado. Em estudo realizado por Grandi (2010), a maior produção de EPS por *Lactobacillus helveticus* foi observada utilizando frutose. Já Degeest; Vuyst (2000) obtiveram maior rendimento de EPS utilizando lactose para culturas de *Streptococcus thermophilus* LY03.

Do ponto de vista tecnológico, os testes de fermentação de carboidratos e produção de gás pela fermentação da glicose, são importantes visando a aplicação desses isolados na produção de alimentos, pois afetam as características do produto final, e direcionam a prospecção de novos produtos a partir destas características.

5.4 Avaliação genotípica

5.4.1 Identificação de gênero e espécie dos isolados de BAL

Na Tabela 7 é possível observar os resultados obtidos na identificação molecular a partir do sequenciamento do gene 16S do rDNA dos isolados de BAL, provenientes de diferentes amostras de kefir, e comparação com os dados depositados no *GenBank* (NCBI BLAST).

Tabela 7 - Identificação molecular dos isolados de bactérias ácido-láticas provenientes de kefir

Isolado	Gênero e espécie	Grau de similaridade	Código de acesso
KPP1	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	89,10%	NC_008525.1
KLM1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	97,20%	NZ_CP028251.1
KLM2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	96,76%	NZ_CP028251.1
KLM3	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	97,67%	NZ_CP028251.1
KLM4	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	97,67%	NZ_CP028251.1
KLM5	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	97,67%	NZ_CP028251.1
KLM6	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	97,21%	NZ_CP028251.1
KLM7	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	97,66%	NZ_CP028251.1

O isolado KPP1 foi identificado como *Pediococcus pentosaceus* sob código de acesso NC_008525.1, com grau de similaridade de 89,10%. Já os demais isolados foram identificados como *Leuconostoc mesenteroides* sob código de acesso NZ_CP028251.1 com grau de similaridade de aproximadamente 97%.

Zhou *et al.* (2009) realizaram o isolamento de BAL de kefir tibetano e identificaram as espécies *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus kefiranofaciens*. Já You *et*

al. (2020) encontraram espécies como *Lactobacillus helveticus*, *Lactococcus lactis subsp. lactis* e *Lactobacillus pentosus* utilizando kefir como matriz para prospecção de novas cepas de BAL. Em outro estudo, Talib *et al.* (2019) isolaram de kefir, majoritariamente, as espécies *Lactobacillus harbinensis*, *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus plantarum*.

As estirpes do gênero *Leuconostoc* são heterofermentativas e produzem ácido láctico a partir da utilização de lactose e citrato. Na indústria de alimentos, a espécie *Leuconostoc mesenteroides* é comumente utilizada como cultura iniciadora na fermentação de produtos como manteiga e creme, visando a produção de compostos como diacetil, acetoína e 2,3-butanodiol (Cicotello *et al.*, 2018). Além disso, também pode ser utilizada como cultura adjunta a fim de acelerar o amadurecimento de queijos tradicionais e melhorar características sensoriais e nutricionais (Calasso *et al.*, 2020).

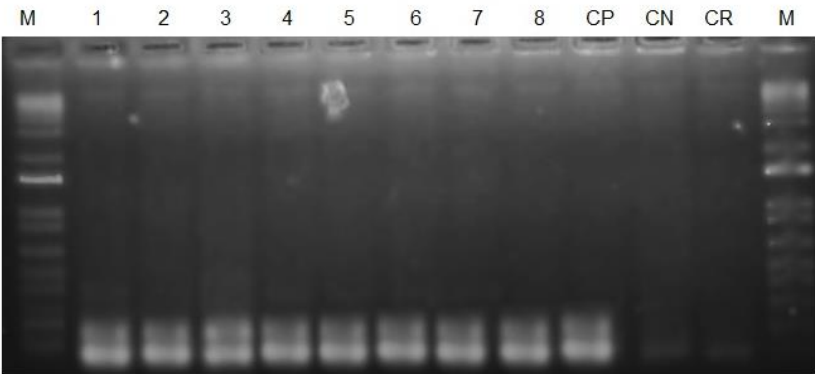
Leuconostoc mesenteroides é também responsável por sintetizar dextrana, um exopolissacarídeo de extrema importância para uso médico e industrial, capaz de incorporar grandes quantidades de água e formar hidrogéis (Díaz-Montes, 2021).

Enquanto que, estirpes do gênero *Pediococcus* são usualmente homofermentativas, podem produzir bacteriocinas e são utilizadas como culturas iniciadoras na fermentação de embutidos cárneos. Além disso, há estudos que indicam que a espécie *Pediococcus pentosaceus* pode ser utilizada como bioconservante para alimentos, bem como atuar como probiótico, oferecendo benefícios à saúde do consumidor (Jiang *et al.*, 2021).

5.4.2 Identificação do gene que codifica a produção de EPS

Os resultados da Reação em cadeia da polimerase (PCR) indicaram que todos os isolados testados continham o gene priming-GT, dando um fragmento amplicon de 189 pb de comprimento, conforme Figura 8. Portanto, foi observado resultado positivo para produção de EPS em todos os isolados testados.

Figura 8 – Fotografia do gel de reação em cadeia da polimerase (PCR) do gene que codifica a produção de exopolissacarídeos em isolados de bactérias ácido-láticas de kefir (n=8)



M: Marcador; 1: KPP1; 2: KLM1; 3: KLM2; 4: KLM3; 5: KLM4; 6: KLM5; 7: KLM6; 8: KLM7; CP: Controle positivo (*Streptococcus thermophilus*); CN: Controle negativo (*Staphylococcus epidermidis*); CR: Controle de reação (água)

O gene priming-GT codifica a enzima glicosil transferase, que é responsável por catalisar a transferência da primeira unidade de açúcar para uma molécula transportadora lipofílica ancorada na membrana celular para produção de EPS. Portanto, sabe-se que este gene desempenha um papel essencial na produção de EPS, dado que foi confirmado pela não produção de EPS após mutações nestes genes (Vosough *et al.*, 2022; Lebeer *et al.*, 2009; Harutoshi, 2013).

Vosough *et al.* (2022) avaliaram a presença do gene priming-GT em 3 isolados de *Enterococcus* e obtiveram resultado positivo para todos os isolados testados. Da mesma forma, Bennama *et al.* (2012) identificaram a presença do gene priming-GT em *Streptococcus thermophilus* isolado de leite cru.

5.5 Produção e quantificação de EPS

Os resultados obtidos para produção de EPS à 37 °C durante o período de 72 h de fermentação pelos 8 isolados em estudo estão apresentados na Tabela 8. A fermentação foi realizada em duplicata.

Tabela 8 - Produção de exopolissacarídeos (EPS) pelos isolados de bactérias ácido-láticas de kefir (n=8) em caldo MRS por 72 h à 37 °C

Isolado	Concentração de EPS (g/L)		
	Amostra 1	Amostra 2	Média ± dp

KPP1	0,329	0,312	0,320 ± 0,012
KLM1	0,243	0,239	0,241 ± 0,003
KLM2	0,241	0,238	0,239 ± 0,002
KLM3	0,274	0,302	0,288 ± 0,020
KLM4	0,314	0,309	0,311 ± 0,003
KLM5	0,326	0,320	0,323 ± 0,004
KLM6	0,388	0,433	0,410 ± 0,032
KLM7	0,392	0,356	0,374 ± 0,025

dp: Desvio padrão

A produção de EPS variou entre 0,239 g/L a 0,410 g/L. Os isolados que apresentaram maior produção de EPS foram KLM6, KLM7 e KLM5 produzindo 0,410 g/L, 0,374 g/L e 0,323 g/L, respectivamente. Comparando com a literatura, a maior concentração de EPS obtida por You *et al.* (2020) foi de 0,185 g/L, utilizando uma cepa de *Lactobacillus pentosus* em matriz láctea, durante 24 h.

Em estudo conduzido por Islam *et al.* (2021) foi avaliado as propriedades tecnológicas de isolados de leite cru após 72 h de fermentação à 37°C. Dentre as espécies estudadas estavam *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* e *Pediococcus pentosaceus* com produção de EPS de 0,088 g/L, 0,075 g/L e 0,023 g/L, respectivamente, resultados inferiores aos obtidos neste estudo.

O rendimento da produção de EPS é considerado cepa dependente, isso significa que o rendimento depende do isolado utilizado, bem como das necessidades nutricionais que o mesmo requer (Williams; Wimpenny, 1977). De acordo com Leroy; De Vuyst (2016), existem diversos fatores que influenciam nas propriedades tecnológicas apresentadas, sendo eles a regulação gênica, a atividade enzimática e a adaptação aos diferentes meios e condições de cultivo. Logo, os resultados obtidos pelo presente estudo podem ter sido influenciados pela matriz, temperatura, cepa, tempo, entre outros.

5.6 Avaliação dos efeitos da concentração de inóculo, temperatura e pH na produção de EPS

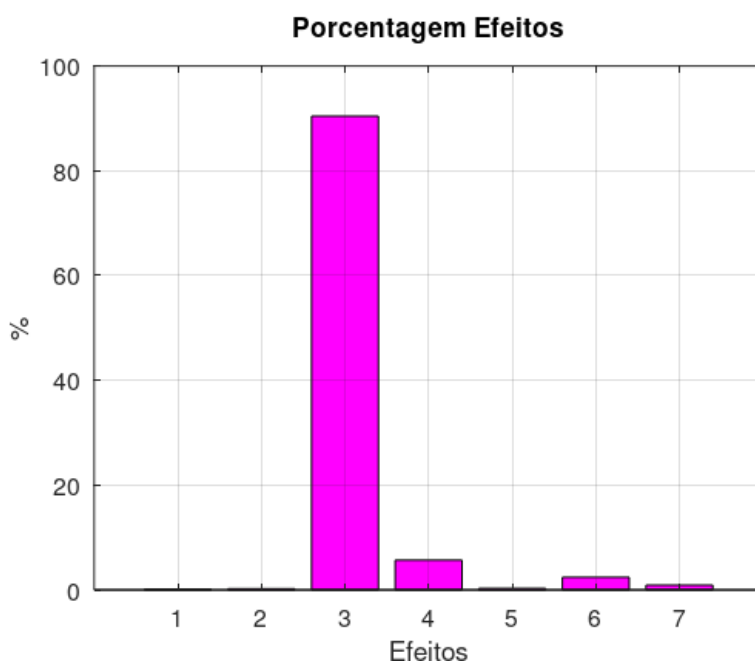
O isolado KLM6 foi selecionado para a avaliação dos efeitos da concentração de inóculo, temperatura e pH, pois apresentou a maior produção de EPS em comparação com os demais isolados estudados. Na Tabela 9 é possível observar os valores reais e codificados das variáveis independentes e os resultados para produção de EPS de cada ensaio.

Tabela 9 – Produção de exopolissacarídeos (EPS) a partir da variação da concentração de inóculo, temperatura e pH pelo isolado KLM6 de bactéria ácido-lática de kefir

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

A partir dos dados apresentados na Tabela 9, foi possível avaliar os efeitos principais e de interação (Figura 9) das variáveis analisadas através do Planejamento Completo do tipo 2³.

Figura 9 – Efeitos das variáveis avaliadas para produção de exopolissacarídeos pelo isolado KLM6 de bactérias ácido-láticas de kefir



(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.

Na Figura 9 é possível observar que somente o pH apresentou efeito positivo (~ 90%) sobre a produção de EPS. A interação entre concentração de inóculo e temperatura apresentou um efeito de 5,7%, o que não é considerado suficiente, entretanto é possível que esse efeito seja aumentado pela modificação dos valores das variáveis em questão.

O delineamento indicou que a produção de EPS aumenta conforme o pH é diminuído, porém não foi possível obter essa informação para as demais variáveis estudadas, pois a variação entre os valores utilizados foi muito pequena, o que resultou em um efeito próximo de zero sobre a produção do metabólito de interesse. Baseado nos efeitos principais e de interação obtidos, foi possível definir o intervalo mais adequado para as variáveis temperatura e pH a ser utilizado na etapa de otimização visando o aumento da produção de EPS.

Vosough et al. (2022) obtiveram um aumento significativo na produção de EPS por um isolado de *Enterococcus* utilizando temperatura de 40 °C e

ajuste do pH em 4,5 na etapa de otimização, obtendo uma concentração de 3,19 g/L de EPS. Enquanto que, Jiang et al. (2022) otimizaram a produção do metabólito por um isolado de *Lactiplantibacillus pentosus* utilizando pH inicial de 6,28, tempo de fermentação de 35,7 h e concentração de inóculo de 3,8%, obtendo concentração de 1,4 g/L de EPS. O que demonstra ser possível, a otimização da produção de EPS, através das variáveis avaliadas neste estudo.

Na Tabela 10 é possível observar os valores reais e codificados das variáveis independentes e os resultados para produção de EPS de cada ensaio na etapa de otimização, obtendo uma concentração de EPS máxima de 0,841 g/L utilizando pH 5 e temperatura de 50,5 °C, correspondente a um aumento de 105,1% no rendimento, quando comparado aos resultados obtidos anteriormente (Tabela 8).

Tabela 10 – Produção de exopolissacarídeos (EPS) a partir da variação da temperatura e pH pelo isolado KLM6 de bactéria ácido-lática de kefir utilizando planejamento Fatorial do tipo Composto Central Rotacional.

Ensaio	Temperatura (°C)	pH	EPS (g/L)
1	30 (-1)	4 (-1)	0,645
2	30 (-1)	6 (+1)	0,230
3	42 (+1)	4 (-1)	0,518
4	42 (+1)	6 (+1)	0,828
5	36 (0)	2,6 (-1,41)	0,683
6	36 (0)	7,4 (+1,41)	0,467
7	21,5 (-1,41)	5 (0)	0,793
8	50,5 (+1,41)	5 (0)	0,841
9	36 (0)	5 (0)	0,330
10	36 (0)	5 (0)	0,359
11	36 (0)	5 (0)	0,325

A partir dos dados apresentados na Tabela 10, foi possível avaliar os efeitos principais e de interação (Figura 10) das variáveis analisadas de acordo

com a superfície de resposta e contorno utilizando Planejamento Fatorial do tipo Composto Central Rotacional.

Para isso, foi obtido um modelo quadrático de regressão significativo, o valor crítico $F_{5,5}$ (5,05) é menor que o valor F obtido (6,50), conforme a ANOVA ($p=0,03$) (Tabela 11). Além disso, o coeficiente quadrático para o fator temperatura e o coeficiente da interação entre pH e temperatura do modelo quadrático de regressão foram significativos ($p=0,008$ e $p=0,025$, respectivamente). O modelo apresentou falta de ajuste, sendo o valor crítico de $F_{5,3}$ (5,41) menor que o valor F obtido (63,16), conforme a ANOVA ($p=0,016$). Portanto, a região experimental prevista pelo modelo quadrático apresentará uma resposta divergente do valor real. Entretanto, seus resíduos podem ser considerados aleatórios (homocedásticos), sendo possível o seu uso para realizar previsões do conteúdo de EPS.

Tabela 11 - Análise de Variância do modelo quadrático de regressão para prever o conteúdo de exopolissacarídeos (EPS).

Fator	SQ	GL	MQ	Valor F	Valor p
Modelo	0,427	5	0,085	6,504	0,030
pH	0,021	1	0,021	1,61	0,259
Temperatura	0,036	1	0,036	2,76	0,158
pH ²	0,039	1	0,039	2,98	0,145
Temperatura ²	0,24	1	0,24	17,92	0,008
pH*Temperatura	0,13	1	0,13	9,98	0,025
Resíduo	0,066	5	0,013		
Falta de ajuste	0,065	3	0,022	63,163	0,016
Erro puro	0,001	2	0,0003		

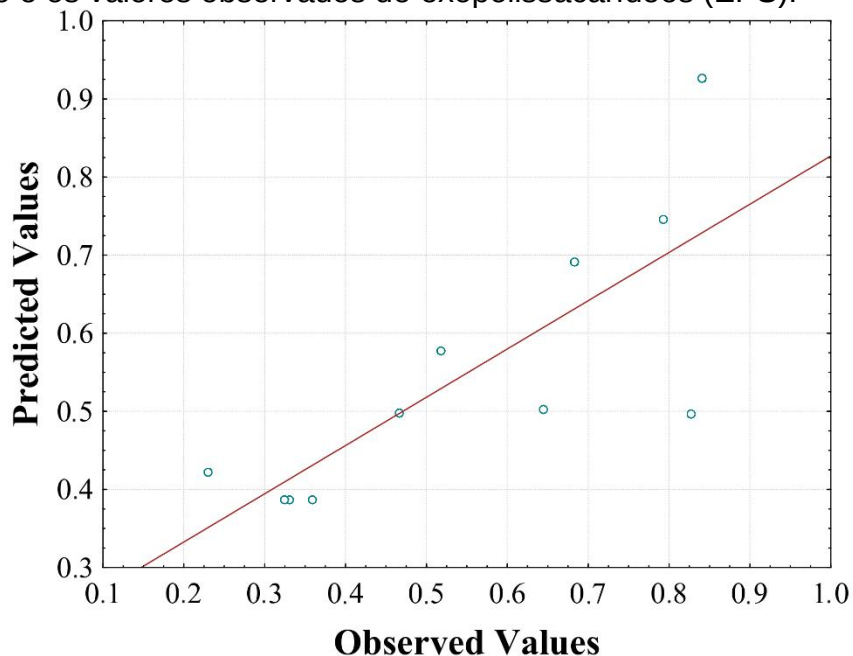
SQ: soma quadrática; GL: graus de liberdade; MQ: média quadrática.

O modelo quadrático de regressão apresenta $R^2=0,8667$ e $R^2_{ajustado}=0,7335$, indicando que o conteúdo de EPS produzido e o conteúdo de EPS previsto pelo modelo apresentam desvio de linearidade (Figura 10), corroborando com a falta de ajuste (Tabela 11). Considerando apenas os

coeficientes significativos e os seus erros previstos, foi obtido o seguinte modelo quadrático de regressão preditivo conforme equação (4):

$$\text{EPS (g/L)} = 0,34 (\pm 0,066) + 0,20 (\pm 0,048) \cdot \text{pH}^2 + 0,18 (\pm 0,057) \cdot \text{Temperatura} \cdot \text{pH} \quad (4)$$

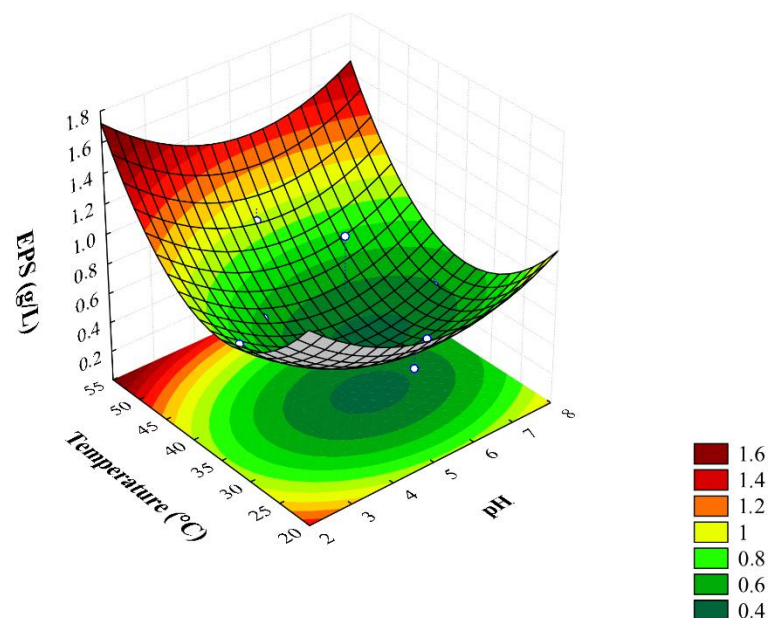
Figura 10 - Relação linear entre os valores previstos pelo modelo de regressão quadrático e os valores observados de exopolissacarídeos (EPS).



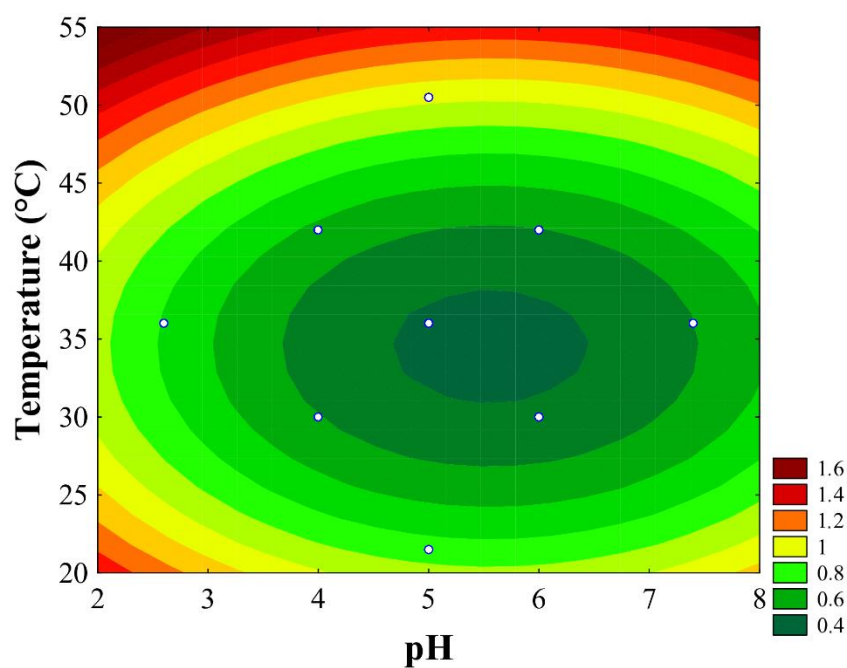
Este modelo quadrático foi utilizado para plotar uma superfície de resposta (Figura 11a) e suas respectivas curvas de contorno (Figura 11b). A superfície de resposta apresenta concavidade crescente em relação ao conteúdo de EPS observado, havendo uma dependência em relação as variações na escala de pH e temperatura. A combinação desses dois fatores indicou que sob condições adversas ou deletérias, o isolado produz EPS.

Figura 11 – Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para o Planejamento Fatorial do tipo Composto Central Rotacional de produção de exopolissacarídeos (EPS).

(a)



(b)



Considerando que o isolado KLM6 pode ser inativado em elevadas temperaturas, o modelo quadrático preditivo foi utilizado para obter uma região experimental de máxima produção de EPS utilizando os seguintes critérios: pH na faixa estudada (2,6 a 7,4) e baixa temperatura na faixa estudada (21,5 a 50,5 °C). O modelo indicou a região experimental em pH 4,0 e temperatura de 30 °C, para se obter 0,79 g/L de EPS.

A validação consistiu em testar a região experimental com réplicas autênticas e quantificar o conteúdo de EPS, obtendo-se $0,86 \pm 0,03$ g/L de EPS

(CV=3,05%). Esse resultado apresentou diferença significativa conforme o teste t de Student ($p \leq 0,05$), confirmando a falta de ajuste do modelo quadrático. Entretanto, apesar da divergência entre o valor previsto e o valor observado de EPS, o resultado foi próximo e indica que o modelo pode ser utilizado.

Os resultados provenientes da etapa de otimização indicaram um aumento na produção de EPS, em função da associação dos parâmetros pH e temperatura, o que aponta que o estresse ambiental pode ser utilizado como propulsor para o aumento da concentração de EPS obtido.

O rendimento da produção de EPS é considerado cepa dependente, isso significa que o rendimento depende do isolado utilizado, bem como das necessidades nutricionais que o mesmo requer (Williams e Wimpenny, 1977). De acordo com Leroy e De Vuyst (2016), existem diversos fatores que influenciam nas propriedades tecnológicas apresentadas, sendo eles a regulação gênica, a atividade enzimática e a adaptação aos diferentes meios e condições de cultivo.

Com diferentes condições, Oleksy-Sobczak et al. (2020) observaram que o pH levemente ácido (~5,7) e temperatura branda (~25 °C) favoreceram a síntese de EPS por cepas de *L. rhamnosus*, alcançando concentração máxima de 0,95 g/L de EPS. Essas condições são semelhantes às utilizadas na validação da otimização deste estudo, obtendo uma concentração de 0,86 g/L de EPS (pH 4,0 e temperatura de 30 °C) avaliando a espécie *L. mesenteroides*, valor este que se aproxima à concentração máxima atingida (0,841 g/L). Por outro lado, ao otimizar a produção de EPS pela mesma espécie *L. mesenteroides*, mas com condições que variaram em temperatura (30-37 °C), tempo de fermentação (18-48 h) e concentração de inóculo (1%), não foi observada diferença na produção do mesmo, entre as cepas (Derdak et al., 2022). Portanto, os resultados obtidos reforçam a importância das condições de cultivo para assegurar uma produção de EPS considerada economicamente e tecnologicamente viável.

6. Conclusão

O kefir é um leite fermentado, cujo consumo traz benefícios à saúde, que podem estar relacionados aos microrganismos presentes no produto, como bactérias ácido-láticas, bactérias acéticas e leveduras, e também aos metabólitos gerados durante a fermentação. Sabe-se que fatores como a origem dos grãos, os métodos de processamento e as condições de armazenamento podem influenciar na microbiota complexa dos grãos de kefir.

No presente estudo, 5 amostras de kefir procedentes da região Sul foram obtidas para prospectar bactérias ácido-láticas com potencial tecnológico de produção de exopolissacarídeos. Com o *screening* realizado, 41 isolados apresentaram características Gram-Positivas e catalase negativa. Destes, somente 14 isolados apresentaram resultados satisfatórios quanto aos testes de segurança empregados e a capacidade de produção de exopolissacarídeos foi observada em 8 isolados, que foram identificados molecularmente.

Assim, o kefir pode ser considerado uma importante matriz alimentar para isolar bactérias ácido-láticas com potencial de produção de exopolissacarídeos, no entanto observa-se que 65,8% dos isolados apresentaram fatores de virulência em pelo menos um dos testes de segurança, o que é preocupante devido aos riscos que a presença das enzimas DNase, gelatinase e hemolisina podem causar à saúde humana. Além dos problemas relacionados à transferência de genes de resistência a antimicrobianos de uso clínico entre espécies.

O isolado KLM6, identificado como *Leuconostoc mesenteroides*, foi escolhido para a etapa de avaliação dos efeitos da concentração de inóculo, pH e temperatura sobre a produção de exopolissacarídeos devido à sua maior capacidade de sintetizar este metabólito em comparação com os demais isolados testados. Característica considerada importante em virtude de propiciar propriedades reológicas e sensoriais fundamentais para aplicação em alimentos lácteos fermentados. Dentre as variáveis avaliadas no delineamento fatorial completo (2³) aplicado, apenas o pH apresentou efeito representativo na produção de exopolissacarídeos (efeito de 90%). A partir destes resultados,

foi realizada uma etapa de otimização das condições de cultivo, utilizando planejamento fatorial do tipo composto central rotacional, visando aumentar o rendimento desses compostos de interesse. Objetivo este que foi alcançado de acordo com a superfície de resposta e contorno que indicaram um aumento de rendimento de exopolissacarídeos com redução de pH e aumento de temperatura com concentração de inóculo fixa em 3% durante o processo fermentativo, obtendo uma concentração máxima de 0,841 g/L. Com isso, pode-se concluir que o estresse ambiental pode ser utilizado a fim de aumentar o rendimento de exopolissacarídeos, possibilitando desta forma, sua aplicação futura de forma eficiente na indústria de alimentos.

6. Referências

- ALI, Pervaiz; SHAH, Aamer Ali; HASAN, Fariha; HERTKORN, Norbert; GONSIOR, Michael; SAJJAD, Wasim; CHEN Feng. A Glacier Bacterium Produces High Yield of Cryoprotective Exopolysaccharide. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03096>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2019.03096/full>. Acesso em: 21 set. 2023.
- ANGELIN, J.; KAVITHA, M. Exopolysaccharides from probiotic bacteria and their health potential. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 162, p. 853–865, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.190>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32585269/>. Acesso em: 05 fev. 2024.
- BADEL, S.; BERNARDI, T.; MICHAUD, P. New perspectives for Lactobacilli exopolysaccharides. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 1, p. 54–66, 2011. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2010.08.011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20807563/>. Acesso em: 05 fev. 2024.
- BENGOA, Ana Agustina; DARDIS, Carolina; GAGLIARINI, Nina; GARROTE, Graciela L.; ABRAHAM, Analía G. Exopolysaccharides From *Lactobacillus paracasei* Isolated from Kefir as Potential Bioactive Compounds for Microbiota Modulation. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. 583254, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.583254>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2020.583254/full>. Acesso em: 05 fev. 2024.
- BENGOA, Ana A.; IRAPORDA, Carolina; ACURCIO, Leonardo B.; SANDES, Savio H. de Cicco; COSTA, Karen; GUIMARÃES, Gabriele Moreira; ARANTES, Rosa M. Esteves; NEUMANN, Elisabeth; NUNES, Álvaro Cantini; NICOLI, Jaques R.; GARROTE, Graciela L.; ABRAHAM, Analía G. Physicochemical, immunomodulatory and safety aspects of milks fermented with *Lactobacillus paracasei* isolated from kefir. **Food Research International**, v. 123, p. 48–55, 2019. DOI: 10.1016/j.foodres.2019.04.041. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31284997/>. Acesso em: 05 fev. 2024.
- BENNAMA, Rabha; FERNANDEZ, Maria; LADERO, Victor; ALVAREZ, Miguel A.; RECHIDI-SIDHOUM, Nadra; BENSOLTANE, Ahmed. Isolation of an exopolysaccharide-producing *Streptococcus thermophilus* from Algerian raw cow milk. **European Food Research and Technology**, v. 234, n. 1, p. 119, 2011. DOI: 10.1007/s00217-011-1620-8. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/236902345_Isolation_of_an_exopolysaccharide-producing_Streptococcus_thermophilus_from_Algerian_raw_cow_milk. Acesso em: 22 jan. 2024.

- BERTHOLD-PLUTA, Anna M.; PLUTA, Antoni S.; GARBOWSKA, Monika; STASIAK-RÓŻAŃSKA, Lidia. Exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria – health-promoting properties and application in the dairy industry. **Advancements of microbiology – Postępy mikrobiologii**, v. 58, n. 2, p. 191–204, 2019. DOI: 10.21307/PM-2019.58.2.191. Disponível em: <https://sciendo.com/pl/article/10.21307/PM-2019.58.2.191?content-tab=articles-in-this-issue>. Acesso em: 05 fev. 2024.
- BINTSIS, Thomas. Lactic acid bacteria as starter cultures: An update in their metabolism and genetics. **AIMS Microbiology**, v. 4, n. 4, p. 665–684, 2018. DOI: 10.3934/microbiol.2018.4.665. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6613329/>. Acesso em: 05 fev. 2024.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 398 de 30 de abril 1999. Aprova o regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 03 de maio de 1999.
- BUKSA, Krzysztof; KOWALCZYK, Magdalena; BORECZEK, Jakub. Extraction, purification and characterisation of exopolysaccharides produced by newly isolated lactic acid bacteria strains and the examination of their influence on resistant starch formation. **Food Chemistry**, v. 362, p. 130-221, 2021. DOI: 10.1016/j.foodchem.2021.130221. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34098436/>. Acesso em: 05 fev. 2024.
- CAGGIANIELLO, Graziano; KLEEREBEZEM, Michiel; SPANO, Giuseppe. 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. DOI: 10.1007/s00253-016-7471-2. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27020288/>. Acesso em: 05 fev. 2024.
- CALASSO, Maria; MINERVINI, Fabio; FILIPPIS, Francesca; ERCOLINI, Danilo; ANGELIS, Maria; GOBBETTI, Marco. Attenuated *Lactococcus lactis* and Surface Bacteria as Tools for Conditioning the Microbiota and Driving the Ripening of Semisoft Caciotta Cheese. **Appl Environ Microbiol.**, v. 86, n. 5, p. 1-18, 2020. DOI: 10.1128/AEM.02165-19. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31862717/>. Acesso em: 13 jan. 2024.
- CHAUDHURI, P.; SINGH, D. Modified methods for simple and rapid detection of bacterial deoxyribonuclease production. **Journal of Microbiological Methods**, v. 16, n. 4, p. 307-311, 1992. DOI: [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(92\)90083-G](https://doi.org/10.1016/0167-7012(92)90083-G). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/016770129290083G>. Acesso em: 13 set. 2022.

CHEIRSILP, Benjamas; SUKSAWANG, Suwannee; YEESANG, Jarucha; BOONSAWANG, Piyarat. Co-production of functional exopolysaccharides and lactic acid by *Lactobacillus kefiranofaciens* originated from fermented milk, kefir. **Journal of Food Science and Technology**, v. 55, p. 331-340, 2018.

DOI:10.1007/s13197-017-2943-7. Disponível em:

https://www.researchgate.net/publication/320703565_Co-production_of_functional_exopolysaccharides_and_lactic_acid_by_Lactobacillus_kefiranofaciens_originated_from_fermented_milk_kefir. Acesso em: 17 jun. 2023.

CICOTELLO, Joaquin; WOLF, Irma V.; ANGELO, Luisa; GUGLIELMOTTI, Daniela M.; QUIBERONI Andrea; SUÁREZ, Viviana. Response of *Leuconostoc* strains against technological stress factors: Growth performance and volatile profiles. **Food Microbiol.**, v. 73, p. 362-370, 2018. DOI:

10.1016/j.fm.2018.02.010. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29526224/>. Acesso em: 13 jan. 2024.

CISZEK-LENDIA, Marta. Biological functions of exopolysaccharides from probiotic bacteria. **Central European Journal of Immunology**, v. 36, p. 51–55, 2011. Disponível em:

https://www.researchgate.net/publication/283149301_Biological_functions_of_exopolysaccharides_from_probiotic_bacteria. Acesso em: 05 fev. 2024.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 30th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2020.

COSTA, N. E.; HANNON, J. A.; GUINEE, T. P.; AUTY, M. A. E.; MCSWEENEY, P. L. H.; BERESFORD, T. P. Effect of exopolysaccharide produced by isogenic strains of *Lactococcus lactis* on half-fat Cheddar cheese.

Journal of Dairy Science, Ireland, v. 93, n. 8, p. 3469–3486, 2010. DOI:

10.3168/jds.2009-3008. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030210003656>. Acesso em: 05 fev. 2024.

DABOUR, N., LAPOINTE, G. Identification and molecular characterization of the chromosomal exopolysaccharide biosynthesis gene cluster from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SMQ-461. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 71, p. 7414–7425, 2005. DOI: 10.1128/AEM.71.11.7414-7425.2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1287649/>. Acesso em: 11 set. 2023.

DARILMAZ, Derya Onal. Relationship between gastrointestinal tolerance and exopolysaccharide production of propionibacteria strains under different pH and bile conditions. **International Journal of Dairy Technology**, v. 66, n. 2, p. 194–201, 2013. DOI: 10.1111/1471-0307.12029. Disponível em:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/1471-0307.12029>. Acesso em: 06 fev. 2023.

DEGEEST, Bart; VUYST, Luc. Correlation of activities of the enzymes alpha-phosphoglucosyltransferase, UDP-galactose 4-epimerase, and UDP-glucose pyrophosphorylase with exopolysaccharide biosynthesis by *Streptococcus thermophilus* LY03. **Applied Environmental Microbiology**, v.66, p.3519-3527, 2000. DOI: 10.1128/aem.66.8.3519-3527.2000. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC92180/>. Acesso em: 22 nov. 2023.

DERDAK, Reda; SAKOUI, Souraya; POP, Oana Lelia; VODNAR, Dan Cristian; ADDOUM, Boutaina; ELMAKSSOUDI, Abdelhakim; ERRACHIDI, Faouzi; SUHAROSCHI, Ramona; SOUKRI, Abdelaziz; KHALFI, Bouchra El. 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. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100305>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2590157522001031?via%3Dih>. Acesso em: 05 nov. 2023.

DERTLI, Enes; MERCAN, Emin; ARICI, Muhammet; YILMAZ, Mustafa Tahsin; SAĞDIÇ, Osman. Characterisation of lactic acid bacteria from Turkish sourdough and determination of their exopolysaccharide (EPS) production characteristics. **LWT - Food Science and Technology**, v. 71, p. 116-124, 2016. DOI: 10.1016/j.lwt.2016.03.030. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/299132016_Characterisation_of_lactic_acid_bacteria_from_Turkish_sourdough_and_determination_of_their_exopolysaccharide_EPS_production_characteristics. Acesso em: 05 fev. 2024.

DÍAZ-MONTES, Elsa. Dextran: Sources, Structures, and Properties. **Polysaccharides**, v. 2, n. 3, p. 554-565, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/polysaccharides2030033>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2673-4176/2/3/33>. Acesso em: 27 nov. 2023.

DOLEYRES, Y.; SCHAUB, L.; LACROIX, C. Comparison of the functionality of exopolysaccharides produced in situ or added as bioingredients on yogurt properties. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 12, p. 4146–4156, 2005. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(05)73100-3. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/7476155_Comparison_of_the_Functionality_of_Exopolysaccharides_Produced_In_Situ_or_Added_as_Bioingredients_on_Yogurt_Properties. Acesso em: 21 jun. 2023.

DUAR, Rebecca M.; LIN, Xiaoxi B.; ZHENG, Jinshui; MARTINO, Maria Elena; GRENIER, Théodore; PÉREZ-MUÑOZ, Maria Elisa; LEULIER, François; GÄNZLE, Michael; WALTER, Jens. Lifestyles in transition: Evolution and natural history of the genus *Lactobacillus*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, p. 27–48, 2017. DOI: 10.1093/femsre/fux030. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28673043/>. Acesso em: 09 out. 2023.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A. T.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal**

Chem, v. 28, p. 350–356, 1956. DOI: 10.1021/ac60111a017. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/216090838_Calorimetric_Dubois_Method_for_Determination_of_Sugar_and_Related_Substances. Acesso em: 12 dez. 2022.

EATON, Tracy J.; GASSON, Michael J. Molecular screening of Enterococcus virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. **Applied and environmental microbiology**, v. 67, n. 4, p. 1628-1635, 2001. DOI: 10.1128/AEM.67.4.1628-1635.2001. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC92779/>. Acesso em: 25 nov. 2023.

FAO/WHO. Probiotics in food health and nutritional properties and guidelines for evaluation: Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Cordoba, Argentina 2002 and London, Ontario, Canada 2002. Geneva, Switzerland: World Health Organisation, 2002.

FELDMANE, Jana; SEMJONOV, Pavels; CIPROVICA, Inga. Potential of exopolysaccharides in yoghurt production. **International Journal of Nutrition and Food Engineering**, v. 7, n. 8, p. 767–770, 2013. DOI: doi.org/10.5281/zenodo.1086547. Disponível em: <https://publications.waset.org/16077/potential-of-exopolysaccharides-in-yoghurt-production>. Acesso em: 28 nov. 2023.

FERRARI, Iris da Silva; SOUZA, Jane Viana; RAMOS, Cintia Lacerda; COSTA, Mateus Matiuizzi; SCHWAN, Rosane Freitas; DIAS, Francesca Silva. Selection of autochthonous lactic acid bacteria from goat dairies and their addition to evaluate the inhibition of *Salmonella* Typhi in artisanal cheese. **Food Microbiology**, v.60, p. 29-38, 2016. DOI: 10.1016/j.fm.2016.06.014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27554143/>. Acesso em: 04 dez. 2023.

FORSYTHE, Stephen J. **Microbiologia da Segurança dos Alimentos**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

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. DOI: 10.1136/jcp.42.8.872. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2475530/>. Acesso em: 13 nov. 2023.

GARROTE, G.; ABRAHAM, A.; ANTONI, G. Preservation of kefir grains, a comparative study. **LWT – Food Science and Technology**, v. 30, n. 1, p. 77–84, 1997. DOI:10.1006/FSTL.1996.0135. Disponível em: <https://www.semanticscholar.org/paper/Preservation-of-Kefir-Grains%2C-a-Comparative-Study-Garrote->

Abraham/e1960d4788aff1e698e344446eae2bcc08ea0e7a. Acesso em: 18 set. 2023.

GAWANDE, Krushna; KOLHEKAR, Mrugnayani; KUMARI, Manorama; KAPILA, Suman; SHARMA, Prateek; ALI, Syed Azmal; BEHARE, Pradip. Lactic acid bacteria based purified exopolysaccharide showed viscofying and hypercholesterolemic capabilities. *Food Hydrocolloids fo Health*, v. 1, p. 100042, 2021. DOI: 10.1016/j.fhfh.2021.100042. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/356444885_Lactic_acid_bacteria_based_purified_exopolysaccharide_showed_viscofying_and_hypercholesterolemic_capabilities. Acesso em: 06 fev. 2024.

GIRAFFA, Giorgio; CHANISHVILI, Nina; WIDYASTUTI, Yantyati. Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. **Research in Microbiology**, v. 161, n. 6, p. 480-487, 2010. DOI: 10.1016/j.resmic.2010.03.001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20302928/>. Acesso em: 18 dez. 2023.

GONG, X. **Isolation and Identification of High Quality Lactic Acid Bacteria and Yeast in Kefir Grains and the Preparation of Kefir Compound Fermentation Starter**. 2018. Published master's dissertation, Jiangsu University, Zhenjiang City, Jiangsu Province, China.

GREEN, M. R.; HUGHES, H.; SAMBROOK, J.; MACCALLUM, P. Molecular cloning: a laboratory manual. **Molecular cloning: a laboratory manual**, p. 1890-1890, 2012.

HABIB, Bisma; VAID, Surbhi; BANGOTRA, Ridhika; SHARMA, Surbhi; BAJAJ, Bijender Kumar. Bioprospecting of probiotic lactic acid bacteria for cholesterol lowering and exopolysaccharide producing potential. **Biologia**, v. 77, p. 1931–1951, 2022. DOI: 10.1007/s11756-022-01058-y. Disponível em: <https://ui.adsabs.harvard.edu/abs/2022Biolg..77.1931H/abstract>. Acesso em: 06 out. 2022.

HAMET, M. F.; MEDRANO, M.; PÉREZ, P. F.; ABRAHAM, A. G. Oral administration of kefir exerts a bifidogenic effect on BALB/c mice intestinal microbiota. **Beneficial Microbes**, v. 7, n. 2, p. 237–246, 2016. DOI: 10.3920/BM2015.0103. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26689227/>. Acesso em: 23 mai. 2023.

HARUTOSHI, Tsuda. Exopolysaccharides of lactic acid bacteria for food and colon health applications. **Lactic acid bacteria – R&D for food, health and livestock purposes**, 2013.

HILL, Colin; GUARNER, Francisco; REID, Gregor; GIBSON, Glenn R.; MERENSTEIN, Daniel J.; POT, Bruno; MORELLI, Lorenzo; CANANI, Roberto Berni; FLINT, Harry J; SALMINEN, Seppo; CALDER, Philip C.; SANDERS, Mary Ellen. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology e Hepatology**, v. 11, p. 506-514, 2014.

DOI: 10.1038/nrgastro.2014.66. Disponível em:
<https://www.nature.com/articles/nrgastro.2014.66>. Acesso em: 24 set. 2023.

HOLT, J. G. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. LWW; In: HOLT, J.G. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. Baltimore: Lippincott Williams and Wilkins, Cap.1, p. 3–14, 1994.

ISLAM, Md Zakirul; UDDIN, Md Elias; RAHMAN, Md Tanvir; ISLAM, Mohammad Ashiqul; HARUN-UR-RASHID, Md. Isolation and characterization of dominant lactic acid bacteria from raw goat milk: Assessment of probiotic potential and technological properties. **Small Ruminant Research**, v. 205, p. 106-532, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2021.106532>. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0921448821002091>. Acesso em: 12 jan. 2024.

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. <https://doi.org/10.1134/s0003683822020107>. Disponível em:
<https://link.springer.com/article/10.1134/S0003683822020107#citeas>. Acesso em: 28 out. 2023.

JIANG, Shiman; CAI, Lingzhi; LV, Longxian; LI, Longxian. *Pediococcus pentosaceus*, a future additive or probiotic candidate. **Microbial Cell Factories**, v. 20, n. 1, p. 45, 2021. DOI:10.1186/s12934-021-01537-y. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33593360/>. Acesso em: 29 jan. 2024.

JÚNIOR, Luís Marangoni; VIEIRA, Roniérrik Pioli; ANJOS, Carlos Alberto Rodrigues. Kefiran-based films: Fundamental concepts, formulation strategies and properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 246, 2020. DOI: 10.1016/j.carbpol.2020.116609. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32747252/>. Acesso em: 19 nov. 2023.

KATEETE, David P.; KIMANI, Cyrus N., KATABAZI, Fred A., OKENG, Alfred; OKEE, Moses S.; NANTEZA, Ann; JOLOBA, Moses L.; NAJJUKA, Florence C. Identification of *Staphylococcus aureus*: DNase and Mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, v. 9, n. 1, p. 1-7, 2010. DOI: 10.1186/1476-0711-9-23. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20707914/>. Acesso em: 26 ago. 2023.

KIM, Dong-Hyeon; JEONG, Dana; KANG, Il-Byeong; LIM, Hyun-Woo; CHO, Yoonju; SEO, Kun-Ho. 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. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15639>. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030219301961>. Acesso em: 10 mar. 2023.

KÖNIG, Helmut; UNDEN, Gottfried; FRÖHLICH, Jürgen. **Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine**. Heidelberg: Springer-verlag Berlin Heidelberg, 516 p., 2009.

KOOIMAN, P. The chemical structure of kefir, the water-soluble polysaccharide of the kefir grain. **Carbohydrate Research**, v. 7, n. 2, p. 200-211, 1968. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)81138-6](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)81138-6). Disponível em: https://www.researchgate.net/figure/The-chemical-structure-of-kefir-the-water-soluble-polysaccharide-of-the-kefir-grains_fig1_12668192. Acesso em: 02 out. 2023.

LACAZE, G.; WICK, M.; CAPPELLE, S. Emerging fermentation technologies: development of novel sourdoughs. *Food Microbiology*, v. 24, n. 2, p. 155-160, 2007. DOI: 10.1016/j.fm.2006.07.015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17008159/>. Acesso em: 14 dez. 2023.

LEBEER, Sarah; VERHOEVEN, Tine L. A.; FRANCIUS, Gregory; SCHOOF, Geert; LAMBRICHTS, Ivo; DUFRÊNE, Yves; VANDERLEYDEN, Jos; KEERSMAECKER, Sigrid C. J. Identification of a gene cluster for the biosynthesis of a long, galactose-rich exopolysaccharide in *Lactobacillus rhamnosus* Gg and functional analysis of the priming glycosyltransferase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 11, p. 3554–3563, 2009. DOI: 10.1128/AEM.02919-08. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2687306/>. Acesso em: 13 fev. 2024.

LEROY, Frédéric; VUYST, Luc. Advances in production and simplified methods for recovery and quantification of exopolysaccharides for applications in food and health. **Journal of dairy science**, v. 99, n. 4, p. 3229-3238, 2016. DOI: 10.3168/jds.2015-9936. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26874424/>. Acesso em: 10 jan. 2024.

LI, Wei; JI, Juan; RUI, Xin; YU, Jiaojiao; TANG, Weizhi; CHEN, Xiaohong; JIANG, Mei; DONG, Mingsheng. 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. DOI: 10.1016/j.lwt.2014.06.063. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/265338660_Production_of_exopolysaccharides_by_Lactobacillus_helveticus_MB2-1_and_its_functional_characteristics_in_vitro. Acesso em: 06 jan. 2023.

LIMA, Carlos Henrique Gomes de Sousa; CARBONERA, Nádia; HELBIG, Elizabete. Avaliação de aspectos fenotípicos de segurança de bactérias ácido-láticas isoladas de queijos artesanais do tipo colonial do sul do Brasil. **Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes**, v. 77, n. 1, p. 12-20, 2022. DOI:

<https://doi.org/10.14295/2238-6416.v77i1.884>. Disponível em:
<https://www.revistadoilct.com.br/rilct/article/view/884>. Acesso em: 14 dez. 2023.

LIMA, Kátia Gianni Carvalho; KRUGER, Monika Francisca; BEHRENS, Jorge Herman; DESTRO, Maria Tereza; LANDGRAF, Mariza; FRANCO, Bernadette Dora Gombossy de Melo. 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. DOI: 10.1016/j.lwt.2008.08.011.

LIMA, Lucianna; HABU, Sascha; GERN, Juliana Carine; NASCIMENTO, Bruno Motta; PARADA, José-Luiz; NOSEDA, Miguel; GONÇALVES, Alan; NISHA, V. R.; PANDEY, Ashok; SOCCOL, Vanete Thomaz; SOCCOL, Carlos. Production and Characterization of the Exopolysaccharides Produced by *Agaricus Brasiliensis* in Submerged Fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 151, n. 2-3, pp. 283–294, 2008. DOI: 10.1007/s12010-008-8187-2. Disponível em:
https://www.researchgate.net/publication/5278626_Production_and_Characterization_of_the_Exopolysaccharides_Produced_by_Agaricus_brasiliensis_in_Submerged_Fermentation. Acesso em: 21 set. 2023.

LINARES, Daniel M.; GÓMEZ, Carolina; RENES, Erica; FRESNO, José M.; TORNADIJO, Maria E.; ROSS, R. P.; STANTON, Catherine. Lactic Acid Bacteria and *Bifidobacteria* with Potential to Design Natural Biofunctional Health-Promoting Dairy Foods. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 846, 2017. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00846. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28572792/>. Acesso em: 20 jul. 2023.

LONDON, L. E.; PRICE, N. P.; RYAN, P.; WANG, L.; AUTY, M. A.; FITZGERALD, G. F.; STANTON, C.; ROSS, R. P. Characterization of a bovine isolate *Lactobacillus mucosae* DPC 6426 which produces an exopolysaccharide composed predominantly of mannose residues. **Journal of Applied Microbiology**, v. 117, n. 2, p. 509–517, 2014. DOI: 10.1111/jam.12542. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24833280/>. Acesso em: 06 fev. 2023.

LYNCH, Kieran M.; ZANNINI, Emanuele; COFFEY, Aidan; ARENDT, Elke 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. DOI: 10.1146/annurev-food-030117-012537. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29580141/>. Acesso em: 04 fev. 2023.

MENDE, Susann; ROHM, Harald; JAROS, Doris. 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. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.08.002>. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0958694615001570>. Acesso em: 23 jul. 2023.

MICHELI, L.; UCCELLETTI, D.; PALLESCHI, C.; CRESCENZI, V. Isolation and characterisation of a ropy *Lactobacillus* strain producing the exopolysaccharide kefiran. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, n. 1, p. 69–74, 1999. DOI: 10.1007/s002530051616. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s002530051616>. Acesso em: 12 jan. 2024.

MONSAN, Pierre; BOZONNET, Sophie; ALBENNE, Cécile; JOUCLA, Gilles; WILLEMOT, René-Marc; REMAUD-SIMÉON, Magali. Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 9, p. 675-685, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00113-3](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00113-3). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0958694601001133>. Acesso em: 24 out. 2023.

NEJATI, Fatemeh; JUNNE, Stefan; NEUBAUER, Peter. A Big World in Small Grain: A Review of Natural Milk Kefir Starters. **Microorganisms**, Germany, v. 8, n. 2, p. 192, 2020. DOI: 10.3390/microorganisms8020192. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32019167/>. Acesso em: 15 ago. 2023.

OLEKSY-SOBCZAK, Magdalena; KLEWICKA, Elzbieta. 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. <https://doi.org/10.1007/s12602-019-09581-2>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31410767/>. Acesso em: 18 ago. 2023.

THANH, Nguyen Huu; RAZAFINDRALAMBO, Hary; BLECKER, Christophe; N'YAPO, Charles; THONART, Philippe; DELVIGNE, Frank. 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. DOI: 10.1016/j.bej.2014.04.005. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/262109806_Stochastic_exposure_to_sub-lethal_high_temperature_enhances_exopolysaccharides_EPS_excretion_and_improves_Bifidobacterium_bifidum_cell_survival_to_freeze-drying. Acesso em: 18 ago. 2023.

PATEL, Anil Kumar; MICHAUD, Philippe; SINGHANIA, Reeta Rani; SOCCOL, Carlos Ricardo; PANDEY, Ashok. Polysaccharides from probiotics: New developments as food additives. **Food Technology and Biotechnology**, v. 48, n. 4, p. 451–463, 2010. Disponível em: <https://www.ftb.com.hr/archives/121-polysaccharides-from-probiotics-new-developments-as-food-additives>. Acesso em 22 jan. 2023.

PATEL, Seema; MAJUMDER, Avishek; GOYAL, Arun. Potentials of exopolysaccharides from lactic acid bacteria. **Indian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 3–12, 2012. DOI: 10.1007/s12088-011-0148-8. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3298600/>. Acesso em: 10 ago. 2023.

PEREIRA, V.; LOPES, C.; CASTRO, A.; SILVA, J.; GIBBS, P.; TEIXEIRA, P. Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. **Food Microbiology**, v. 26, n. 3, p. 278-282, 2009. DOI: 10.1016/j.fm.2008.12.008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19269569/>. Acesso em: 04 set. 2023.

PIERMARIA, Judith Araceli; PINOTTI, Adriana; GARCIA, Maria Alejandra; ABRAHAM, Analía Graciela. Films based on kefir, an exopolysaccharide obtained from kefir grain: Development and characterization. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 3, p. 684–690, 2009. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2008.05.003. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/222401490_Films_based_on_kefir_an_exopolysaccharide_obtained_from_kefir_grain_Development_and_characterization. Acesso em: 02 mar. 2023.

PIERMARIA, Judith Araceli; BOSCH, Alejandra; PINOTTI, Adriana; YANTORNO, Osvaldo; GARCIA, Maria Alejandra; ABRAHAM, Analía G. Kefir films plasticized with sugars and polyols: Water vapor barrier and mechanical properties in relation to their microstructure analyzed by ATR/FT-IR spectroscopy. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 5, p. 1261–1269, 2011. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2010.11.024. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/251544413_Kefir_films_plasticized_with_sugars_and_polyols_Water_vapor_barrier_and_mechanical_properties_in_relation_to_their_microstructure_analyzed_by_ATRFT-IR_spectroscopy. Acesso em: 18 abr. 2023.

PLESSAS, Stavros; KIOUSI, Despoina Eugenia; RATHOSI, Marina; ALEXOPOULOS, Athanasios; KOURKOUTAS, Yiannis; MANTZOURANI, Ioannai; GALANIS, Alex; BEZIRTZOGLU, Eugenia. Isolation of a *Lactobacillus paracasei* Strain with Probiotic Attributes from Kefir Grains. **Biomedicines**, v. 8, n. 12, p. 594, 2020. DOI: 10.3390/biomedicines8120594. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7764135/>. Acesso em: 02 set. 2023.

PLESSAS, Stavros; NOUSKA, Chrysanthi; MANTZOURANI, Ioannai; KOURKOUTAS, Yiannis; ALEXOPOULOS, Athanasios; BEZIRTZOGLU, Eugenia. Microbiological exploration of different types of kefir grains. **Fermentation**, v. 3, n. 1, 2016. DOI: 10.3390/fermentation3010001. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/311881947_Microbiological_Exploration_of_Different_Types_of_Kefir_Grains. Acesso em: 20 out. 2023.

POLAK-BERECKA, Magdalena; WAŚKO, Adam; SKRZYPEK, Henryk; 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. DOI: 10.1556/AAlim.42.2013.2.9. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/260047076_Production_of_exopolysaccharides_by_a_probiotic_strain_of_Lactobacillus_rhamnosus_Biosynthesis_and_purification_methods. Acesso em: 20 out. 2023.

PRABHAKAR, Kodali Vidya; DAS, Subhasish; SEN, Ramkrishna. An exopolysaccharide from a probiotic: Biosynthesis dynamics, composition and emulsifying activity. **Food Research International**, v. 42, n. 5–6, p. 695–699, 2009. DOI: 10.1016/j.foodres.2009.02.007. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/248425701_An_exopolysaccharide_from_a_probiotic_Biosynthesis_dynamics_composition_and_emulsifying_activity. Acesso em: 12 set. 2023.

PRADHAN, Diwas; RASHMI, Hogarehalli Mallappa; GROVER, Sunita. Review Comprehensive approaches for assessing the safety of probiotic bacteria. **Food Control**, v. 108, 2020. DOI: 10.1016/j.foodcont.2019.106872. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/335625884_Comprehensive_Approaches_for_Assessing_the_Safety_of_Probiotic_Bacteria. Acesso em: 02 dez. 2023.

PROVENCHER, Cathy; LAPOINTE, Gisele; SIROIS, Stéphane; CALSTEREN, Marie Rose Van; ROY, Denis. Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of priming glycosyltransferase genes of the exopolysaccharide locus in strains of the *Lactobacillus casei* group. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 6, p. 3299–3307, 2003. DOI: 10.1128/AEM.69.6.3299-3307.2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12788729/>. Acesso em: 06 set. 2022.

RAJOKA, Muhammad Shahid Riaz; WU, Yiguang; MEHWISH, Hafiza Mahreen; BANSAL, Manisha; ZHAO, Liqing. Lactobacillus exopolysaccharides: New perspectives on engineering strategies, physiochemical functions, and immunomodulatory effects on host health. **Trends in Food Science & Technology**, v. 103, p. 36–48, 2020. DOI: 10.1016/j.tifs.2020.06.003. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/343035275_Lactobacillus_exopolysaccharides_New_perspectives_on_engineering_strategies_physiochemical_functions_and_immunomodulatory_effects_on_host_health. Acesso em: 11 fev. 2023.

RIMADA, Pablo Sebastian; ABRAHAM, Analía Graciela. Kefiran improves rheological properties of glucono- δ -lactone induced skim milk gels. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 1, p. 33–39, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.02.002>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0958694605000361>. Acesso em: 25 out. 2023.

RODRÍGUEZ, Luciana G. Ruiz; MOHAMED, Florencia; BLECKWEDEL, Juliana; MEDINA, Roxana; DE VUYST, Luc; HEBERT, Elvira M.; MOZZI, Fernanda. Diversity and functional properties of lactic acid bacteria isolated from wild fruits and flowers present in northern Argentina. **Front. Microbiol.**, v. 10, p. 1091, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01091>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2019.01091/full>. Acesso em: 16 set. 2023.

ROSA, Damiana D.; DIAS, Manoela M. S.; GRZESKOWIAK, Łukasz M.; REIS, Sandra A.; CONCEIÇÃO, Lisiane L.; PELUZIO, Maria do Carmo G. Milk kefir: Nutritional, microbiological and health benefits. **Nutrition Research Reviews**, v. 30, p. 82–96, 2017. DOI: 10.1017/S0954422416000275. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28222814/>. Acesso em: 20 dez. 2023.

RUAS-MADIEDO, Patricia; SALAZAR, Nuria; CLAR, Guenter. Biosynthesis and chemical composition of exopolysaccharides. **See Ullrich**, p. 279, 2009. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/224900787_Biosynthesis_and_chemical_composition_of_exopolysaccharides_produced_by_lactic_acid_bacteria_In_Bacterial_polysaccharides. Acesso em: 05 abr. 2023.

RYAN, P. M.; ROSS, R. P.; FITZGERALD, G. F.; CAPLICE, N. M.; STANTON, C. Sugar-coated: exopolysaccharide producing lactic acid bacteria for food and human health applications. **Food Funct.**, v.6, n. 3, p. 679-93, 2015. DOI: 10.1039/c4fo00529e. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25580594/>. Acesso em 10 jan. 2024.

SAADAT, Yalda Rhabar; KHOSROUSHAHI, Ahmad Yari; GARGARI, Bahram. Pourghassem. A comprehensive review of anticancer, immunomodulatory and health beneficial effects of the lactic acid bacteria exopolysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, Tabriz, v. 217, p. 79–89, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.04.025>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0144861719304096>. Acesso em: 17 ago. 2023.

SALAZAR, Nuria; BINETTI, Ana; GUEIMONDE, Miguel; ALONSO, Ana; GARRIDO, Pablo; REY, Carmen Gonzalez; GONZÁLEZ, Celestino; RUAS-MADIEDO, Patricia; REYES-GAVILÁN, Clara G. Safety and intestinal microbiota modulation by the exopolysaccharide-producing strains *Bifidobacterium animalis* IPLA R1 and *Bifidobacterium longum* IPLA E44 orally administered to Wistar rats. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, n. 3, p. 342–351, 2011. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.10.016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21078530/>. Acesso em: 03 jun. 2023.

SANTOS, Kellen Biudes. **Bioprospecção de bactérias lácticas isoladas do soro-fermento de queijo porungo com potencial tecnológico**. 2023.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental, Universidade Federal de São Carlos, 2023.

SILVA, Elaine Cristina. **Exopolissacarídeos de bactérias ácido lácticas: otimização da produção em meio soro de leite, caracterização parcial e avaliação do potencial antioxidante in vitro**. 2022. Tese (Doutorado em Biociência Animal) - Programa de Pós Graduação em Biociência Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2022.

TALIB, Noorshafadzilah; MOHAMAD, Nurul Elyani; YEAP, Swee Keong; HUSSIN, Yazmin; AZIZ, Muhammad Nazirul Mubin; MASARUDIN, Mas Jaffri; SHARIFUDDIN, Shaiful Adzni; HUI, Yew Woh; HO, Chai Ling; ALITHEEN, Noorjahan Banu. Isolation and Characterization of *Lactobacillus* spp. from Kefir Samples in Malaysia. **Molecules**, v. 24, n. 14, p. 2606, 2019. DOI: 10.3390/molecules24142606. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31319614/>. Acesso em: 14 ago. 2023.

THRAILKILL, Kathryn M; BUNN, Robert C.; FOWLKES, John L. Ma-trix metalloproteinases: their potential role in the pathogenesis of diabetic nephropathy. **Endocrine**, v. 35, n. 1, p. 1-10, 2009. DOI: 10.1007/s12020-008-9114-6. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18972226/>. Acesso em: 14 out. 2023.

TOKATLI, Mehmet; GÜLGÖR, Gökşen; ELMACI, Simel Bağder; İŞLEYEN, Nurdan Arslankoz; ÖZÇELİK, Filiz. In vitro properties of potential probiotic indigenous lactic acid bacteria originating from traditional pickles. **Biomed Res. Int**. 2015. DOI: 10.1155/2015/315819. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4460932/>. Acesso em 08 jan. 2024.

TOPÇU, Kubra Cinar; KAYA, Mükerrrem; KABAN, Guzin. Probiotic properties of lactic acid bacteria strains isolated from pastirma. **LWT – Food Science and Technology**, v. 134, p. 110-216, 2020. DOI: 10.1016/j.lwt.2020.110216. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/346314117_Probiotic_properties_of_lactic_acid_bacteria_strains_isolated_from_pastirma. Acesso em: 21 jul. 2023.

VIKOVÁ, E.; RADA, V.; POPELÁŘOVÁ, P.; TROJANOVÁ, I.; KILLER, J. Antimicrobial susceptibility of *Bifidobacteria* isolated from gastrointestinal tract of calves. **Livestock Science**, v. 105, p. 253–259. 2006. DOI: 10.1016/j.livsci.2006.04.011. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/240439543_Antimicrobial_susceptibility_of_bifidobacteria_isolated_from_gastrointestinal_tract_of_calves. Acesso em: 14 set. 2022.

VILLALOBOS, José Anibal Mora; ZAMORA, Jéssica Montero; BARBOZA, Nathalia; GARBANZO, Carolina Rojas; USAGA, Jessie; SOLANO, Mauricio Redondo; SCHROEDTER, Linda; WIDDRAT, Agata Olszewska; GÓMEZ, José

Pablo Lopez. Multi-Product Lactic Acid Bacteria Fermentations: A Review. **Fermentation**, v. 6, n. 1, p. 23, 2020. DOI: 10.3390/fermentation6010023. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/339146434_Multi-Product_Lactic_Acid_Bacteria_Fermentations_A_Review. Acesso em: 13 abr. 2023.

VITOLA, Helena Reissig Soares; DANNENBERG, Guilherme da Silva; MARQUES, Juliana de Lima; LOPES, Graciela Volz; SILVA, Wladimir Padilha; FIORENTINI, Ângela Maria. Probiotic potential of *Lactobacillus casei* CSL3 isolated from bovine colostrum silage and its viability capacity immobilized in soybean. **Process biochemistry**, v. 75, p. 22-30, 2018. DOI: 10.1016/j.procbio.2018.09.011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511318306093>. Acesso em: 23 jun. 2023.

VOSOUGH, Paria Rahnama; DOVOM, Mohammad Reza Edalatian; NAJAFI, Mohammad Bagher Habibi; JAVADMANESH, Ali; MAYO, Baltasar. 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. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101869>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2212429222003285?via%3Dihub>. Acesso em: 15 ago. 2023.

VUYST, Luc DEGEEST, Bart. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 23, n. 2, p. 153–77, 1999. DOI: 10.1111/j.1574-6976.1999.tb00395.x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10234843/>. Acesso em: 19 nov. 2022.

WANG, Hao; XIAOMENG, Sun; SONG, Xiao; GUO, Mingruo. Effects of kefir grains from diferente origins on proteolysis and volatile profile of goat milk kefir. **Food Chemistry**, v. 339, p. 128099, 2021. DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.128099. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33152884/>. Acesso em: 01 nov. 2023.

WELMAN, Alan D.; MADDUX, Ian S. Exopolysaccharides from lactic acidbacteria: perspectives and challenges. **Trends in biotechnology**, v. 21, n. 6, p. 269- 274, 2003. DOI: 10.1016/S0167-7799(03)00107-0. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12788547/>. Acesso em: 18 dez. 2023.

WILLIAMS, A. G.; WIMPENNY, J. W. T. Exopolysaccharide Production by *Pseudomonas* cib11264 Grown in Batch Culture. **Microbiology**, v. 102, n. 1, p. 13-21, 1977. DOI: 10.1099/00221287-102-1-13. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21224/>. Acesso em: 15 dez. 2023.

XIA, Ao-Nan; MENG, Xian-Shui; TANG, Xiao-Juan; ZHANG, Yan-Zhen; LEI, Sheng-Ming; LIU, Yun-Guo. Probiotic and related properties of a novel lactic acid bacteria strain isolated from fermented rose jam. **LWT – Food Science and Technology**, v. 136, p. 110-327, 2021. DOI: 10.1016/j.lwt.2020.110327.

Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643820313165>. Acesso em: 06 mai. 2023.

XIAO, Luyao; XU, Danling; TANG, Nanyu; RUI, Xin; ZHANG, Qiuqin; CHEN, Xiaohong; DONG, Mingsheng; LI, Wei. Biosynthesis of exopolysaccharide and structural characterization by *Lactocaseibacillus paracasei* ZY-1 isolated from Tibetan kefir. **Food Chemistry: Molecular Sciences**, China, v. 3, 2021. DOI: 10.1016/j.fochms.2021.100054. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35415646/>. Acesso em: 12 set. 2023.

XU, Xiaoging; PENG, Qinq; ZHANG, Yuwei; TIAN, Dandan; ZHANG, Pengbo; HUANG, Ying; MA, Lan; QIAO, Yu; SHI, Bo. A novel exopolysaccharide produced by *Lactobacillus coryniformis* NA-3 exhibits antioxidant and biofilm-inhibiting properties in vitro. **Food nutrition research**, v. 64, 2020. DOI: 10.29219/fnr.v64.3744. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32425737/>. Acesso em: 10 jan. 2024.

XU, Zhiyuan; GUO, Qingbin; ZHANG, Hui; WU, Yan; HANG, Xiaomin; AI, Lianzhong. Exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* S-3: Molecular, partial structural and rheological properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 194, p. 132–138, 2018. DOI: 10.1016/j.carbpol.2018.04.014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29801820/>. Acesso em: 04 jan. 2023.

XU, Yuanmei; YANLONG, Cui; YUE, Fangfang; LIU, Lihua; SHAN, Yuanyuan; LIU, Bianfang; JING, Haokun; LU, Xin. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria and *Bifidobacteria*: Structures, physiochemical functions and applications in the food industry. **Food Hydrocoll**, v. 94, p. 475–499, 2019. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2019.03.032. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/331957353_Exopolysaccharides_produced_by_Lactic_Acid_Bacteria_and_Bifidobacteria_Structures_Physiochemical_Functions_and_Applications_in_the_Food_Industry. Acesso em: 11 jan. 2024.

XU, Yunli; GUOWEI, Shu; LIU, Yu; MA, Lin; LI, Yichao; CHEN, Hiro; SHAN, Chao. Lactic Acid Bacteria and Yeasts from Milk Kefir Grains: Isolation, Characterization, Screening, and Identification. **Acta Universitatis Cibiniensis. Series E: Food Technology**, v.27, n. 1, p. 71-82, 2023. DOI: 10.2478/auclt-2023-0006. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/373761179_Lactic_Acid_Bacteria_and_Yeasts_from_Milk_Kefir_Grains_Isolation_Characterization_Screening_and_Identification. Acesso em: 13 dez. 2023.

YILDIZ, Hilal; KARATAS, Neva. Microbial exopolysaccharides: Resources and bioactive properties. **Process Biochemistry**, v. 72, p. 41-46, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.06.009>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1359511317317166>. Acesso em: 05 jan. 2024.

YOU, Xiu; YANG, Lin; ZHAO, Xiaojuan; MA, Kai; CHEN, Xiaohong; ZHANG, Changliang; WANG, Guangxian; DONG, Mingsheng; RUI, Xin; ZHANG, Mingsheng; LI, Wei. 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. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.05.027. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32389648/>. Acesso em: 17 out. 2022.

ZANNINI, Emanuele; WATERS, Deborah M.; COFFEY, Aidan; ARENDT, Elke K. Production, properties, and industrial food application of lactic acid bacteria-derived exopolysaccharides. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 3, p. 1121–1135, 2016. DOI: 10.1007/s00253-015-7172-2. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26621802/>. Acesso em: 02 fev. 2023.

ZAVALA, Lucía; ROBERTI, Paula; PIERMARIA, Judith A.; ABRAHAM, Analía G. Gelling ability of kefir in the presence of sucrose and fructose and physicochemical characterization of the resulting cryogels. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 8, p. 5039–5047, 2015. DOI: 10.1007/s13197-014-1577-2. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26243924/>. Acesso em: 29 out. 2023.

ZHENG, Jinshui; WITTOUCK, Stijn; SALVETTI, Elisa; FRANZ, Charles M. A. P.; HARRIS, Hugh M. B.; MATTARELLI, Paola; O'TOOLE, Paul W.; POT, Bruno; VANDAMME, Peter; WALTER, Jens; WATANABE, Koichi; WUYTS, Sander; FELIS, Giovanna E.; GÄNZLE, Michael G.; LEBEER, Sarah. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 2782–2858, 2020. DOI: 10.1099/ijsem.0.004107. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32293557/>. Acesso em: 23 set. 2023.

ZHOU, Jianzhong; LIU Xiaoli; JIANG Hanhu; DONG, Mingsheng. Analysis of the microflora in Tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis. **Food Microbiology**, v. 26, p. 770–775, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.04.009>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0740002009000987>. Acesso em: 14 nov. 2023.

ZIKMANIS, Peteris; BRANTS, Karlis; KOLESOVS, Sergejs; Semjonovs, Pavels. Extracellular polysaccharides produced by bacteria of the *Leuconostoc* genus. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 11, p. 161, 2020. DOI: 10.1007/s11274-020-02937-9. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/344614365_Extracellular_polysaccharides_produced_by_bacteria_of_the_Leuconostoc_genus. Acesso em: 26 ago. 2023.