

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL

MARIANA GOMES VIDAL SAMPAIO

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM POLISSACARÍDEO
BACTERIANO COM VISTAS A SEU POTENCIAL
BIOTECNOLÓGICO**

RECIFE
2014

MARIANA GOMES VIDAL SAMPAIO

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM POLISSACARÍDEO
BACTERIANO COM VISTAS A SEU POTENCIAL
BIOTECNOLÓGICO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Industrial.

Orientadores:

Prof.^a. Dra. Glícia Maria Torres Calazans

Prof. Dr. Wagner Eduardo Silva

**RECIFE
2014**

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Sampaio, Mariana Gomes Vidal

Produção e caracterização de um polissacarídeo bacteriano com vistas a seu potencial biotecnológico / Mariana Gomes Vidal Sampaio. – Recife: O Autor, 2014.

90 folhas.: il.

Orientadora: Glícia Maria Torres Calazans

Coorientador: Wagner Eduardo Silva

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Industrial, 2014.

Inclui bibliografia, anexos e apêndices

1. Biopolímero 2. Polissacarídeos 3. Fermentação I. Calazans, Glícia Maria Torres (orient.) II. Silva, Wagner Eduardo (coorient.) III. Título.

572.566

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2014-087

MARIANA GOMES VIDAL SAMPAIO

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM POLISSACARÍDEO
BACTERIANO COM VISTAS A SEU POTENCIAL
BIOTECNOLÓGICO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Industrial.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Ana Maria Souto-Maior
Departamento de Antibióticos/UFPE

Prof^a. Dra. Gláucia Manoella de Souza Lima
Departamento de Antibióticos /UFPE

Prof^a Dra. Glícia Maria Torres Calazans
Departamento de Antibióticos /UFPE

Dr. Wagner Eduardo Silva
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Recife, 25 de fevereiro de 2014.

Dedico aos meus pais Sérgio e Marilan e a avó
Mariêta pela paciência, dedicação e amor todos
os dias da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que realiza milagres na minha vida todos os dias, que me sustenta e dá forças para que eu não desamine na realização dos meus sonhos.

Aos meus pais, Sérgio e Marilan, minha fortaleza, amparo e refúgio, por terem sempre investido na minha educação fazendo o possível para me ver feliz e realizada. Amo vocês.

À minha avó Mariêta a quem eu tanto amo, pelas orações, preces, cuidado, preocupação e por ter sido responsável pela minha formação pessoal.

À minha orientadora Professora Glícia Calazans a quem tanto estimo e que mesmo há milhares de quilômetros de distância sempre acompanhou de perto o meu trabalho e foi solícita em todos os momentos.

Ao meu orientador Wagner Silva, pela paciência e grande aprendizado, com certeza uma das pessoas mais inteligentes que já convivi.

À Professora colaboradora do meu trabalho Márcia Vanusa que me recebeu no seu laboratório e sempre me dedicou grande atenção e cuidado.

Aos meus tios, Marcos, Marise e Mana que me acolheram, aprenderam a conviver comigo, aguentaram as minhas bagunças e torceram muito a cada etapa vencida ao longo desses dois anos.

À minha prima e afilhada Maria Eduarda e à “tia” Cris pelos momentos de descontração, caronas, desafios e desabafos.

Aos meus avós Mário, Benjamim (*in memoriam*) e Maria por todo o amor que sempre me dedicaram.

Às tias Raquel e Cândida Maria pela preocupação, incentivo e carinho.

À amiga Valéria Alves pela cumplicidade, companheirismo e milhões de mensagens trocadas ao longo desse período.

Ao amigo e afilhado Ramon Bezerra que também sonhou com esse título desde os tempos do estágio, pelo incentivo, apoio e dedicação. Essa vitória também é sua.

Aos meus amigos verdadeiros que apesar da distância sempre estiveram ao meu lado: Priscilla Agostinho, Nayla, Amanda, Priscila Oliveira, Mauro Filho, Débora, Rafaell, Juliana, Larissa, Anna Geórgia e Samylla.

Aos amigos que fiz em Recife, presentes de Deus e melhor turma do mundo: Livia, Bruno, Márcia, Temístocles, Ednaldo, Rafaela, Graciely, Milca e Raquel. Sem o apoio de vocês não teria sido possível.

Aos colegas do antigo LPF, em especial a Ludhimilla Lins que por tantas vezes esteve a disposição e me auxiliou no que foi necessário.

Aos professores do LAQIS, em especial a Mônica Belian pelo apoio e incentivo e aos colegas que me ajudaram e sempre me receberam muito bem.

À Professora Ana Maria Souto-Maior, sempre prestativa a me atender e tirar dúvidas e que por muitas vezes disponibilizou os equipamentos do seu laboratório.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular, em especial a Louise Oliveira, Carol Malafaia, Tayane de Cássia e Priscilla Moura.

Ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Industrial.

À Facepe pelo suporte financeiro.

À todas as pessoas que torceram e rezaram por mim e me fizeram mais confiantes para que esse sonho fosse realizado com êxito.

*“Cuide das minhas coisas que eu
cuido das suas, viva a minha vida, que eu
cuidarei da sua vida”*
João 12,25.

RESUMO

O presente estudo objetivou produzir e caracterizar, utilizando-se ferramentas espectroscópicas e físico-químicas, um polissacarídeo bacteriano, visando investigar seu potencial biotecnológico. O bastonete Gram-positivo produtor do polissacarídeo foi identificado por meio de técnicas de biologia molecular, que permitiram a amplificação do gene rDNA 16S pela PCR, os produtos da PCR foram sequenciados e identificados por meio da comparação com outras sequências depositadas no banco de dados Genbank do NCBI. A bactéria estudada, identificada como *Lactobacillus fermentum*, foi isolada como contaminante de mosto de fermentação alcoólica de uma indústria sucroalcooleira do estado de Pernambuco/Brasil. Para produção do biopolímero foi utilizado o meio líquido a base de melaço-sacarose, as fermentações foram realizadas durante 72 horas sob condições agitada (210 rpm) e estática, a 35 °C e pH inicial 6,5. O isolamento do polímero foi feito por precipitação com etanol P.A gelado, a concentração de biomassa foi determinada através de peso seco e a concentração de substrato (glicose, frutose e sacarose) foi quantificada utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O processo estático obteve uma quantidade de biomassa em torno de 7,37 g L⁻¹, enquanto o processo agitado apresentou 2,37 g L⁻¹ de biomassa. O processo estático também se apresenta como condição favorável para a produção do polissacarídeo, atingindo 44,5 g L⁻¹, enquanto na fermentação agitada a concentração obtida foi de 8,0 g L⁻¹. Houve uma queda constante na concentração do substrato sacarose durante a fermentação não agitada com consumo de quase 100% desse açúcar, entretanto, encontrando-se o sistema sob agitação foi consumido 37,9% de substrato, demonstrando menor consumo pela bactéria em condições de maior oxigenação. Os grupos funcionais presentes no polissacarídeo foram elucidados a partir da espectroscopia da região do infravermelho. A investigação acerca dos constituintes monoméricos do polímero (elucidação estrutural) foi realizada por ressonância magnética nuclear ¹H e ¹³C evidenciando que o mesmo era composto por glicose e galactose na razão 1,15 : 1. Foram realizados testes para o conhecimento de suas propriedades térmicas como: análise termogravimétrica (TGA), calorimetria exploratória diferencial (DSC) e ponto de fusão; sendo verificada para este último, uma temperatura de decomposição (em torno de 225 °C). Os resultados das análises químicas e térmicas comprovaram que a linhagem de *Lactobacillus fermentum* produz um exopolissacarídeo com características ainda não relatadas na literatura, que poderão ser de interesse para uso na indústria de cosméticos, farmacêutica ou de alimentos.

Palavras-chave: Biopolímero. *Lactobacillus fermentum*. Fermentação. Sequenciamento.

ABSTRACT

The aim of this work was to produce and characterize, according spectroscopic and physicochemical techniques, a bacterial exopolysaccharide (EPS). The rod-shaped Gram-positive cell-producer was identified by molecular biological techniques that have allowed the amplification of the 16S rDNA gene by PCR, whose products were sequenced and identified by comparison with others sequences deposited in the NCBI GenBank database. The bacteria, identified as *Lactobacillus fermentum*, was isolated as a contaminant of industrial ethanol fermentation from Pernambuco State / Brazil. For the biopolymer production, molasses-sucrose based medium was used and fermentations were conducted for 72 hours under conditions stirred and static (210 rpm) at 35°C and initial pH 6.5. The EPS isolation was made by precipitation using cold ethanol; biomass concentration was determined by dry weight and the concentration of substrate (glucose, fructose and sucrose) was quantified using high performance liquid chromatography (HPLC). The static procedure had generated biomass around 7.37 g L⁻¹, whose production of EPS was 44.5 g L⁻¹, while the stirred form enabled 2.37 g L⁻¹ of biomass and EPS concentration around 8.0 g L⁻¹. There was a constant decline in sucrose concentration during fermentation without stirring, with consumption of almost 100% of the sugar, however, lying under agitation system was consumed 37.9% of the substrate, demonstrating a reduced consumption of this carbon source, and an unfavorable condition for this bacterium, promoted by increasing of oxygen in medium. The functional groups present in the compound were elucidated according infrared spectroscopy (FTIR). Investigation about monomeric units of the EPS was performed by NMR ¹H and ¹³C indicating that it was composed by glucose and galactose in the ratio 1.15 : 1. The thermal properties of the EPS were checked using thermogravimetric analysis (TGA) and differential scanning calorimetry (DSC), as well as melting point experiment was carried out, confirming its high decomposition temperature (about 225 °C). The results of the chemical and thermal analyzes showed that *Lactobacillus fermentum* produces an exopolysaccharide with features not yet reported in the literature which could present important properties for cosmetic, pharmaceutical or food industry.

Keywords: Biopolymer. *Lactobacillus fermentum*. Fermentation. Sequencing.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 OBJETIVOS.....	18
2.1 Objetivo geral	18
2.2 Objetivos específicos	18
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1 Bactérias lácticas	19
3.2 <i>Lactobacillus fermentum</i>	21
3.3 Identificação molecular de espécies bacterianas	24
3.4 Polissacarídeos.....	25
3.5 Polissacarídeos de uso industrial produzidos por micro-organismos	27
3.6 Composição bioquímica e estrutura dos exopolissacarídeos.....	29
3.7 Caracterização química de polissacarídeos	33
4 MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1 Micro-organismo	36
4.2 Meios de cultivo e condições de crescimento	36
4.2.1 Condições de preparo do inóculo	36
4.2.2 Condições de preparo do meio de pré-fermentação (MPF)	36
4.2.3 Condições de agitação do meio de fermentação	37
4.3 Produção do polímero.....	37
4.3.1 Fermentação em meio Melaço-Sacarose	37
4.3.2 Dosagem da biomassa	38
4.3.3 Determinação do pH.....	38
4.3.4 Extração do polímero	38
4.3.5 Cálculo do consumo de glicose, frutose e sacarose do meio MPP.....	39

4.4 Teste de utilização de açúcares pelo micro-organismo para crescimento e produção do polímero	40
4.5 Caracterização do biopolímero	40
4.5.1 Purificação e fracionamento do polímero.....	40
4.5.2 Hidrólise em banho-maria com ácido trifluoracético (TFA).....	41
4.5.3 Análise do polímero hidrolisado	41
4.5.4 Espectroscopia de Absorção Eletrônica UV / Visível.....	42
4.5.5 Espectroscopia na região do Infravermelho (FT-IR).....	42
4.5.6 Análises térmicas – TGA e DSC	42
4.5.7 Determinação de mudanças nas características físicas do polímero	43
4.5.8 RMN ^1H e ^{13}C	43
4.6 Identificação molecular da bactéria	43
4.6.1 Extração de DNA	44
4.6.2 Amplificação do gene rDNA 16S	45
4.6.3 Purificação dos produtos da PCR.....	46
4.6.4 Sequenciamento e análise das informações.....	46
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
5.1 Identificação molecular do micro-organismo	47
5.2 Condições de produção de <i>Lactobacillus fermentum</i>	49
5.3 Purificação e caracterização do biopolímero.....	58
5.3.1 Análise do biopolímero hidrolisado	58
5.3.2 Elucidação dos grupos funcionais presentes no composto.....	61
5.3.3 Análises térmicas do polissacarídeo produzido por <i>L. fermentum</i>	64
5.3.4 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear ^1H e ^{13}C	66
6 CONCLUSÃO	70
REFERÊNCIAS	71
ANEXO A Meios de cultura.....	84
ANEXO B Tampões utilizados para extração de DNA.....	87
APÊNDICE A Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Próton (^1H) do polímero isolado.....	88
APÊNDICE B Ampliação do Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Próton (^1H) do polímero isolado.....	89
APÊNDICE C Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono (^{13}C) do polímero isolado.....	90

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1	Representação das vias do metabolismo homofermentativo e heterofermentativo em bactérias lácticas do gênero <i>Lactobacillus</i> (Adaptado de Kandler, 1983).....	20
Figura 3.2	Estrutura da xantana produzida por <i>Xanthomonas campestris</i> (QIAN et al.,2006).....	30
Figura 3.3	Estrutura da dextrana (BADEL; BERNARDI; MICHAUD, 2011).....	31
Figura 3.4	Estrutura da levana (MANANDHAR et al., 2009).....	32
Figura 3.5	Estrutura de EPS produzido por <i>Lactobacillus fermentum</i> (GERWIG et al.,2013).....	33
Figura 4.1	Cromatógrafo com detector RID (Agilent Technologies - Série 1100).....	40
Figura 4.2	Aparelhos Calorimetria Diferencial Exploratória modelo DSC 60 SHIMADZU (a esquerda) e Jupiter STA 449 F3 NETZSCH (a direita).....	43
Figura 5.1	Produtos de amplificação do Gene 16S rDNA da bactéria <i>L. fermentum</i> com <i>primers</i> específicos; onde M representa o marcador Invitrogen 100pb, C representa o controle negativo e 1 representa a amostra em estudo.....	47
Figura 5.2	Colônia de <i>Lactobacillus fermentum</i> cultivada em meio MSA (Tabela 4.1) (PADILHA, 2009).....	50
Figura 5.3	Colônia de <i>Lactobacillus fermentum</i> cultivada em MBP-Sacarose com 72 horas de incubação.....	51
Figura 5.4	Resultados da concentração de biomassa (g L^{-1}) do micro-organismo <i>Lactobacillus fermentum</i> a partir das fermentações a 35 °C sem agitação e com agitação (210 rpm).....	52
Figura 5.5	Resultados da concentração de polissacarídeo produzido de forma estática e agitada (210 rpm), a 35°C.....	53
Figura 5.6	Valor do pH ao longo de 72 horas de fermentação sob as condições: com agitação (círculo) e estático (quadrado).....	54
Figura 5.7	Consumo da fonte de carbono ao longo de 72 horas de fermentação sem agitação.....	56

Figura 5.8	Consumo de substrato ao longo de 72 horas de fermentação com agitação.....	56
Figura 5.9	Cromatograma do polímero hidrolisado com TFA 2 mol L ⁻¹	59
Figura 5.10	Espectro de absorção eletrônica (UV-VIS) obtido a partir de solução aquosa do biopolímero (3,6 mg mL ⁻¹) produzido por <i>Lactobacillus fermentum</i>	62
Figura 5.11	Análise espectroscópica na região do infravermelho (4000-400 cm ⁻¹), utilizando-se pastilha de KBr contendo o biopolímero produzido por <i>Lactobacillus fermentum</i>	63
Figura 5.12	Análise termogravimétrica (TGA) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) do biopolímero produzido por <i>Lactobacillus fermentum</i>	65
Figura 5.13	Ampliação detalhada do Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Próton (¹ H).....	67
Figura 5.14	Ampliação do Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono (¹³ C).....	68
Figura 5.15	Estrutura proposta para o exopolissacarídeo produzido por <i>Lactobacillus fermentum</i>	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1	Componentes das reações de PCR utilizados para a caracterização molecular da bactéria.....	46
Tabela 5.1	Comparação da sequência de rDNA 16S do micro-organismo com sequências conhecidas.....	48
Tabela 5.2	Produtividade (Q_P), rendimento produto/substrato de sacarose ($Y_{P/S}$) e rendimento produto/biomassa ($Y_{P/X}$) de <i>L. fermentum</i> , em 72 horas de fermentação, em meios com agitação (210 rpm) e estático.....	58
Tabela 5.3	Concentração dos monômeros do polímero hidrolisado de acordo com o tempo em banho-maria em ebulição e diferentes concentrações do ácido (TFA).....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAL	-Bactérias Ácido Láticas
BHI	- <i>Brain Heart Infusion</i>
BLASTn	- <i>Basic Lenth Alignamnent Search Tool</i>
CCB	-Centro de Ciências Biológicas
CCS	-Centro de Ciências da Saúde
CGAR	-Cromatografia gasosa de alta resolução
DSC	- <i>Differential Scanning Calorimetry</i>
EPS	-Exopolissacarídeo
FT-IRS	- <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>
GRCS	-Genericamente Reconhecido Como Seguro
HPLC	- <i>High Performance Liquide Chromatography</i>
IV	-Infravermelho
MALDI	- <i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i>
MBP	-Meio Básico de Produção
MPF	-Meio de Pré-Fermentação
MPP	-Meio de Produção do Polímero
MRS	- <i>Man Rogosa Sharp</i>
MS	- Meio Melaço-Sacarose
MSA	-Meio Melaço-Sacarose-Ágar
NB1	-Nível de Biossegurança 1
NCBI	- <i>National Center for Biotechnology Information</i>
P	-Concentração de polímero (g L^{-1})
PCR	- <i>Polymerase Chain Reaction</i>
Q_p	-Produtividade volumétrica de produto ($\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$)
RMN	-Ressonância Magnética Nuclear
S	-Concentração de substrato (g L^{-1})
SDS	- <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
Taq	- <i>Thermus aquaticus</i>
TFA	- <i>Trifluoracetic Acid</i>
TGA	- <i>Thermogravimetric analysis</i>
TE	-TRIS-EDTA

UFPE	-Universidade Federal do Pernambuco
UV-Vis	-Ultravioleta Visível
X	- Concentração de biomassa (g L^{-1})
$Y_{P/S}$	- Rendimento de produto em substrato (g g^{-1})
$Y_{P/X}$	- Rendimento de produto em biomassa (g g^{-1})

1 INTRODUÇÃO

A biotecnologia vem se destacando como um promissor campo de atuação para acadêmicos e industriais. O avanço nas pesquisas permitiu a descoberta de novas moléculas, como os exopolissacarídeos, que assumem grande importância devido ao extenso potencial de aplicação nos mais diversos campos da indústria. (CALAZANS et al., 1997; PAULA et al., 2008; COIMBRA; LOPES; CALAZANS., 2010; SANTOS et al., 2011; MACIEL et al., 2012).

Polissacarídeos são polímeros naturais e podem ser constituídos a partir de unidades monossacarídicas similares ou por diferentes tipos de monossacarídeos. São classificados como homopolissacarídeos (a exemplo da celulose), enquanto aqueles que possuem diferentes tipos de monossacarídeos na sua constituição são denominados heteropolissacarídeos (a exemplo da goma arábica). Os compostos que possuem aplicação ou potencial de uso industrial são provenientes de plantas, algas, fungos, bactérias ou animais (MOTHÉ et al., 2008; CUNHA et al., 2009).

Para indicação de uso biotecnológico e produção em larga escala dos produtos obtidos por via fermentativa, faz-se necessária a identificação da linhagem ao nível de espécie e o conhecimento de suas características fisiológicas, microbiológicas, bioquímicas e moleculares para que se verifique se o produto formado possui potencial para emprego industrial e atende as exigências de biossegurança para produção em larga escala. Dessa forma, a bactéria precisa ser identificada quanto à natureza molecular e o polímero produzido quanto à natureza química, de modo a afirmar se a linhagem corresponde a uma espécie nova ou não, e se já existem relatos de síntese do produto por tal gênero e espécie.

A décadas, os polissacarídeos naturais vêm sendo intensamente investigados devido às suas propriedades físico-químicas e possíveis aplicações industriais. Algumas de suas vantagens incluem a biodegradabilidade, abundância na natureza e versatilidade de uso em diversas áreas como engenharia, biotecnologia e medicina, além de muitas vezes se tratar de um composto atóxico. Filmes finos de polissacarídeos podem se formar sobre superfícies sólidas e garantir uma nova aplicação em sensores ou biossensores (EIRAS et al., 2007). Na área médica, podemos encontrar os polissacarídeos na constituição de alguns medicamentos e vacinas (SUTHERLAND, 2002). Também atuam em uma variedade de respostas biológicas de defesa, tais como: atividade antitumoral, imuno-moduladora e antiinflamatória (SILVA et al., 2006; ZHANG et al., 2007; ANANTHI et al., 2010).

Comparado às gomas vegetais, os polissacarídeos microbianos apresentam vantagens como: independência das condições climáticas, possibilidade de utilização de matérias primas mais baratas, de acesso fácil (adequando-se à disponibilidade regional) e produção em menor tempo, podem ser manipulados em pequenos espaços físicos e apresentam maior uniformidade em suas características físico-químicas (ERNANDES, GARCIA-CRUZ, 2005).

Diversas abordagens são utilizáveis quando se considera o potencial para a produção de polissacarídeos microbianos (MELO et al., 2007). Eles podem ser sintetizados a partir de substâncias puras de alto custo, ou podem ser produzidos a partir de fontes prontamente disponíveis como substratos fermentáveis (SUTHERLAND, 1997).

A maioria dos polissacarídeos microbianos é produzida por meio do crescimento em fermentadores de tanque agitado, nos quais se utilizam a glicose e a sacarose como fonte de carbono, além dessas, outras fontes de carbono estão sendo utilizadas para a produção de biopolímeros tais como: soro de leite, resíduo de suco de maçã, melaço e caldo de cana de açúcar (NITSCHKE et al., 2001; CAZETTA; CELLIGOI, 2005; DRUZIAN; PAGLIARINI, 2007; BRANDÃO et al., 2008).

A bactéria produtora de polissacarídeo que motivou esse trabalho foi isolada como contaminante de uma fermentação industrial para produção de etanol. Vários estudos foram realizados com a mesma desde seu isolamento, incluindo: estabelecimento das melhores técnicas de conservação da linhagem, ensaios preliminares para produção do polissacarídeo, até ensaios bioquímicos que visavam a identificação do gênero. Os ensaios anteriores iniciados por Araújo (2006) e repetidos por Padilha (2009) confirmaram que a citada bactéria tratava-se de um bastonete Gram-positivo, não sendo possível até aquele momento, enquadrá-la entre as espécies apresentadas no Bergey's Manual (1989; 2009).

Dessa forma, utilizando-se a biologia molecular como ferramenta do presente estudo, identificou-se o gênero e a espécie da bactéria em questão, enquanto o polissacarídeo produzido também teve sua estrutura molecular definida e suas propriedades térmicas estabelecidas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar e identificar uma bactéria Gram-positiva produtora de biopolímero e realizar caracterização térmica e espectroscópica desse produto visando conhecer suas possíveis aplicações biotecnológicas.

2.2 Objetivos Específicos

- Identificar a bactéria ao nível de espécie utilizando métodos moleculares;
- Produzir o polissacarídeo em quantidades suficientes para a realização das análises químicas necessárias, nas condições definidas de meio de cultivo, inóculo, tempo de processo, aeração, temperatura e pH inicial;
- Desenvolver metodologia para purificação do polissacarídeo e realização das análises de caracterização química do mesmo;
- Caracterizar o biopolímero produzido pela bactéria utilizando testes espectroscópicos e ressonância magnética nuclear ^1H e ^{13}C ;
- Aperfeiçoar o método de hidrólise do polímero em estudo e realizar análises por cromatografia de alta resolução para identificação de seus monômeros componentes;
- Realizar a análise termogravimétrica (TGA) e a calorimetria exploratória diferencial (DSC) do polímero para conhecimento de suas propriedades térmicas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Bactérias lácticas

São denominadas bactérias lácticas, os cocos (*Streptococcus*, *Pediococcus* e *Leuconostoc*) e os bacilos (*Lactobacillus* e *Bifidobacterium*), caracterizados como micro-organismos gram-positivos, não esporogênicos, aerotolerantes, exigentes quanto a fatores nutricionais, tolerantes a ácido e fermentativos, cujo principal produto da degradação de açúcar é o ácido láctico (KANDLER, 1983).

Entre a diversidade de bactérias produtoras de exopolissacarídeos (EPS), que são todas as formas de polissacarídeos microbianos encontrados fora da parede celular (SUTHERLAND, 1972), as bactérias lácticas ganharam atenção especial por não apresentarem risco para a saúde e o produto final adquirir uma textura e estabilidade melhoradas, possibilitando um impacto significativo para o desenvolvimento de novos produtos (ISMAIL; NAMPOOTHIRI, 2010). Além disso, as bactérias lácticas desempenham um papel importante na fermentação de alimentos, seus produtos são caracterizados como higiênicos e possuem estabilidade de armazenamento e propriedades sensoriais atraentes. (SAVAGODO et al., 2004).

As propriedades reológicas dos EPS produzidos por bactérias ácido lácticas (BAL) são definidas com base na sua massa molecular e consequente distribuição, constituição dos resíduos de açúcar, ligação entre os monômeros e grupos laterais presentes (SHENE, 2008).

No que diz respeito ao metabolismo da glicose nas bactérias lácticas, a glicose é fermentada por duas vias: homofermentativa e heterofermentativa. Através da via homofermentativa, um mol de glicose é convertido em dois moles de lactato pela glicólise (via Embden-Meyerhof-Parnas), enquanto na heterofermentativa ou via Warburg-Dickens, um mol de glicose é convertido em um mol de lactato e um mol de etanol ou ácido acético (ZAUNMULLER et al., 2006).

No grupo formado por homofermentativos obrigatórios, as hexoses são quase totalmente convertidas em ácido láctico pela via Embden-Meyerhof de forma que 1 mol de hexose leva a formação de 2 moles de ácido láctico e 2 moles de ATP. Esse metabolismo é caracterizado pela quebra de frutose 1,6-bifosfato em duas trioses fosfato que são posteriormente convertidas a lactato, conforme descrito na figura 3.1. Os lactobacilos heterofermentativos facultativos são capazes de fermentar hexoses de forma semelhante ao

grupo homofermentativo, porém, sob condições limitadas de glicose, podem converter as hexoses em ácido láctico, ácido acético e/ou etanol (KANDLER, 1983).

Os lactobacilos heterofermentativos obrigatórios utilizam a via 6-fosfogluconato/fosfocetolase. Em anaerobiose, as hexoses são convertidas em quantidades equimolares de ácido láctico, etanol e/ou ácido acético, gás carbônico e ATP. Tais bactérias realizam a oxidação de glicose-6-fosfato a gluconato-6-fosfato, o qual sofre descarboxilação e a pentose resultante (xilulose-5-fosfato) é desdobrada em duas moléculas: gliceraldeído-3-fosfato e acetil-fosfato. O gliceraldeído-3-fosfato origina o lactato, enquanto o acetil-fosfato pode seguir rotas diferenciadas, transformando-se em acetato ou em etanol (Figura 3.1) (KANDLER, 1983).

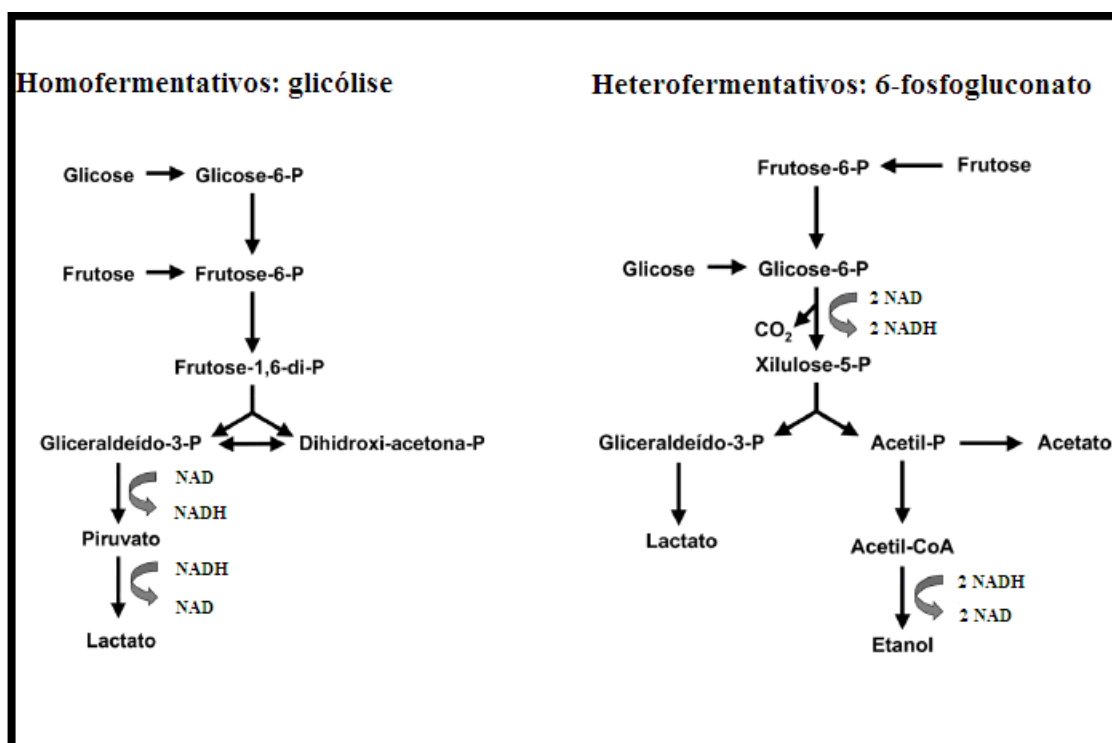


Figura 3.1 - Representação das vias do metabolismo homofermentativo e heterofermentativo em bactérias lácticas do gênero *Lactobacillus* (Adaptado de Kandler, 1983).

Na fermentação láctica há diminuição do rendimento fermentativo por não ocorrer a conversão da glicose em etanol e o produto final do metabolismo é o ácido láctico que está acoplado ao crescimento bacteriano (NARENDRANATH, et al.,1997). O efeito do ácido láctico sobre a própria bactéria ainda não é muito conhecido, porém o que se sabe é que ocorre difusão passiva levando ao acúmulo intracelular e há redução no pH, afetando a

permeabilidade da membrana. Um fator determinante da resistência bacteriana aos estresses causados pela presença desses ácidos seria a quantidade de ácidos graxos presentes na membrana plasmática (VAN DE GUCHTE, 2002).

A bactéria, motivo desse trabalho, foi isolada a partir de uma contaminação de fermentação industrial. Estudos realizados por Cherubim (2003) demonstraram a predominância de bactérias gram-positivas e em forma de bastonetes como contaminantes no processo industrial de fermentação alcoólica, com destaque para os gêneros *Bacillus* e *Lactobacillus* e as espécies *L. fermentum* e *L. helveticus*, sendo o gênero *Lactobacillus* considerado um dos contaminantes bacterianos mais comuns, inibindo o crescimento e o metabolismo das leveduras pela ação de metabólitos como o ácido acético e o ácido láctico. Frequentemente, esses contaminantes competem com as leveduras por nutrientes do meio (THOMAS, HYNES, INGLEDEW, 2002) o que contribui para que essas bactérias sejam encontradas como contaminantes naturais da fermentação, alterando o comportamento das leveduras devido a pressão seletiva exercida pela modificação dos parâmetros físico-químicos do meio (KENNES, et al., 1991).

Lactobacillus são resistentes ao calor e podem metabolizar e se desenvolver sob baixas condições de pH e anaerobiose, a sua presença afeta a fermentação das leveduras reduzindo o seu crescimento, bem como a produção de etanol. Após a fermentação, os produtos finais quando concentrados no fermentador, podem limitar a produtividade das células de levedura devido ao baixo pH (CHIN; INGLEDEW, 1994).

É sabido, também, que as bactérias lácticas produzem peptídeos com a função de executar a comunicação célula-célula por meio de uma estratégia de regulação denominada “quorum sensing” e exercem atividade antimicrobiana. Essa forma de sinalização demonstra que ainda são muitos os aspectos de interação existentes entre leveduras e bactérias lácticas a serem estudados a fim de evitar a contaminação e a redução do rendimento industrial (QUADRI, 2002).

3.2 *Lactobacillus fermentum*

O gênero *Lactobacillus* possui cerca de cento e quarenta espécies utilizadas pela indústria alimentícia, constituem parte da microbiota natural presente em alimentos como: leite cru, produtos fermentados lácteos, frutas, legumes e produtos de carne, cuja função é melhorar a qualidade desses produtos industrializados e trazer benefícios para a saúde

(SINHG et al., 2009). Para a produção dos polissacarídeos, a maioria das bactérias dependem de carbono, fonte de nitrogênio e condições ideais de temperatura, pH e taxa de oxigênio. A fonte de carbono utilizada pode diferir de acordo com a espécie, sendo a sacarose o melhor substrato para vários *Lactobacillus* (VAN GEEL SCHUTTEN, et al., 1998).

Cerca de trinta espécies de *Lactobacillus* são descritos como produtores de EPS, entre eles os mais conhecidos são: *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. rhamnosus* e *L. plantarum*. Estes são cultivados principalmente em temperaturas entre 30 e 37 °C e em meios ricos como MRS (*Man Rogosa Sharp*), leite ou derivados, sendo a cultura geralmente conduzida sem agitação devido as suas condições anaeróbicas (CERNING et al., 1994; ASLIM et al., 2005; LIN, CHANG CHIEN, 2007; PHAM et al., 2000; SHOJI et al., 2013; CHARALAMPOPOULOS, VAZQUEZ, PANDIELLA, 2009).

Lactobacillus fermentum é um micro-organismo de uso benéfico (LEROY et al., 2002) que foi isolado pela primeira vez em 1901 por Beijerinck e tem sido encontrado em diversos ambientes, produtos alimentares e no corpo humano (BEIJERINCK, 1901; FONS et al., 1997; SILVESTER, DICKS, 2003).

De acordo com os estudos de Mikelsaar e Zilmer (2009), *L. fermentum* ME-3 tem a capacidade de proteger o hospedeiro contra diferentes doenças induzidas por bactérias patogênicas como *Salmonella* spp., *Shigella* spp. e infecções do trato urinário causadas pela *Escherichia. coli*, além de inflamação e estresse oxidativo. A eficácia funcional da bactéria como probiótico foi provada pela erradicação de micro-organismos patogênicos e a redução de granulomas no fígado e baço de ratos infectados com *Salmonella Typhimurium* e tratados com a combinação de ofloxacina e *L. fermentum* ME-3. Quando utilizado em cápsulas ou gêneros alimentícios (iogurte, kefir e queijo) demonstrou-se que este probiótico aumentou as contagens de lactobacilos no trato intestinal, além de efeitos anti-oxidante, e anti-aterogênico, em diferentes indivíduos (voluntários saudáveis e pacientes). *L. fermentum* possui propriedades desejáveis, tratam-se de micro-organismos não patogênicos para os seres humanos, possuem resistência para sobreviver no trato intestinal e apresentam efeitos benéficos para o sistema imunológico humano.

Probióticos podem impedir a colonização de patógenos através do mecanismo de produção de substâncias antagonistas como: ácido láctico, H₂O₂, ou bacteriocinas (REID; BURTON, 2002). Bacteriocinas produzidas por BAL são aplicadas na medicina, onde podem fornecer alternativas para antibióticos no tratamento de infecções em humanos e animais. *Lactobacillus* com ação antimicrobiana foram usados para desenvolver produtos para prevenção e tratamento de infecções genitais (MAGGI et al., 2000)

Estudos realizados por Bao et al. (2010) com a linhagem *L. fermentum* F6 concluíram que a mesma também possui propriedade probiótica potencial (VELEZ; DE KEERSMAECKER; VANDERLEYDEN, 2007), é resistente a ácidos e sais biliares, sobrevive de modo favorável no trato gastrointestinal e tem a capacidade de produzir substâncias antibacterianas no meio MRS.

Lactobacillus spp têm sido recomendados como agentes bioterapêuticos seguros para o tratamento e a prevenção de doenças gastrintestinais e do trato vaginal. Estudos realizados por Kaur et al.(2013) relatam que a fermenticina HV6b produzida por *L. fermentum* HV6b poderia alvejar patógenos vaginais deixando a microbiota vaginal saudável e intacta. Esses resultados tornaram-se possíveis através da realização de ensaios de inibição de crescimento tanto na microbiota do indivíduo normal quanto na patogênica.

Estudos realizados por Kaewnopparat et al.(2013) com *L. fermentum* SK5 demonstraram que a cepa possuía potencial antimicrobiano contra as bactérias *Escherichia coli* (gastrointestinal patogênica) e *Gardnerella vaginalis* (trato vaginal). Provavelmente a substância seria um composto de bacteriocina com um peso molecular superior a 10 kDa, onde peróxido de hidrogênio também foi encontrado. Além disso, *L. fermentum* SK5 teve boas características de autoagregação e uma hidrofobicidade de superfície elevada que aumentou sua capacidade de adesão às células epiteliais e formação de biofilmes. Desse modo, *Lactobacillus* mostrou coagregação com *E. coli* e *G. vaginalis*, prejudicando a colonização por esses micro-organismos, sendo provável que esta estirpe possua aplicações potenciais para utilização como probiótico benéfico na proteção contra as infecções microbianas gastrointestinais e vaginais.

Além das outras propriedades, *Lactobacillus fermentum* também produzem biossurfactantes (VELRAEDS et al.,1996). O termo biossurfactante tem sido utilizado para qualquer composto produzido por micro-organismo que possua propriedade tensoativa. De acordo com a sua estrutura química, diferentes classes de biossurfactantes podem ser distinguidas, estes possuem aplicações industriais e biomédicas, devido a biodegradabilidade e menor toxicidade quando comparado aos surfactantes sintéticos (JENNY; DELTRIEU; KAPPELLI, 1993).

Estudos de biologia molecular foram realizados através do isolamento dos DNAs genômico e plasmidial por Jayashree et al. (2013) da cepa de *L. fermentum* MTCC 8711, comprovando que o genoma dessa linhagem contém sete plasmídeos de diferentes tamanhos e que nenhum deles apresenta os genes de resistência a antibióticos. Portanto, *L. fermentum*

MTCC 8711 pode ser utilizada como uma estirpe probiótica para melhorar o funcionamento intestinal.

3.3 Identificação molecular de espécies bacterianas

Lactobacillus são geneticamente diversificados, com o seu conteúdo de guanina e citosina variando de 32% para *L. mali* a 54% para *L. pontis* e *L. fermentum*, esses valores ultrapassam o limiar necessário para um gênero, dando a impressão que *Lactobacillus* não é um gênero bem definido (VANDAMME et al., 1996). Para facilitar a identificação e a caracterização das espécies de *Lactobacillus* são utilizadas técnicas convencionais de identificação bacteriana baseadas nas características morfológicas e fenotípicas das amostras, porém, essas técnicas são limitadas devido à insuficiente reprodutibilidade dos testes e pela baixa capacidade de diferenciação entre linhagens de uma determinada espécie (OLIVE; BEAN, 1999). A utilização de técnicas moleculares como as que são baseadas nos genes rDNA e na reação em cadeia da polimerase (PCR) tem contribuído fortemente para uma análise fidedigna acerca da diversidade das espécies (SCHNEEGURT; KULPA, 1998).

Os ácidos ribonucleicos ribossomais (rRNAs) são bastante utilizados nas pesquisas sobre biodiversidade, uma vez que seus genes, os rDNAs, são amplamente distribuídos entre os diversos grupos de seres vivos e possuem alto grau de conservação (LANE et al., 1985); dessa forma, as aplicações pioneiras utilizando técnicas baseadas em ácidos nucleicos, levam em consideração as relações filogenéticas entre micro-organismos determinada pela análise da sequência do 16S rDNA, para a observação da diversidade e análise da estrutura de comunidades (MACRAE, 2000; KOZDROJ; VAN ELSAS, 2000). Esses genes são utilizados para as determinações filogenéticas, pois possuem todas as características que definem um marcador molecular (CLARRIDGE, 2004).

A sequência do gene do rDNA 16S possui aproximadamente 1500 pares de bases e é um gene grande composto por regiões variáveis e conservadas, o sequenciamento desse gene oferece uma ferramenta para a descrição de novas espécies de bactérias. Ao contrário de um teste fenotípico, esse é universal porque todas as espécies bacterianas possuem pelo menos uma cópia do gene do rDNA 16S. Além disso, não há variabilidade quando lido por observadores diferentes e os resultados podem ser facilmente transferidos de um laboratório para outro e analisados através de bancos de dados eletrônicos (WOESE, 2000).

Na PCR, frequentemente a enzima Taq (*Thermus aquaticus*) é utilizada para amplificar as sequências de DNA específicas de interesse. Os oligonucleotídeos são designados para anelamento do DNA genômico alvo, estes *primers* são estendidos pela DNA-polimerase até que o segundo *primer* é alcançado. O DNA-duplex é desnaturado, os *primers* são re-anelados e uma segunda ronda de extensão dá seguimento. Os produtos de PCR amplificados podem ser purificados, analisados por eletroforese em gel de agarose e encaminhados para o sequenciamento (SCHNEEGURT; KULPA, 1998).

Após o sequenciamento, ocorre a análise comparativa de sequências nucleotídicas do gene 16S rDNA que tem sido largamente utilizada devido a disponibilidade de um grande número de sequências desse gene depositadas em bancos de dados como GenBank, RDP e EMBL, dessa forma, é possível a comparação das sequências obtidas nos estudos com as sequências presentes nesses locais, possibilitando a identificação das espécies (COUTINHO et al., 1999).

3.4 Polissacarídeos

Polissacarídeos são amplamente produzidos por plantas, algas e animais, além de micro-organismos (fungos e bactérias). São biomacromoléculas que juntamente com as proteínas e os polinucleotídeos desempenham papéis essenciais nas atividades fisiológicas de seres vivos, como por exemplo: a comunicação célula-célula, a adesão celular e o reconhecimento molecular do sistema imunológico (DWEK, 1996).

As bactérias sintetizam uma série de polissacarídeos os quais são definidos pela sua localização na célula, podem ser intracelulares localizados no citosol, constituintes da parede celular como o peptidoglicano e o ácido teicóico e há ainda um grupo localizado no exterior da parede celular que forma uma coesa camada morfológica denominada cápsula ou polissacarídeo capsular. Alternativamente, o polímero pode ser constituído por um polissacarídeo viscoso com pouca ou nenhuma associação celular e ligação à superfície da célula, o exopolissacarídeo (EPS) (CERNING, 1995, SUTHERLAND, 1972).

Muitas espécies microbianas, especialmente as procariotas, têm capacidade de produzir exopolissacarídeos (EPS), essa denominação foi proposta por Sutherland (1972) e abrange todas as formas de polissacarídeos microbianos encontrados fora da parede celular que apresentam características importantes tais como: biocompatibilidade, degradabilidade e

atoxicidade, que os tornam a classe de maior interesse entre os biopolímeros (PIMENTA; LOPES; FRANÇA, 2008).

Em bactérias patogênicas, como *Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus agalactiae*, EPS capsulares e lipopolissacarídeos O-antigênicos encontram-se envolvidos com a resposta imune (DE VUYST, 1999). Alguns EPSs possuem efeitos benéficos para a saúde, atuando como prebióticos ou como anti-inflamatórios (SALAZAR et al., 2008; VIDEROLA et al., 2007). O papel dos EPSs nas bactérias não está claramente definido, sabe-se que a estrutura capsular ajuda a proteger a célula contra condições ambientais desfavoráveis, como dessecação, presença de substâncias tóxicas, calor, aumento da pressão osmótica e absorção de íons metálicos. Outra característica consiste na participação dos polissacarídeos no aparecimento de biofilmes, provavelmente, por que eles favorecem o aumento do contato entre a matriz e as bactérias (JOLLY et al., 2002).

Mais de um polissacarídeo pode ser secretado por uma mesma espécie, porém o mau isolamento e a técnica de purificação utilizada podem mimetizar esse resultado. Estudos realizados por Grobbs et al. (1997) relataram que diferentes composições de exopolissacarídeos podem ser sintetizados a partir de uma mesma espécie, dependendo das condições de fermentação utilizadas e das técnicas aplicadas de isolamento e purificação. Os meios de cultura e as condições de crescimento da bactéria são considerados fatores que influenciam as variações nas ligações glicosídicas e a composição dos monômeros dos heteropolissacarídeos (DE VUYST; DEGEEST, 1999).

A alta razão de C:N é um fator que pode favorecer a síntese de polissacarídeos de interesse; adjunto a isso, o aumento da viscosidade do caldo de fermentação atrelado à eficácia da mistura e à aeração, consistem em fatores primordiais para o crescimento dos micro-organismos (SUTHERLAND, 2002). Os polissacarídeos podem ser obtidos por meio de centrifugação, posteriormente são purificados e isolados de acordo com a sua capacidade de solubilização em água e solventes orgânicos, ou a partir das diferenças nas propriedades iônicas. Aqueles que possuem diferentes tamanhos e pesos moleculares são gradualmente separados através de agentes precipitantes como: etanol, metanol e acetona, além da cromatografia em gel (YANG; ZHANG, 2009).

Os EPSs podem ser utilizados como biofloculantes, bioabsorventes, produtos de encapsulação, agentes de remoção de metais pesados e resinas de troca iônica (LIU et al., 2010). Ainda tem sido investigados com relação a suas aplicações clínicas, além de atuar como potenciais aditivos alimentares, apresentando benefícios para a saúde humana e animal. Novos biopolímeros microbianos podem ser melhores que os polímeros disponíveis no

mercado ou substituir os produtos alimentares tradicionais devido à melhoria nas características reológicas e de estabilidade. Entretanto, é necessário um conhecimento profundo da biossíntese e da relação estrutura / função (DE VUYST, 2001).

3.5 Polissacarídeos de uso industrial produzidos por micro-organismos

A indústria alimentícia utiliza polissacarídeos de plantas e algas para garantir o espessamento e a produção de agentes gelificantes. No entanto, essas fontes podem não ser confiáveis por adquirir consistência variável ou serem produzidas em quantidades limitadas, necessitando o desenvolvimento de polissacarídeos de origem microbiana, preparados a partir dos processos biotecnológicos convencionais (LAWS, GU, MARSHALL, 2001). Como a demanda de consumidores por produtos com baixo teor de gordura ou açúcar e baixos níveis de aditivos é crescente, a busca por produtos que sejam mais saudáveis também contribui para que os EPSs se tornem uma alternativa viável (JOLLY et al., 2002).

Os polissacarídeos de maior importância produzidos em escala industrial são: xantanas, gelanas de *Sphingomonas paucimobilis*, succinoglicanas, dextranas de *Leuconostoc mesenteroides*, pululanas e curdulananas, estes possuem potencial para exploração comercial devido às suas características químicas ou farmacológicas (RINAUDO, 2008; SUTHERLAND, 1998; BANIK, KANARI, UPADHYAY, 2000; AMAN, SIDDIQUI, QADER, 2012).

A goma xantana (Figura 3.2) é um produto de muitas cepas de *Xanthomonas campestris*, constitui um dos principais produtos de polissacarídeos obtidos a partir de bactérias e possui as mais variadas aplicações comerciais em indústrias (SUTHERLAND, 1995). Devido a sua conformação e de acordo com os substituintes, pode estar associada com outros biopolímeros como: carragenas, alginatos, pectinas, gelatinas, galactomananas ou glucomananas (RINAUDO, 2008).

Devido às suas propriedades de espessamento em soluções aquosas, solubilidade em água fria e quente, agente de dispersão e estabilizador de emulsões e suspensões, a goma xantana é utilizada em formulações farmacêuticas, cosméticos, insumos agrícolas, fabricação de produtos têxteis, pastas, esmaltes, cerâmicas, explosivos e removedores de ferrugem. A alta viscosidade das soluções de xantana, mesmo a baixas concentrações, e sua solubilidade em água conferiram-lhe aplicações importantes na indústria do petróleo, entre as quais

podemos exemplificar como sua utilização em fluidos de perfuração e processos de recuperação de petróleo (GARCIA-OCHOA et al., 2000).

Outro polissacarídeo que possui potencial para emprego industrial é a levana, produzida por diferentes gêneros bacterianos, sendo o mais conhecido produtor a *Zymomonas mobilis*. A levana é citada como de potencial uso na fixação de cores e sabores, como espessante e estabilizante em géis para sobremesas, sorvetes, temperos prontos para saladas, bebidas, coberturas para produtos de confeitaria e invólucro de embutidos (ERNANDES, GARCIA-CRUZ, 2005). A levana e sua produção pela espécie *Zymomonas mobilis* tem sido especialmente estudada, este biopolímero trata-se de um homopolissacarídeo de frutose que possui excelentes propriedades, como elevada solubilidade em óleo e água, adesividade forte, biocompatibilidade, habilidade para formação de biofilmes (KUÇUKASIK et al., 2011); pode assumir diferentes pesos moleculares de acordo com a linhagem bacteriana produtora e a temperatura a que foi submetida a produção (CALAZANS et al., 2000).

Algumas espécies do gênero *Bacillus* também são produtores de polissacarídeos, como *Bacillus polymyxa* e *Bacillus subtilis* que produzem levana quando são cultivadas em meio contendo sacarose (SHIN et al., 2005).

Em geral, *Lactobacillus* sp. não são os melhores produtores de polissacarídeos utilizados na indústria quando comparados, em relação ao rendimento, a algumas bactérias como *Xanthomonas campestris*. Mesmo assim, *Lactobacillus* tratam-se de bactérias de grau alimentar do tipo GRCS (genericamente reconhecidas como seguras), esse fato pode tornar seus EPSs facilmente utilizados na constituição dos alimentos, contribuindo para a melhoria da texturização e da produção de agentes biologicamente ativos (BADEL; BERNARDI; MICHAUD, 2011).

Segundo Leroy e De Vuist (2004), *Lactobacillus fermentum* estão associados a fermentação de vegetais para aplicação na indústria. Micro-organismos ácido lácticos provocam a acidificação rápida da matéria-prima através da produção de ácidos orgânicos, principalmente o ácido láctico, além disso, são ainda de importância a produção de ácido acético, etanol, compostos de aroma, bacteriocinas, exopolissacarídeos, e vários enzimas. Desta forma, eles aumentam a vida de prateleira de alimentos e bebidas, melhoram a textura, e contribuem para o perfil sensorial agradável do produto final. Substâncias antimicrobianas possuem um pH que varia entre 2,0 a 6,0, o que sugere que pode ser utilizado em condições ácidas, em alimentos tais como iogurte, fermento, legumes fermentados e sucos (ZHANG, et al., 2010).

A conversão relativamente ineficiente de energia a partir de carboidratos por bactérias ácido-láticas quando comparadas aos produtores aeróbicos de polissacarídeos torna-se uma barreira técnica a produção econômica, visto que a aplicação mais valiosa da engenharia metabólica de produção de EPS por essas bactérias é mais provável de acontecer apenas a partir de uma combinação de rendimento e melhorias estruturais, que conferem características saudáveis a alimentos modificados (WELMAN; MADDIX, 2003).

3.6 Composição bioquímica e estrutura dos exopolissacarídeos

Os exopolissacarídeos são divididos em dois grandes grupos: homopolissacarídeos e heteropolissacarídeos. Os homopolissacarídeos consistem em uma única unidade monossacarídica de repetição, são exemplos as frutanas e as glucanas compostas por resíduos de α -Dglicopiranosil. A solubilidade e as características físicas entre esses polímeros podem divergir devido às proporções, os tipos de ligações e sua disposição em cada molécula. (HUGENHOLTZ; KLEEREBEZEM, 1999; SUTHERLAND, 1972).

Mudanças na funcionalidade do polímero podem ser reconhecidas através de alterações na conformação helicoidal ou associações intermoleculares, essa conformação helicoidal é necessária para determinar a rigidez molecular e a viscosidade das soluções, possivelmente ainda favorece a gelificação devido a capacidade de cristalizar ou co-cristalizar com outros polissacarídeos (MORRIS; MILES, 1986).

As propriedades físicas e reológicas de um polissacarídeo em solução estão intimamente relacionadas à sua estrutura tridimensional, ou à conformação. Além disso, outros fatores tais como o potencial da molécula em formar associações intermoleculares, podem ser importantes para a compreensão do comportamento da solução (DE VUYST, 1999).

Há um grande interesse em elucidar a relação entre as estruturas químicas e as conformações da cadeia dos polissacarídeos com suas atividades biológicas, porém há uma certa dificuldade pois essas macromoléculas são comumente constituídas por muitas unidades monossacarídicas unidas por diferentes ligações glicosídicas e algumas apresentam estruturas hiper-ramificadas, elevados pesos moleculares e tendem a formar agregados em solução. (YANG, ZHANG, 2009).

Observando-se a estrutura da xantana (Figura 3.2), a mesma é composta por unidades repetidas de pentassacarídeos cujas unidades básicas são duas moléculas de glicose, duas de manose e uma de ácido glicurônico, na relação de 2:2:1, além de grupos piruvato e acetil.

Grande parte dos resíduos D-manose terminais contém um ácido pirúvico ligado e com distribuição indeterminada, enquanto a D-manose ligada a cadeia principal contém um grupo acetil na posição O-6 (MELTON et al., 1976; JANSSEN; KENNE; LINDBERG., 1975).

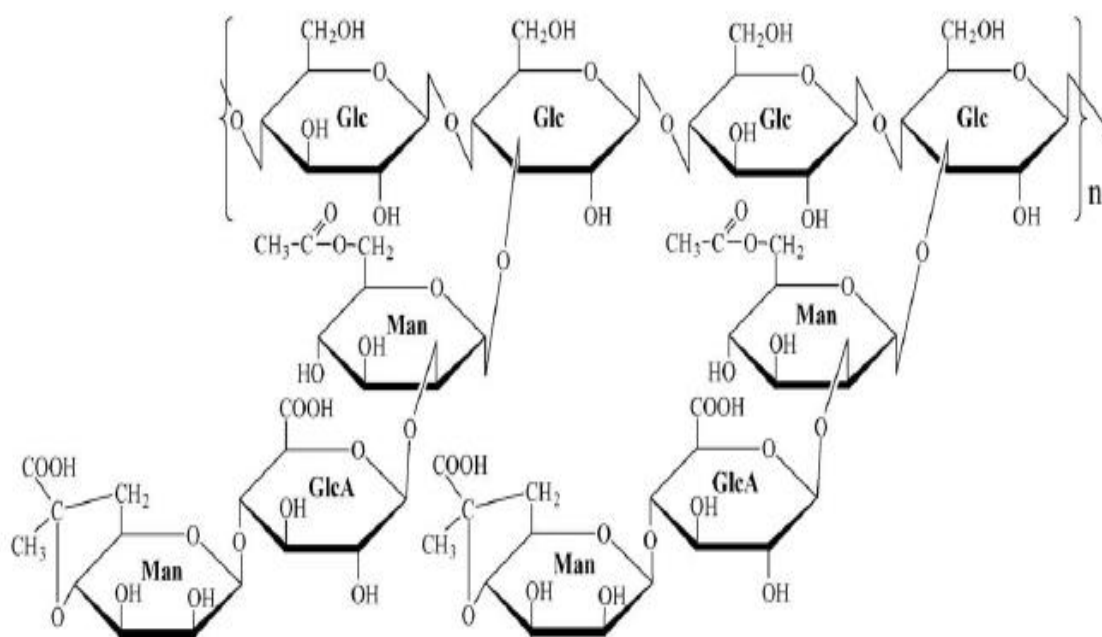


Figura 3.2 - Estrutura da xantana produzida por *Xanthomonas campestris* (QIAN et al., 2006).

As glucanas são compostas de cadeias de polímeros de glicose com vários graus de ramificação, dependendo das estirpes produtoras. Assim, dextranas de *Lactobacillus fermentum*, *L. sakei*, *L. parabuchneri* e *L. hilgardi* são glucanas α -(1,6) ramificadas por resíduos de glicose na posição 3 e menos frequentemente nas posições 2 e 4, sua estrutura está demonstrada na Figura 3.3 (BADEL; BERNARDI; MICHAUDI, 2011).

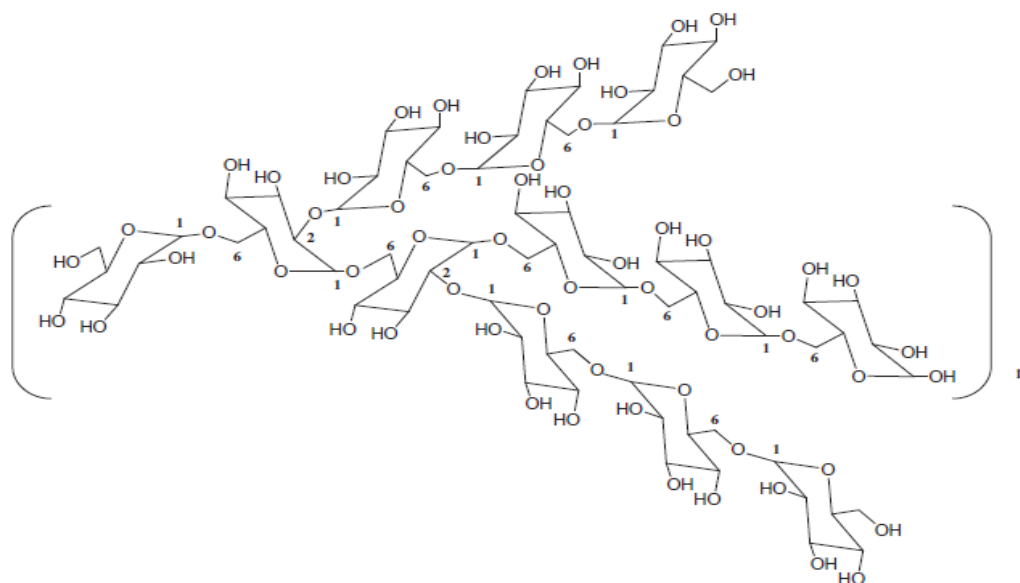


Figura 3.3 - Estrutura da dextrana (BADEL; BERNARDI; MICHAUD, 2011).

Leuconostoc mesenteroides é uma bactéria ácido láctica e constitui um dos principais produtores de dextrana (SHAMALA, PRASAD, 1995). Dentre os exopolissacarídeos disponíveis a partir de fontes microbianas, a dextrana de *L. mesenteroides* ganhou reconhecimento mundial porque a bactéria é capaz de produzir dextrana com propriedades diversificadas, podendo ser solúvel ou insolúvel em água (DOLS-LAFARGUE et al., 2001).

A estrutura dos heteropolissacarídeos de *Lactobacillus* spp. (*L. delbrueckii bulgaricus*, *L. helveticus* e *L. rhamnosus*) são compostas por sete monossacarídeos de repetição, onde glicose, galactose e ramnose são os principais açúcares. Ocasionalmente, amino-açúcares como a N-acetil-D-glucosamina e N-acetil-D-galactosamina, bem como poliálcool (glicerol) também estarão presentes (VANHAVERBEKE, et al., 1998; TORINO et al., 2001; FABER, KAMERLING, VLIEGENTHART, 2001).

Os EPSs, que são produzidos por bactérias ácido lácticas a partir de açúcares de nucleotídeos intracelulares, são formados a partir de intermediários do metabolismo do carbono central que se inicia com o transporte do açúcar, para o qual três sistemas diferentes são conhecidos (DE VOS, 1996). Os exopolímeros provenientes dessas bactérias são polissacarídeos compostos por unidades repetidas (ramificadas), contendo ligações α e β (CERNING, 1995).

Em todas as fases do crescimento bacteriano e mediante uma variedade de condições, ocorre a biossíntese dos heteropolissacarídeos, esta é realizada na membrana celular através de precursores formados no interior da célula e exportados para fora, onde lipídeos facilitam o transporte através da membrana citoplasmática (TROY, 1979).

A dextrana e a levana (Figura 3.4) são homopolissacarídeos cuja reação de polimerização procede extracelularmente através de glicosiltransferases, com produção independente do metabolismo do carbono central e variações na estrutura limitadas. Enquanto os outros homopolissacarídeos e os heteropolissacarídeos são sintetizados a partir de precursores intracelulares como os açúcares de nucleotídeos, envolvidos na biossíntese de componentes da parede celular (BOELS, et.al., 2001).

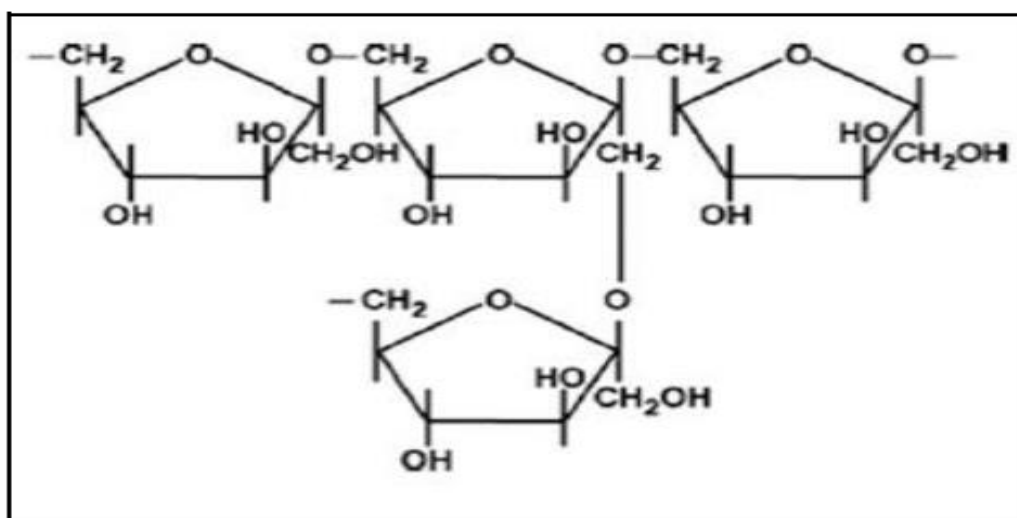


Figura 3.4 - Estrutura da levana (MANANDHAR et al., 2009)

Gerwig et al. (2013) estabeleceram a estrutura do polímero produzido por *Lactobacillus fermentum* TDS030603 (Figura 3.5), o EPS contém D-glicose e D-galactose, numa razão molar média de 2,6:1,0, consistindo de D-Glcp terminal, 3-D-Glcp substituído, 2,3-D-Glcp dissustituído e 6-D-Galp substituído em uma razão molar média de 1,3:1,0:1,1:1,1, com traços de D-Galp (0,1) terminais.

Embora os métodos de quantificação colorimétricos sejam os mais baratos e simples, as mais precisas técnicas para a quantificação do teor de EPS em frações isoladas são aquelas em que o método analítico é acoplado a um método de separação. Assim, a cromatografia de permeação em gel em um sistema de CLAE permite a separação dos polímeros EPS por exclusão de tamanho (RUAS-MADIEDO; REYES-GAVILÁN, 2005).

Além das propriedades químicas, a aplicabilidade do polissacarídeo é muito dependente do seu comportamento térmico (MARINHO-SORIANO; BOURRET, 2005). Análises termogravimétricas acopladas com espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier tem se mostrado uma das mais úteis técnicas que os pesquisadores dispõem para investigar e entender as vias de degradação térmica dos polímeros (CERVANTES – UC et al., 2006).

A análise térmica consiste em um conjunto de técnicas que permite avaliar as propriedades físicas de um material, enquanto eles são submetidos a uma programação controlada de atmosfera e temperatura. A termogravimetria (TG) e a calorimetria exploratória diferencial (DSC) podem ser utilizadas em estudos com medicamentos e permitem a caracterização, determinação do grau de pureza, identificação de polimorfismos, avaliação da estabilidade e decomposição térmica de fármacos (MENDONÇA et al., 2013). Os dados obtidos a partir das análises de TGA contêm uma certa quantidade de ruído, que podem se tornar um grande problema para obter a primeira ou segunda derivadas para estudo cinético. (CAO et al., 2004).

Normalmente, a elucidação da degradação de compostos baseia-se unicamente em TGA. As medições de DSC são utilizadas apenas dentro de limites estreitos de temperatura, a fim de registrar as transições de fase, como fusão, não sendo observados os efeitos de degradação térmica a uma temperatura. No TGA uma perda de massa é medida, ao passo que a degradação dos materiais poliméricos começa frequentemente com variação de entalpia, onde mudanças de entalpia não podem ser detectadas em TGA e são obtidos por medições de DSC. Dessa forma, efeitos térmicos são observados separadamente, mas em paralelo com a perda de massa devido a exposição a altas temperaturas e podem ser atribuídos precisamente a mecanismos específicos de degradação (GOLEBIEWSKI;GALESKI, 2007).

As análises térmicas podem ser utilizadas tanto no controle da matéria-prima, quanto do produto final e possuem grande importância no desenvolvimento e na caracterização de novos produtos, avaliação dos processos produtivos, além de outras aplicações (SILVA; PAOLA; MATOS, 2007).

Estudos realizados por Gerwig et al. (2013) com a cepa *Lactobacillus fermentum* TDS030603, utilizou caldo MRS e meio definido suplementado com glicose para produzir o polímero e mostraram detalhes das características químicas com definição da estrutura molecular do polissacarídeo através da análise de metilação, hidrólise ácida, espectrometria de massa MALDI-TOF e espectroscopia de RMN de 1D/2D.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Micro-organismo

O micro-organismo utilizado foi isolado como contaminante de mosto de fermentação alcoólica industrial de usina sucroalcooleira do estado de Pernambuco, por Falcão de Moraes em março de 2005 (ARAÚJO, 2005; PADILHA, 2009).

4.2 Meios de cultivo e condições de crescimento

A cultura foi mantida liofilizada em frascos de penicilina lacrados e a suspensão bacteriana utilizada continha $1,0 \times 10^{10}$ UFC mL⁻¹. Quando em utilização, a cultura foi repicada a cada quinze dias em meio Melaço-Sacarose-Ágar (MSA), pH 6,5 (formulado por Falcão de Moraes, comunicação pessoal), cujos componentes encontram-se descritos na Tabela 1 (Anexo A). A cultura foi cultivada a 35 °C por 48 h e estocada a 4 °C.

4.2.1 Condições de preparo do inóculo

Os inóculos das fermentações foram preparados e inoculados nos meios de produção na escala de 1:10 (v/v), utilizando-se o meio Melaço-Sacarose (MS) descrito na Tabela 2 (Anexo A) e colocados em tubos de ensaio com tampa rosqueada. Os cultivos bacterianos foram submetidos à incubação em estufa microbiológica a 35 °C por 24 horas para obtenção de crescimento adequado.

4.2.2 Condições de preparo do meio de pré-fermentação (MPF)

O preparo do inóculo, denominado aqui meio de pré-fermentação (MPF), foi realizado em triplicata onde foram adicionados 3 mL da cultura bacteriana em frascos de tampa rosqueada com capacidade para 250 mL contendo 27 mL de meio MS (Tabela 2 – Anexo A).

Os frascos foram incubados em estufa a 35 °C por 24 horas e seguiu a condição de agitação utilizada para o meio de fermentação, podendo ser agitado (210 rpm) ou estático.

4.2.3 Condições de agitação do meio de fermentação

Fermentação sob agitação

A fermentação foi realizada em triplicata, sob agitação de 210 rpm, feita em mesa agitadora (New Brunswick Scientific C25KC) a 35 °C por 72 horas. Foram adicionados 30 mL do inóculo aos frascos de borosilicato com capacidade para 500 mL, contendo 270 mL de meio MS, ou seja, 10 % (v/v) (Tabela 2 – Anexo A).

Fermentação estática

A fermentação foi realizada em triplicata, sob condições estáticas, com incubação realizada em estufa bacteriológica a 35 °C por 72 horas, onde foram adicionados 30 mL do inóculo aos frascos de borosilicato com capacidade para 500 mL, contendo 270 mL de meio MS, ou seja, 10 % (v/v) (Tabela 2 – Anexo A).

4.3 Produção do Polímero

4.3.1 Fermentação em meio Melaço-Sacarose

O meio de produção do polímero (MPP) continha os componentes citados na tabela 2, sendo o pH do meio ajustado em 6,5 antes da autoclavação a 120 °C por 20 minutos.

Após o período de incubação do MPF, toda a biomassa crescida nos frascos foi inoculada no MPP, mantendo-se a proporção de 10% (v/v). O volume de trabalho (volume final após inoculação) foi de 300 mL. Os frascos de borosilicato em triplicata foram incubados a 35 °C durante 72 horas.

Nos tempos 0, 24, 48 e 72 horas foram retiradas amostras de cada frasco da triplicata para tubos tipo *Falcon* para aferição do pH do polímero sintetizado.

Na fermentação sob agitação, as amostras provenientes dos tempos 48 e 72 horas foram diluídas 1:2, enquanto as amostras do processo estático foram diluídas nos tempos 24, 48 e 72 horas por apresentarem maior viscosidade. A diluição com água destilada estéril facilita a remoção das células do mosto fermentado, o qual foi centrifugado a 13600 g por 12 minutos a 4 °C. Em cada um dos tempos, foi retirada uma alçada dos meios e plaqueada em meio MSA para observar se o meio estava isento de contaminações.

4.3.2 Dosagem da biomassa

Após ser retirado um volume de 8 mL das amostras nos tempos determinados, realizou-se a dosagem de biomassa através do peso-seco. As amostras foram centrifugadas a 13600 g por 12 minutos e o sobrenadante foi armazenado congelado para posteriores análises dos açúcares redutores totais e do polímero produzido.

O primeiro centrifugado, que corresponde às células, foi ressuspendido em água destilada estéril e centrifugado novamente. O sobrenadante foi descartado e as células lavadas foram transferidas quantitativamente, com o auxílio de pipeta de Pasteur para pesa-filtros, previamente pesados em balança analítica; os quais foram incubados a 110 °C por 24 horas, as análises foram realizadas em triplicata. Após a incubação, os pesa filtros foram colocados em dessecador até atingir a temperatura ambiente, sendo, em seguida pesados, determinando-se assim o valor médio da biomassa disponível em cada litro do meio fermentado.

4.3.3 Determinação do pH

O pH das amostras foi medido em potenciômetro Digimed, modelo DM-21, o qual foi devidamente calibrado antes de qualquer aferição (medida).

4.3.4 Extração do polímero

A extração do polímero foi desenvolvida com base na metodologia para precipitação de levana de *Zymomonas mobilis* (CALAZANS, 2000; COIMBRA, LOPES, CALAZANS, 2010). Para isso foi retirado um volume de 5 mL do sobrenadante, filtrado em membranas de

celulose 0,22 μ m, congelado e guardado em tubos de penicilina lacrados com parafilme. Com o intuito de causar a precipitação do polímero, aos 5 mL do filtrado foram acrescentados 15 mL de etanol P.A gelado (proporção 3:1). A mistura foi então centrifugada a 13600 g durante 10 minutos, o precipitado foi novamente lavado com etanol gelado.

Para a ressuspensão do polímero extraído foi utilizado cerca de 4 mL de água destilada de forma a lavar as paredes do tubo tipo *Falcon*, transferindo quantitativamente com o auxílio de uma pipeta de Pasteur para pesa filtros previamente pesados. As amostras foram levadas para a estufa a 110°C por 24 horas, após a secagem, as amostras foram resfriadas no dessecador e novamente pesadas e calculada a concentração de polímero precipitável através do peso-seco, baseado na metodologia proposta por Reiss e Hartmeier (1990).

A quantidade do polímero foi calculada pela diferença entre o peso do pesa filtro com o polímero seco e o peso do pesa filtro limpo e sem polímero. A concentração do polímero foi obtida dividindo-se os pesos do polímero seco, em gramas, pelo volume retirado de amostra em litros ($X = p/0,005$).

4.3.5 Cálculo do consumo de glicose, frutose e sacarose do meio MPP

A quantificação dos açúcares glicose, frutose e sacarose presentes no mosto, meio MPP – livre de células, foi realizada através de cromatografia líquida de alta eficiência, em cromatógrafo cujo detector utilizado foi o RID (Agilent Technologies - Série 1100) com degaseificador acoplado, conforme mostrado na figura 4.1. A coluna utilizada foi a do tipo Aminex HPX-87HX (Bio-Rad) de 300 x 7,8 mm, com fase móvel consistindo em ácido sulfúrico 5 mmol L⁻¹, a um fluxo de 0,6 mL min⁻¹, a 60 °C. A fase móvel foi preparada com água ultrapura e, posteriormente, filtrada em membrana microporosa de 0,22 μ m.

Todas as amostras e os padrões foram diluídos em fase móvel, filtrados em membrana 0,22 μ m e injetados, automaticamente, volumes de 5 μ L. Após a obtenção dos cromatogramas, foi determinada a concentração dos açúcares de acordo com a área de cada pico formado. As concentrações foram determinadas através de curvas de calibração padrão obtidas com solução de glicose, frutose e sacarose; além disso, as amostras foram diluídas quando necessário.



Figura 4.1 – Cromatógrafo com detector RID (Agilent Technologies – Série 1100)

4.4 Teste de utilização de açúcares pelo micro-organismo para crescimento e produção do polímero

Para verificar quais fontes de carboidratos eram utilizadas na produção do polissacarídeo, foram testados meios de cultura produzidos a partir do meio base MSA (tabela 4.1) modificado, esse meio foi denominado MBP (meio básico de produção) e diferia do meio MSA pela ausência de melaço-sacarose. Foram testados meios MBP suplementados com diferentes fontes de carbono: sacarose (Tabela 3), glicose (Tabela 4), frutose (Tabela 5) e glicose/frutose (Tabela 6), descritos no Anexo A.

4.5 Caracterização do biopolímero

Antecedendo às técnicas de caracterização, o produto sofreu novas precipitações seletivas e lavagens para a remoção de possíveis componentes residuais do meio de cultura que poderiam interferir nas análises posteriores.

4.5.1 Purificação e fracionamento do polímero

Ao volume de 1mL de mosto sem células, filtrado e precipitado em etanol absoluto PA, relação mosto:solvente (1:3), foram realizadas dez lavagens com 1mL de etanol a uma concentração de 70% em microcentrífuga. Em seguida, as amostras foram lavadas três vezes com 1 mL de acetona. Todas as lavagens foram realizadas em microcentrífuga durante 2 minutos. A amostra foi seca sob vácuo durante 12 horas e armazenada a -4 °C.

4.5.2 Hidrólise em banho termostático com ácido trifluoracético (TFA)

Foram testadas três condições diferentes para a hidrólise do polímero em ácido trifluoracético (TFA) a fim de observar em qual dessas condições um maior percentual seria hidrolisado. Pesou-se em balança analítica 25 mg do polímero, e a este foram adicionados 5 mL de solução de ácido trifluoracético 2 mol L⁻¹, a hidrólise ácida do material foi realizada mediante água em ebulição por um período de 15 horas. A segunda condição foi testada adicionando-se 10 mL de TFA 1 mol L⁻¹ a 50 mg do polímero seguido de aquecimento em banho-maria em ebulição por 15 horas. Ambas as condições foram feitas a partir da técnica utilizada por Araújo (2006) modificada. Para observar se o polímero hidrolisava em um período de tempo mais curto, 250 µL de TFA 2 mol L⁻¹ foram adicionados a 2 mg do polímero, em seguida foi aquecido no banho-maria em ebulição por 5 horas, de acordo com a metodologia descrita por Fukuda et al. (2010) modificada.

Esses procedimentos foram feitos em tubos de ensaio com tampa rosqueada, decorrido o tempo, o ácido da amostra foi retirado através de rotaevaporação e logo após o processo as amostras foram resuspendidas quantitativamente para o volume original, utilizando-se água ultrapura, quando necessário as amostras foram diluídas.

4.5.3 Análise do polímero hidrolisado

A quantificação do polímero hidrolisado em ácido trifluoracético (TFA) foi realizada através da cromatografia líquida de alta eficiência, de acordo com a metodologia descrita no item 4.3.5. O hidrolisado foi submetido a corrida cromatográfica, a fim de verificar o tempo de retenção das unidades monoméricas e após a obtenção dos cromatogramas, foi determinada a concentração de cada fração de acordo com a área de cada pico formado.

4.5.4 Espectroscopia de Absorção Eletrônica UV / Visível

Os espectros foram obtidos a partir de uma solução aquosa de concentração 3,6 mg/mL, cujo equipamento utilizado foi o espectrofotômetro Agilent modelo 8453, operando em uma faixa de 200 a 800 nm.

4.5.5 Espectroscopia na região do Infravermelho (FT-IR)

Os espectros vibracionais do referido produto foram realizados a partir da técnica da pastilha de KBr. Certa quantidade do polímero foi misturada ao KBr em pó, em proporções adequadas; em seguida, levado ao molde denominado pastilhador e prensado para a formação da pastilha, onde a partir dela foi obtido o espectro do infravermelho. O equipamento utilizado consiste em um espectrofotômetro com transformação de Fourier, Varian, modelo 640 IR, abrangendo a região de 4000 a 400 cm^{-1} , com resolução espectral de 4 cm^{-1} , servindo assim para elucidar os grupos funcionais presentes no composto.

4.5.6 Análises térmicas – TGA e DSC

A análise termogravimétrica (TGA) e a calorimetria exploratória diferencial (DSC) possibilitaram a investigação acerca das propriedades térmicas do produto mencionado, elucidando-se as propriedades dessa natureza apresentadas pelo material, seja como agente termo-estabilizante ou espessante. O TGA foi realizado em aparelho modelo Jupiter STA 449 F3 (NETZSCH), utilizando-se 8,9 mg do polímero que sofreu aquecimento a 5°C por minuto até atingir 500° C, enquanto o DSC foi realizado no aparelho modelo DSC 60 (SHIMADZU), a massa do polímero utilizada para a análise foi de 5,2 mg, aquecendo na proporção de 5°C por minuto até atingir a temperatura de 500° C (Figura 4.3). Ambas as análises utilizaram atmosfera de argônio a 50 mL por minuto.

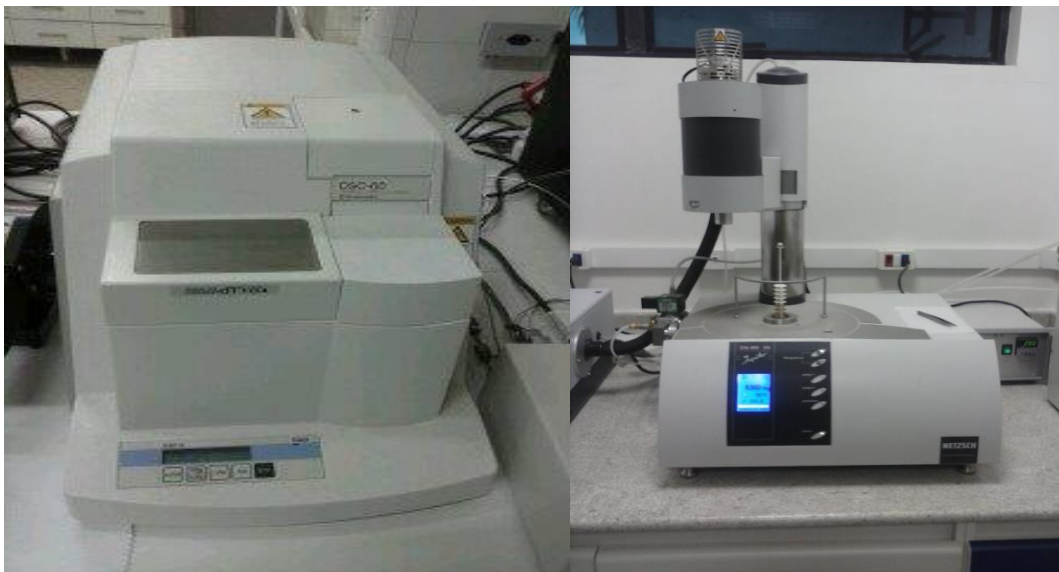


Figura 4.2 – Aparelhos Calorimetria Diferencial Exploratória modelo DSC 60 SHIMADZU (a esquerda) e Jupiter STA 449 F3 NETZSCH (a direita).

4.5.7 Determinação de mudanças nas características físicas do polímero

Para a determinação das mudanças nas características físicas do polímero foi utilizado o aparelho de ponto de fusão modelo Fisatom 430 (230 V, 60 Hz e 50 w) capaz de determinar o ponto fusão ou de decomposição da amostra.

4.5.8 RMN ^1H e ^{13}C

A caracterização estrutural do produto microbiológico de interesse foi elucidada por ressonância magnética nuclear (RMN) através das técnicas (^1H e ^{13}C). As análises de RMN foram realizadas no equipamento modelo VARIAN Unity Plus 300, com frequência de 300MHz para ^1H e 75MHz para ^{13}C .

4.6 Identificação molecular da bactéria

A identificação molecular da bactéria foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Ciências da Saúde (CCS) – UFPE.

4.6.1 Extração de DNA

As amostras foram cultivadas em meio BHI líquido, descrito na tabela 7 (Anexo A) para crescimento das colônias. As culturas foram submetidas ao isolamento de DNA utilizando o protocolo de Sambrook et al. (1989) através de extração por fenol/clorofórmio e precipitação com isopropanol.

Um volume de 5 mL do meio de cultura, contendo o bastonete Gram-positivo, foi centrifugado a 10.000 g por 5 minutos; em seguida, desprezou-se o sobrenadante e o sedimento foi lavado com 1,5 mL do tampão TAS (descrito na Tabela 8 – Anexo B) e centrifugado a 10.000 g por 3 minutos. O *pellet* de células foi suspenso em 0,5 mL de tampão TAS que age retardando a atividade das nucleases. Após agitação no vórtex foi tratado com solução de lisozima na concentração de 4 mg/mL a 37 °C por 30 minutos que facilita o rompimento da parede celular.

Decorrido este último tempo, a amostra foi tratada com 5 µL da enzima proteinase K que remove a contaminação por proteínas e 200 µL de SDS10%, um detergente que possui substâncias tensoativas que age dissociando as proteínas dos ácidos nucleicos e dissolvendo proteínas de membrana. Em seguida, a amostra foi levada ao banho-maria a 50 °C por 60 minutos. Após este período de incubação, adicionou-se 400 µL de fenol que possibilita a desnaturação das proteínas e o isolamento do DNA, seguindo-se de homogeneização e centrifugação a 10000 g por 2 minutos. Após esta centrifugação, a fase aquosa foi transferida para um microtubo tipo *eppendorf* e acrescentou-se 500 µL de clorofórmio, capaz de desnaturar proteínas e aumentar a eficiência da extração de ácidos nucleicos. Seguiu-se centrifugação a 10000 g por 2 minutos, o sobrenadante foi desprezado e acrescentou-se 50 µL de acetato de potássio 30 mmol L⁻¹ (pH 5,2).

A amostra foi precipitada com 1 mL de isopropanol, sendo estocada em freezer durante 1 hora. Decorrido esse tempo, procedeu-se a centrifugação do material a 10000 g por 5 minutos, sendo o sobrenadante desprezado e o precipitado lavado com 400 µL de etanol 70%, que remove os resíduos de fenol e clorofórmio, seguindo-se nova centrifugação nas mesmas condições por 2 minutos. O *pellet* foi mantido à temperatura ambiente para a secagem do sedimento e logo após, suspenso em 50 µL de tampão TE + RNAase que proporcionam um pH ideal para a manutenção da integridade das moléculas de ácidos nucleicos e inibem a atividade de desoxirribonucleases (Tabela 9 – Anexo B).

Para avaliar a qualidade e a concentração do DNA extraído, foi retirado 1 µL da amostra, o qual foi misturado a 3 µL de tampão de amostra para DNA (Tabela 10 – Anexo B)

e 1µL do corante SYBR Green. A análise foi realizada utilizando a técnica de eletroforese em gel de agarose a 0,8%, após a corrida, o gel foi observado em transiluminador de radiação ultravioleta e fotodocumentado.

4.6.2 Amplificação do gene rDNA 16S

Para a caracterização molecular da bactéria foram utilizados iniciadores específicos para a amplificação do gene RNA ribossômico 16S (16S rDNA). O protocolo para as reações de amplificação pela PCR foi baseado no método descrito por HUARD et al. (2003) e cujo os componentes da reação encontram-se descritos na Tabela 4.1.

Os seguintes oligonucleotídeos: fD1 (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) e rD1 (AAGGAGGTGATCCAGCC), foram utilizados na amplificação do gene do RNA ribossomal 16S (16S rDNA) (WEISBURG et al., 1991).

As reações ocorreram em termociclador modelo C1000 *Thermal cycler Biorad*, programado com um ciclo de desnaturação inicial de 5 minutos a 95 °C, seguido de 30 ciclos, cada ciclo consistindo de uma etapa de desnaturação de DNA (94 °C por 30 segundos), uma etapa de anelamento dos oligonucleotídeos (52 °C por 1 minuto) e uma etapa de polimerização (72 °C por 2 minutos). A etapa de extensão final ocorreu a 72 °C por 5 minutos em um ciclo único.

Decorrida essa etapa, a análise foi realizada por eletroforese, onde foram adicionados aos poços do gel de agarose (1,2%), utilizando como marcador DNA Ladder 100 pb (Invitrogen), uma mistura contendo 3µL dos produtos da reação de PCR, 3µL do tampão de amostra para DNA e 2µL do corante SYBR Green. Em seguida, o gel foi observado em transiluminador de radiação ultravioleta e fotodocumentado.

Tabela 4.1 - Componentes das reações de PCR utilizados para a caracterização molecular da bactéria.

Reagente	Volume para a reação (µL)	Concentração final
Água ultrapura	16,0	-
Tampão de reação	2,5	1x
MgCl ₂	1,5	3,0 mmol L ⁻¹
dNTP	0,5	0,2 mmol L ⁻¹
Primer forward	1,0	2,5 pmol L ⁻¹
Primer reverse	1,0	2,5 pmol L ⁻¹
Taq polimerase	0,5	1,0 U µL ⁻¹
DNA molde	2,0	50,0 ng µL ⁻¹
Total	25,0	

4.6.3 Purificação dos produtos da PCR

A técnica foi realizada seguindo o protocolo do kit *PureLink™ PCR Purification* (Invitrogen). A análise foi realizada por eletroforese utilizando gel de agarose 0,8%, através da migração da mistura de 1µL da amostra purificada, 3µL do tampão de amostra para DNA e 2µL do SYBR.

4.6.4 Sequenciamento e análise das informações

Os produtos de PCR foram sequenciados em equipamento ABI 3100 e as sequências do gene 16S rDNA geradas foram submetidas a alinhamento pela ferramenta BLASTn (*Basic Lenth Alignamnent Search Tool*), (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), um algoritmo que permitiu a identificação através da comparação com outras sequências depositadas no banco de dados Genbank do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

Finalizada esta etapa, uma análise usando ferramentas de bioinformática contra um banco de dados de sequências de DNA permitiu a identificação do gênero e da espécie da bactéria em estudo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Identificação molecular do micro-organismo

A metodologia de Sambrook et al. (2001) para extração de DNA bacteriano por fenol/clorofórmio e precipitação com isopropanol mostrou-se eficiente para o isolamento do DNA da espécie. Os resultados obtidos para a caracterização molecular da bactéria realizada pela amplificação do gene RNA ribossômico 16S (16S rDNA) podem ser visualizados na figura 5.1.

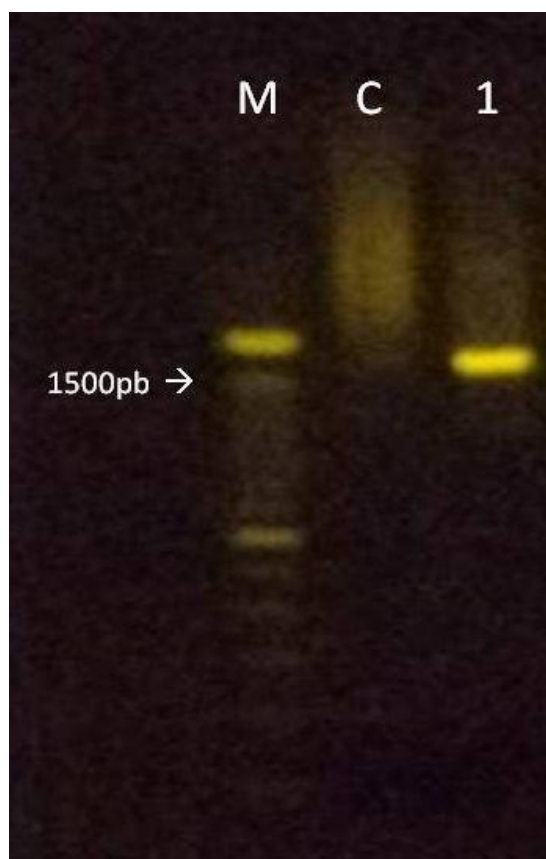


Figura 5.1 - Produtos de amplificação do Gene 16S rDNA da bactéria *L. fermentum* com primers específicos; onde M representa o marcador Invitrogen 100pb, C representa o controle negativo e 1 representa a amostra em estudo.

De acordo com a figura 5.1, o produtos de PCR do gene codificador ribossomal 16S (16S rDNA) apresentou um peso molecular aproximado de 1500 pares de base. Esse resultado

indica presença de conservação, assegurando que a amostra analisada encontrava-se apta para a etapa do sequenciamento dos nucleotídeos com posterior identificação ao nível molecular.

Estudos realizados por Plant et al. (2003) para extração de DNA e amplificação do gene (16S rDNA) apresentaram um peso molecular aproximado de 1540 pares de bases para a bactéria *Lactobacillus fermentum*.

A região utilizada revelou um alto grau de conservação do gene do rDNA 16S, a comparação da sequência de rDNA 16S obtida neste estudo com sequências depositadas no bando de dados (GenBank) resultou em linhagens de espécies conhecidas apresentando similaridade com as sequências em estudo. A sequência obtida demonstrou 99% de similaridade com a espécie *Lactobacillus fermentum* LFW2 de linhagens padrão de coleções internacionais (Tabela 5.1).

Tabela 5.1 – Comparação da sequência de rDNA 16S do micro-organismo com sequências conhecidas

Nº de Acesso no NCBI	Micro-organismo	E. value	Identidade (%)
KF746167.1	<i>Lactobacillus fermentum</i> LFW2	0.0	99%

Grover et al. (2013) realizaram o sequenciamento do genoma da linhagem *L. fermentum* Lf1, um probiótico, isolado do intestino humano de indígenas que foi identificada através do 16S rRNA e rpoA. Ao mesmo tempo, Karlyshev; Raju; Abramov (2013) sequenciaram *Lactobacillus fermentum* 3872, isolado do leite materno de uma mulher saudável na Rússia em 2011 e comprovaram notável semelhança com as sequências dos genomas depositados de outras linhagens da espécie. A ausência de variação nas estruturas de algumas adesinas e a presença de uma adesina adicional pode refletir a adaptação da bactéria para diferentes hospedeiros e representar propriedades específicas desta linhagem como um novo probiótico.

Jayashree et al. (2013) sequenciaram o genoma de *Lactobacillus fermentum* MTCC 8711 isolada do iogurte. Apesar do genoma conter sete plasmídeos de diferentes tamanhos, nenhum deles apresentou os genes de resistência a antibióticos; dessa forma, a mesma pode ser utilizada como uma estirpe probiótica para melhorar a saúde intestinal. *Lactobacillus*

fermentum possui os genes responsáveis pela produção de α -galactosidase e β -galactosidase, que desempenham papéis importantes na conversão de β -galactosídeos do leite em açúcares simples que ajudam no consumo de leite por pessoas com intolerância a lactose.

A bactéria em estudo, produtora do biopolímero foi identificada como *Lactobacillus fermentum*, e a partir da identificação, procederam-se os estudos para a purificação e a caracterização do polímero produzido, bem como à verificação de suas possíveis aplicações.

5.2 Condições de produção de *Lactobacillus fermentum*

A produção do polissacarídeo de *Lactobacillus fermentum* foi testada a partir de duas diferentes condições de fermentação, sendo uma delas agitada (210 rpm) e a outra estática. Ambas foram realizadas a 35 °C por 72 horas, em meio melaço-sacarose.

Para facilitar as análises da concentração de biomassa e do polímero produzido, algumas amostras foram diluídas na proporção 1:2, devido à alta viscosidade apresentada principalmente após ter decorrido 48 ou 72 horas de fermentação. Segundo Dan et al. (2009), a única característica que insere *Lactobacillus fermentum* como produtor de heteropolissacarídeo trata-se da sua forte viscosidade em solução, podendo ser comparada a viscosidade da goma xantana.

A característica viscosa do exopolissacarídeo produzido por BAL pode ser detectada em culturas líquidas de EPS que mostram elevada resistência ao fluxo através de pipetas sorológicas, e formam fios viscosos durante a queda livre do equipamento (VEDAMUTHU; NEVILLE, 1986).

Ao ser cultivado em meio MSA (Tabela 4.1) para reativação das culturas, as colônias apresentavam-se como um gel rígido de coloração amarelada e aspecto rugoso medindo entre 0,3 a 0,8 mm, além disso, não apresentavam pigmentação na superfície do meio, conforme demonstrado na Figura 5.2.



Figura 5.2 – Colônia de *Lactobacillus fermentum* cultivada em meio MSA (Tabela 4.1) (PADILHA, 2009)

Quando realizados os testes para identificação de quais açúcares seriam utilizados para crescimento e produção do polímero pela bactéria em estudo, foram utilizados os meios descritos nas tabelas 4.3, 4.4, 4.5 e 4.6, no item material e métodos, estes foram suplementados com sacarose ou glicose ou frutose ou glicose/frutose, respectivamente. Não foi observado crescimento de *Lactobacillus fermentum* em MBP glicose, MBP frutose ou MBP glicose/frutose, apenas no meio MBP sacarose após 72 horas de crescimento com a presença de algumas colônias grandes de coloração amarelada e aparência grumosa que indicavam a produção de polissacarídeo. A partir desse experimento, pode-se afirmar que o micro-organismo utilizava sacarose como fonte de carbono para crescimento e produção do polissacarídeo (Figura 5.3).

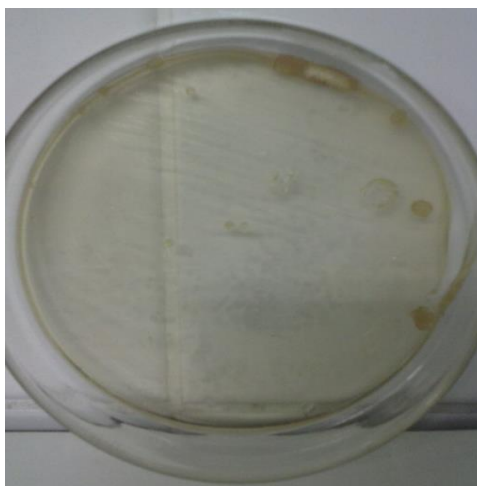


Figura 5.3 –Colônia de *Lactobacillus fermentum* cultivada em MBP-Sacarose com 72 horas de incubação.

Van Geel-Schutten et al. (1998) investigaram muitas cepas de lactobacilos de diferentes origens (alimentos fermentados, trato gastrointestinal de animais e placa dentária humana), para produção de EPS em meio MRS e meios suplementados com altas concentrações (100 g/L) de diferentes açúcares: glicose, frutose, maltose, rafinose, sacarose, lactose ou galactose. Cento e oitenta e duas cepas foram testadas nesses meios e após três dias de incubação a 37°C, sessenta cepas produziram EPS e dezessete delas renderam cerca de 100 g/L utilizando o meio suplementado com sacarose, sendo este considerado o melhor meio para a detecção de fenótipo de EPS.

Na figura 5.4 encontram-se os resultados obtidos para as concentrações de biomassa (g L^{-1}) em 72 horas de fermentação (i) agitada (210 rpm) e (ii) estática, entre as quais percebeu-se uma diferença considerável acerca da biomassa quantificada para as duas condições. Decorrido o tempo de fermentação, o processo estático demonstrou uma quantidade de biomassa em torno de $7,37 \text{ g L}^{-1}$, enquanto o processo agitado apresentou $2,37 \text{ g L}^{-1}$ de biomassa.

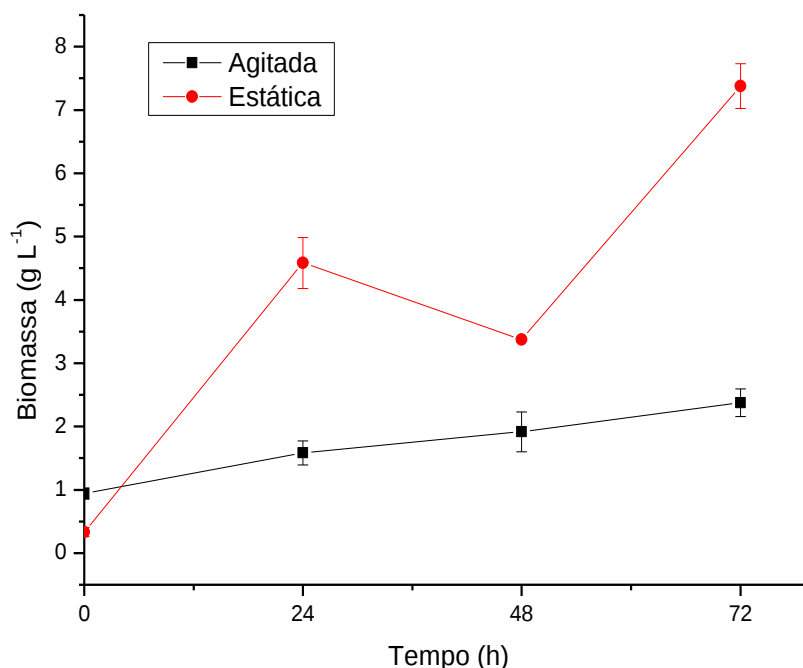


Figura 5.4 - Resultados da concentração de biomassa (g L^{-1}) do micro-organismo *Lactobacillus fermentum* a partir das fermentações a 35 °C sem agitação e com agitação (210 rpm).

Reque et al. (2000) investigaram o efeito da agitação no crescimento de bactérias. A suspensão bacteriana utilizada continha 10^7 UFC / mL, cultivada em caldo MRS (pH 6,0) e incubada a 37 ° C em duas condições: (a) com agitação (200 rpm) e (b) estático. As amostras foram retiradas de forma asséptica no tempo 0 hora, em intervalos de 2 horas e depois em intervalos de 8 horas. A biomassa bacteriana foi determinada pelo método de *pour plate* ou disseminação com incubação das placas a 37 ° C durante 48 horas em condições anaeróbias. O crescimento da bactéria foi melhor sob condição estática do que agitada, sugerindo que a cepa seria microaerofílica e assim necessitava da redução do grau de oxigênio, provavelmente devido a sensibilidade de suas enzimas em fortes condições de oxigenação. Além dessa característica, também detectaram produção de gás a partir da glicose presente no meio.

Capellari (2010) realizou o cultivo das células de *Lactobacillus amylovorus* a 37°C em frasco tipo Erlenmeyer de 250 mL sob condição de agitação (120 rpm) e em condição estática. Verificou-se que na condição estática o perfil do crescimento de *L. amylovorus* foi ligeiramente maior do que na condição agitada, comprovando que a agitação e a oxigenação não são favoráveis ao crescimento do micro-organismo, uma vez que estes são anaeróbios ou

aerotolerantes. Calderon; Loiseau e Guyot (2001) recomendam que o micro-organismo *L. fermentum* deve crescer em condições anaeróbicas.

A figura 5.5 apresenta os resultados para as concentrações do polímero produzido a partir de *L. fermentum* diante das condições agitada e estática. O processo estático se apresenta como condição mais favorável para a produção do polissacarídeo, pois em 72 horas houve a produção de $44,5 \text{ g L}^{-1}$, enquanto na fermentação agitada a concentração obtida foi de $8,0 \text{ g L}^{-1}$.

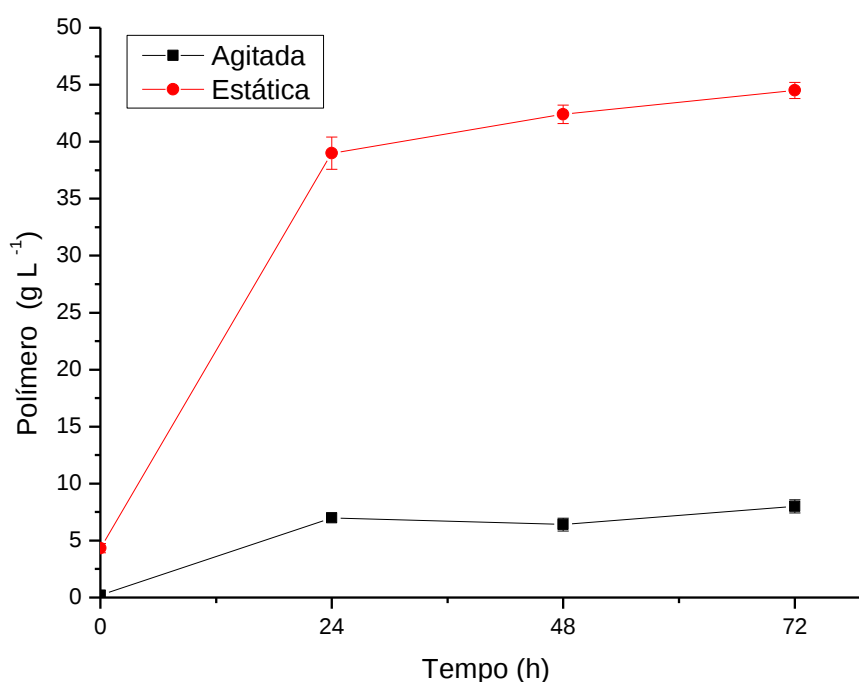


Figura 5.5 - Resultados da concentração de polissacarídeo produzido em fermentações estática e agitada (210 rpm), a 35°C.

De acordo com De Vuyst et al. (2003); Ruas-Madiedo e de lós Reyes-Gavilan (2005) e Fukuda et al. (2009), durante um processo fermentativo para a obtenção de exopolissacarídeos (EPS), as quantidades de biomassa e EPS são dependentes dos fatores utilizados no cultivo, tais como: fontes de carbono e de nitrogênio, pH, temperatura, agitação, aeração, idade da célula, cepa utilizada, entre outros. Trabalhos realizados por Shoji et al. (2013); Charalampopoulos; Vázquez; Pandiella, (2009) e Lin e Chang Chien (2007), comprovaram que os *Lactobacillus* devem ser cultivados principalmente em temperaturas entre 30 e 37 °C e sem agitação, obedecendo a sua característica aerotolerante.

O pH do mosto com células foi aferido a cada 24 horas e observou-se que o mesmo decaiu desde o início da fermentação agitada e atingiu um valor mínimo após as primeiras 48 horas do processo, obtendo uma leve elevação do potencial na etapa final. Enquanto isso, na fermentação não agitada foi observado que o mesmo decaiu desde o início da fermentação. A figura 5.6 apresenta o perfil do pH em ambas as condições supramencionadas com 72 horas de fermentação. O pH inicial do meio foi ajustado para 6,5 e ao final dos processos, os valores estavam em torno de 3,48 no meio agitado e de 3,25 no meio sem agitação.

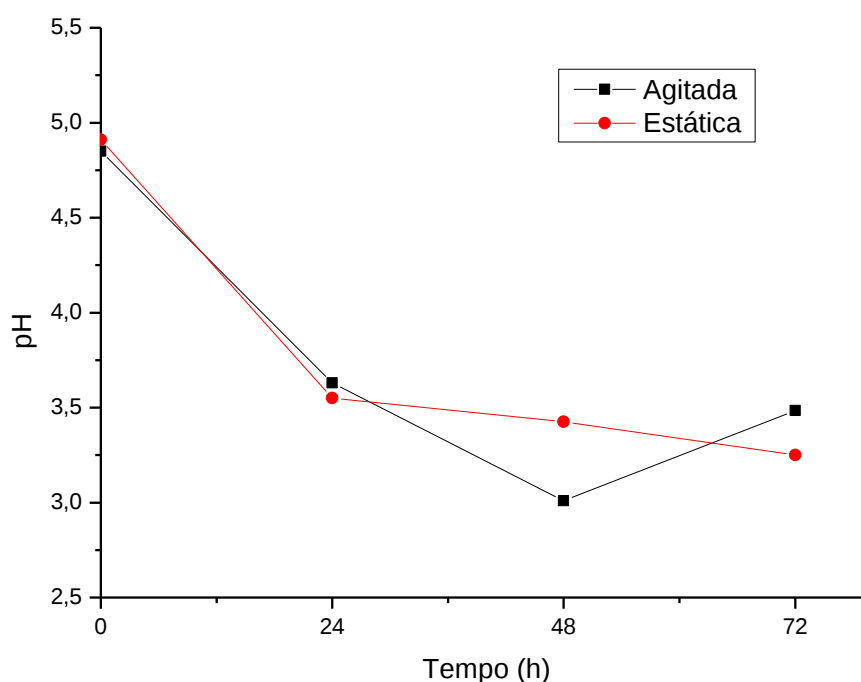


Figura 5.6 - Valor do pH ao longo de 72 horas de fermentação sob as condições: com agitação (círculo) e estático (quadrado).

O grupo das bactérias lácticas é composto por vários gêneros com semelhanças na fisiologia, metabolismo, nutrição e na produção de ácido láctico como produto final principal ou único e que não utilizam oxigênio em seu metabolismo (anaeróbios). Nutricionalmente, bactérias produtoras de ácido láctico são extremamente exigentes, assim seu meio de crescimento deve conter: aminoácidos, peptídeos, derivados de ácidos nucleicos, vitaminas, sais, ácidos graxos ou ésteres de ácidos graxos. Quando todos estes nutrientes estiverem presentes no meio de fermentação, essas bactérias irão converter carboidratos em ácido láctico (THOMSEN; GUYOT; KIEL, 2007). Estudos realizados por Van de Guchte (2002) relataram

que ocorre difusão passiva através da membrana com acúmulo intracelular de ácido láctico na bactéria, o que confere redução no pH.

Le Blanc; Garro e de Giori (2004) estudaram os efeitos de diferentes pHs no crescimento de *L. fermentum* a 37° C por 16 horas e com agitação de 100 rpm. O pH mínimo e o máximo para o crescimento foram pH 3,0 e 8,1, respectivamente, indicando que esta bactéria é tolerante a ácidos. Os valores de pH podem interferir na produção da biomassa, a maior concentração foi detectada em pH 5,5 e pH 5,0 (7,2 mg/L), enquanto em pH 6,0 houve produção de 6,9 mg/L e sem controle de pH o valor obtido foi de 6,7 mg/L, resultados significativamente maiores do que em pH 4,5 (4,5 mg/L). Calderon et al. (2003) relatam que houve casos de ácido tolerância a valores de pH de até 3,5.

Zhang et al. (2011) mostraram que houve um aumento no rendimento de EPS por *Lactobacillus fermentum* (44,49 mg/L) obtido quando o micro-organismo foi crescido a 37°C e pH 6,5 em meio a base de leite suplementado com 2% de glicose.

Os açúcares detectados ao longo do processo fermentativo para a bactéria em estudo foram: glicose, frutose e sacarose, avaliados a partir das dosagens realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), nas fermentações agitada (210 rpm) e estática. O comportamento de utilização desses açúcares pela bactéria está demonstrado nas figuras 5.7 e 5.8. No primeiro gráfico observa-se uma queda constante na concentração de sacarose durante a fermentação não agitada e o valor que inicialmente estava em torno de 105,2 (g L⁻¹), ao final do processo chega a quase zero. Entretanto, sob condição de agitação a sacarose inicial que estava em torno de 104,0 (g L⁻¹), após 72 horas encontrava-se em torno de 39,4 (g L⁻¹), demonstrando menor consumo pela bactéria em condições de maior oxigenação.

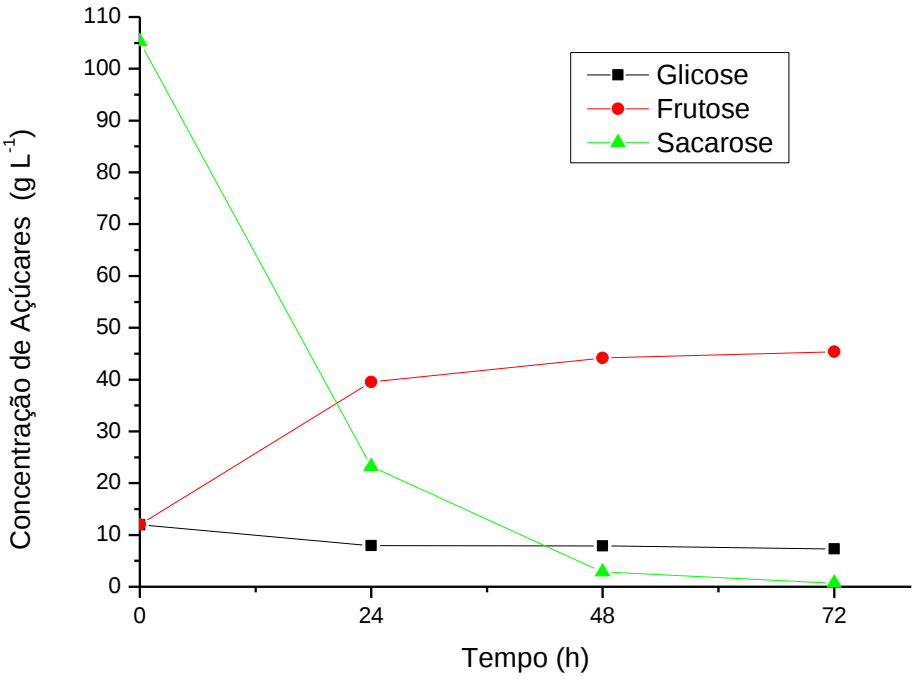


Figura 5.7 - Consumo de fonte de carbono ao longo de 72 horas de fermentação sem agitação.

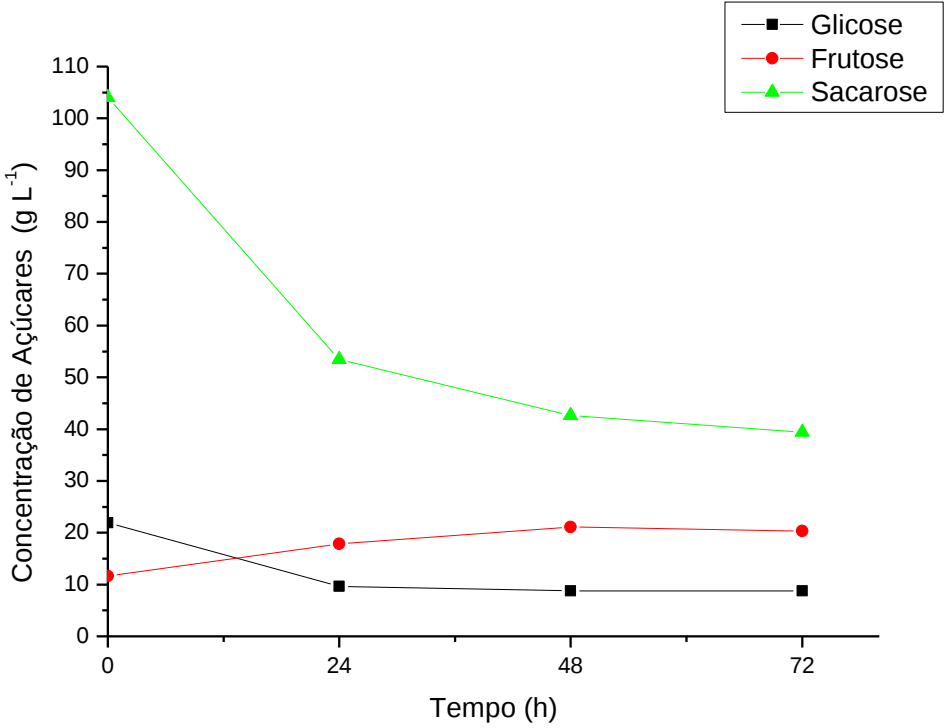


Figura 5.8 - Consumo de fonte de carbono ao longo de 72 horas de fermentação com agitação.

Na fermentação agitada a sacarose foi parcialmente consumida, favorecendo um pequeno aumento da frutose que ficou acumulada no meio, enquanto a glicose sofreu uma queda em decorrência, provavelmente da sua polimerização em EPS. De acordo com Araújo (2006), nas primeiras abordagens sobre a composição monomérica do biopolímero, este polissacarídeo era constituído principalmente por glicose. Nesse caso, a glicose vai sendo polimerizada enquanto a frutose vai se depositando no meio, o que justifica os resultados encontrados. A relação entre a glicose e a frutose que deveria ser praticamente igual se modifica ao longo do processo, ao mesmo tempo em que há o desaparecimento da sacarose.

Van Geel Schutten et al. (1998) afirmaram que a sacarose é o melhor substrato para *Lactobacillus*, enquanto estudos realizados por Vrancken et al. (2008), *L. fermentum* preferiu frutose como fonte de carboidratos. *L. fermentum* é considerada uma bactéria heterofermentativa, capaz de fermentar glicose em quantidades equimolares de lactato, dióxido de carbono e etanol (KANDLER, 1983). Esta bactéria geralmente não fermenta arabinose, ramnose, sorbitol, manitol, inulina, dextrina, amido e salicina, enquanto poucas cepas fermentam xilose e todas são capazes de fermentar a sacarose, a lactose e a rafinose. Ácidos são usualmente formados a partir da utilização de glicose, levulose, manose, galactose, sacarose, maltose e rafinose (PEDERSON, 1937).

Em relação à produtividade (Q_P), no tempo de 24 horas registraram-se os valores máximos, tanto para a fermentação estática ($Q_P = 1,497 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) quanto para a agitada ($Q_P = 0,283 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Analisando o rendimento de produto em substrato sacarose ($Y_{P/S}$), nos meios estático e agitado, o tempo 48 horas apresentou menores rendimentos de sacarose em polímero ($Y_{P/S} = 0,354 \text{ g g}^{-1}$) e ($Y_{P/S} = 0,096 \text{ g g}^{-1}$), respectivamente. Enquanto as maiores conversões de sacarose em glicose e frutose foram observadas no tempo de 24 horas, ($Y_{P/S} = 0,417 \text{ g g}^{-1}$) e ($Y_{P/S} = 0,128 \text{ g g}^{-1}$), respectivamente, sem e com agitação. O rendimento de produto em biomassa ($Y_{P/X}$) obteve o maior valor em 48 horas para fermentação estática ($Y_{P/X} = 11,279 \text{ g g}^{-1}$) e em 24 horas para fermentação agitada ($Y_{P/X} = 4,295 \text{ g g}^{-1}$). Esses valores encontram-se descritos na tabela 5.2.

Tabela 5.2 – Produtividade (Q_P), rendimento produto/substrato de sacarose ($Y_{P/S}$) e rendimento produto / biomassa ($Y_{P/X}$) de *L. fermentum*, em 72 horas de fermentação, em meios com agitação (210 rpm) e estático.

Tempo	Q_P (g L ⁻¹ h ⁻¹)		$Y_{P/S}$ (g g ⁻¹)		$Y_{P/X}$ (g g ⁻¹)	
	Estático	Agitado	Estático	Agitado	Estático	Agitado
24 horas	1,497	0,283	0,417	0,128	7,840	4,295
48 horas	0,793	0,129	0,354	0,096	11,279	3,235
72 horas	0.562	0,108	0,369	0,115	5,487	3,284

Yadav et al. (2011) produziram, purificaram e caracterizaram o exopolissacarídeo de *L.fermentum* CFR 2195 isolado de material fecal de crianças e crescido a 37°C, pH 6,7 por 24 horas em condições microaerófilas em um meio sintético pobre, sem extrato de carne, extrato de levedura ou peptona e que utilizava sacarose como fonte de carbono. Para o polímero produzido nas citadas condições foram encontrados 1,5 g L⁻¹ de biomassa, a concentração do polímero foi de 28,85 g L⁻¹ com 18,7 g L⁻¹ de sacarose consumida e o coeficiente de rendimento de produção de EPS ($Y_{P/S}$) assumiu o valor de 0,72 g g⁻¹.

5.3 Purificação e caracterização do biopolímero

Antecedendo a etapa de caracterização do polímero, foram realizadas dez lavagens sucessivas com álcool 70% e três lavagens com acetona com posterior remoção do solvente que permitiram a purificação do produto. O polímero purificado foi submetido a hidrólise ácida com ácido trifluoracético (TFA) em condições distintas de concentração do ácido, massa do produto e tempo no banho-maria em ebulição a fim de observar em qual dessas condições um maior percentual seria hidrolisado, de acordo com a metodologia descrita no item 4.5.2.

5.3.1 Análise do biopolímero hidrolisado

O biopolímero foi hidrolisado objetivando-se a confirmação da sua natureza polissacarídica e identificação dos monômeros que o compõe por meio de análises cromatográficas. Após a hidrólise foram encontrados três picos no cromatograma (Figura 5.9). Estudos anteriores

realizados por Araújo (2006) apresentaram um pico que foi relacionado com a parte do polímero não hidrolisada e identificada no tempo de retenção 6,429; esse resultado foi similar ao pico obtido no cromatograma do polímero em estudo que apresentou um pico intenso no tempo 6,525. Além destes foram detectados um pico no tempo 9,202 com tempo de retenção correspondente a glicose e 9,858 correspondente a galactose.

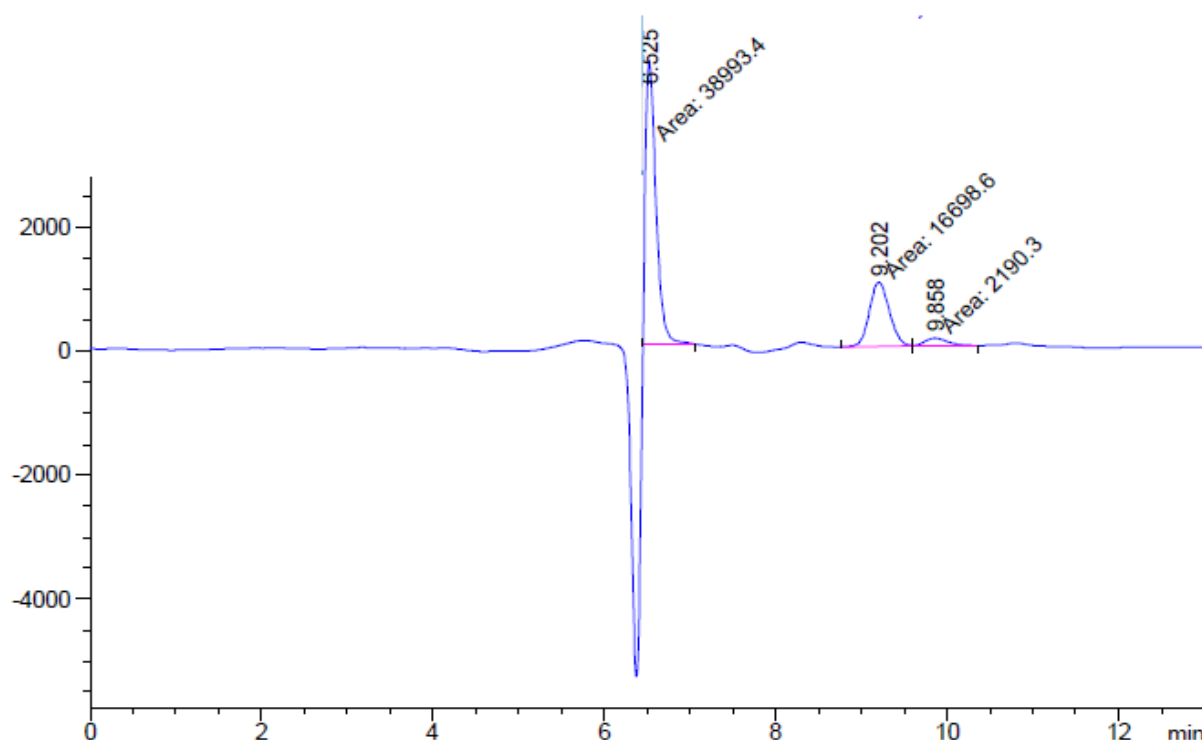


Figura 5.9 – Cromatograma do polímero hidrolisado com TFA 2 mol L⁻¹

A Tabela 5.3 apresenta as concentrações de glicose e galactose obtidas a partir da metodologia de hidrólise descrita por Fukuda et al. (2010), com a análise do polímero hidrolisado com TFA 2 mol L⁻¹ por 5 horas em banho-maria em ebulição e duas análises obtidas a partir da metodologia de Araújo (2006), que realiza hidrólise por 15 horas e utiliza duas condições distintas de concentração do ácido, 1 mol L⁻¹ e 2 mol L⁻¹. As concentrações a seguir foram obtidas por meio de curvas de calibração padrão construídas com solução de glicose e galactose. Após a obtenção dos cromatogramas, foi determinado o percentual de cada fração monomérica de acordo com o percentual da área de cada pico formado.

Tabela 5.3 - Concentração dos monômeros do polímero hidrolisado de acordo com o tempo em banho-maria em ebulição e diferentes concentrações do ácido (TFA).

Concentração de TFA/Tempo	Glicose (mol L ⁻¹)	Galactose (mol L ⁻¹)
Polímero 5 horas (TFA 2mol L ⁻¹)	0,040	0,035
Polímero 15 horas (TFA 2 mol L ⁻¹)	0,013	0,012
Polímero 15 horas (TFA 1 mol L ⁻¹)	0,020	0,012

Os melhores resultados de hidrólise foram obtidos com a metodologia descrita por Fukuda et al. (2010) modificada, onde a concentração de glicose obtida foi de 0,040 mol L⁻¹ e a concentração de galactose foi de 0,035 mol L⁻¹, conclui-se a partir desta que o polímero hidrolisou melhor em um período de tempo mais curto (5 horas) no banho-maria em ebulição. Nos tempos mais longos de hidrólise acredita-se que houve degradação e perda de material, o que explica as menores concentrações de açúcares obtidas nos tempos de 15 horas.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 5.3 e calculando-se a razão molar entre os monômeros encontrados para o polímero em estudo, foram encontrados glicose e galactose na proporção 1,15:1,0, que possivelmente deve-se ao melaço-sacarose, fonte de carbono utilizada para a produção do mesmo.

Shi (2009) e Fukuda (2010) estudaram a estrutura química do polissacarídeo produzido por *L. fermentum* em meios definidos e suplementados com fontes de carbono diferentes: glicose, galactose, sacarose e lactose; a partir desses experimentos eles observaram que os EPSs produzidos por esses carboidratos eram constituídos por glicose e galactose, podendo concluir que a fonte de carbono não altera a composição da estrutura do EPS de *L. fermentum*. Nenhum crescimento celular ou produção de EPS foram observados quando maltose e/ou frutose foram usados como fonte de carbono.

Leo et al. (2007) produziu EPS de *L. fermentum* TDS030603 em meio MRS e outro meio a base de soro de leite. A análise do produto revelou que se trata de unidades repetidas de tetrassacarídeos compostas por D-galactose e D-glicose com razão molar 2:5, os resultados

sugeriram que o exopolissacarídeo era composto por D-glicose e D-galactose. O mesmo foi comprovado por Zhang et al. (2011) que produziu *Lactobacillus fermentum* F6 em meio a base de leite suplementado com 2% dos açúcares: glicose, galactose, frutose e lactose e a análise dos monossacarídeos purificados em HPLC exibiu dois picos característicos de galactose e glicose, apresentando razão molar 4:3.

As unidades de repetição de heteropolissacarídeos de BAL variam em número de tri para octossacarídeos e em geral contêm a combinação de D-glicose, D-galactose e L-ramnose. Em poucos casos contêm N-acetilglucosaminas, N-acetilgalactosaminas, fucose, ácido glicurônico e substituintes (fosfato, acetil e glicerol) (De Vos, 1996; Low et al., 1998; De Vuyst et al., 2001).

Estudos realizados por Grobбен et al. (1996) investigaram o efeito das fontes de carbono glicose e frutose para a produção de polissacarídeo pela bactéria *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772 e observaram que em alguns casos, a estrutura de EPS tem se mostrado dependente da fonte de carbono. Análises estruturais do EPS produzidos pela citada bactéria crescida em cultura contínua utilizando frutose como fonte de carbono mostrou que o EPS consistia em unidades de glicose e galactose de repetição (na razão 1 : 2,4); quando cultivadas em meio contendo uma mistura de frutose e glicose, o polissacarídeo produzido era composto por glicose, galactose e ramnose numa proporção de 1: 7,0: 0,8.

5.3.2 Elucidação dos grupos funcionais presentes no composto

Os ensaios espectroscópicos na região do infravermelho permitiram a identificação dos grupos funcionais característicos do biopolímero estudado. Os espectros de absorção eletrônica UV-Vis contribuíram para a confirmação da ausência de grupos cromóforos que porventura pudessem estar presentes na composição do carboidrato, bem como confirmou a ausência de qualquer contaminação de natureza protéica ou nucléica que pudesse estar presente no material (polissacarídeo) final purificado. Para a identificação da estrutura do biopolímero será necessária a realização de espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) bidimensional.

O espectro de absorção eletrônica (UV-VIS) do polímero estudado, cuja janela utilizada foi na faixa de 200 a 800 nm, encontra-se na figura 5.10. Não foram observadas bandas de absorção para a amostra, dessa forma, não se pode determinar a sua absortividade molar, além de não terem sido observados grupos cromóforos ou possíveis insaturações conjugadas.

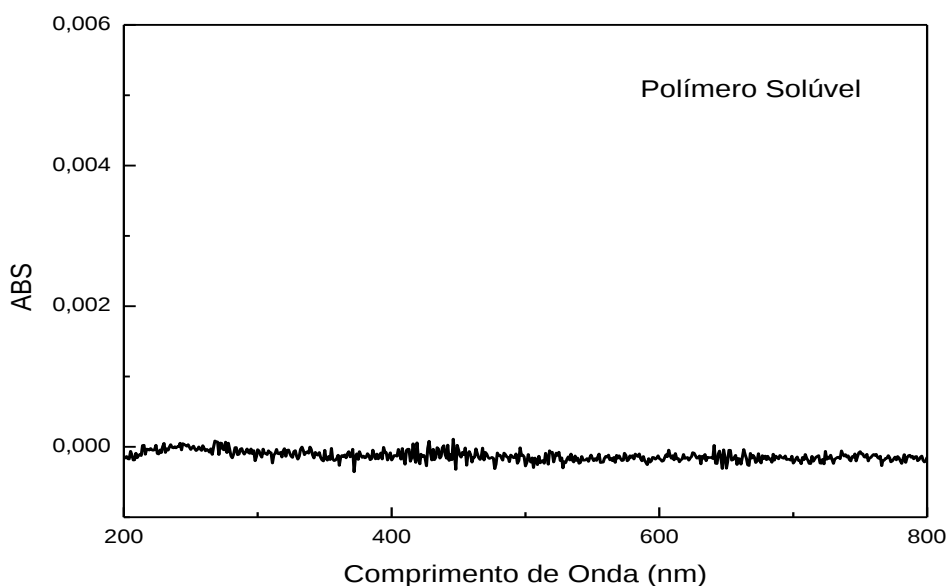


Figura 5.10 – Espectro de absorção eletrônica (UV-VIS) obtido a partir de solução aquosa do biopolímero ($3,6 \text{ mg mL}^{-1}$) produzido por *Lactobacillus fermentum*.

Quando submetido a espectroscopia na região do Infravermelho (IV) para caracterização dos grupos funcionais, observou-se uma banda intensa em 3397 cm^{-1} , referente ao estiramento axial O-H; a banda na região de 2923 cm^{-1} refere-se ao estiramento axial C-H; a banda na região de 1643 cm^{-1} refere-se a possível presença de grupos C=C na estrutura do carboidrato, a banda em torno de 1416 cm^{-1} refere-se a estiramento C-C, a banda na região 1338 cm^{-1} refere-se a deformação angular C-O, e por fim a banda na região 1010 cm^{-1} refere-se a deformação axial C-O-C. O espectro encontra-se descrito na figura 5.11, esses resultados corroboram com os resultados descritos por Padilha (2009).

O espectro de absorção no infravermelho de um composto é provavelmente a sua propriedade física mais original, por isso o espectro é muitas vezes chamado de impressão digital de uma molécula, além disso, foi a primeira ferramenta utilizada para identificação de compostos relativamente puros (KACURÁKOVÁ; WILSON, 2001).

Polissacarídeos contêm um número significativo de grupos hidroxilas, que apresentam uma ampla banda de absorção arredondada acima do comprimento de onda 3000 cm^{-1} . Esta absorção em que a região tem o traço arredondado é típica dos grupamentos hidroxilas, como a mesma é encontrada no composto estudado sugere que a substância trata-se de um

polissacarídeo (HOWE; ISHIDA; CLARK, 2002). As bandas em torno de 2920 cm^{-1} e 1630 cm^{-1} podem ser atribuídas a vibração do alongamento C H e associadas a flexão da vibração da água, respectivamente (MITIĆ et al., 2011; 2009).

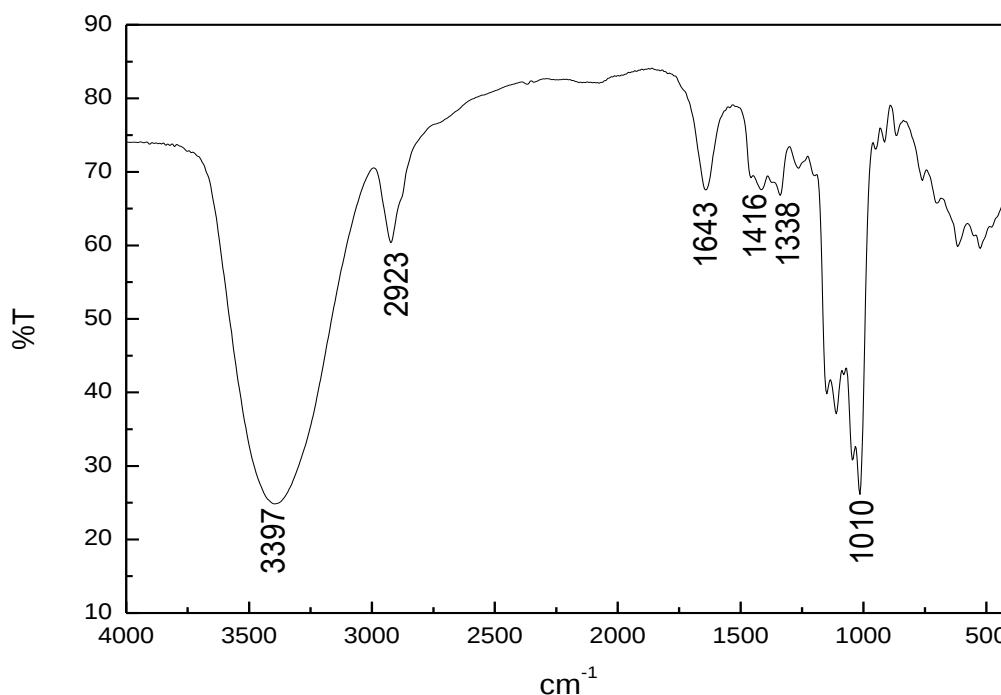


Figura 5.11 - Análise espectroscópica na região do infravermelho ($4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$), utilizando-se pastilha de KBr contendo o biopolímero produzido por *Lactobacillus fermentum*.

Notararigo et al. (2013) produziram e caracterizaram quatro bactérias ácido lácticas diferentes: *Lactobacillus suebicus*, *Leuconostoc mesenteroides* e duas cepas utilizadas para a produção de β -glucanas, *Pediococcus parvulus* e a cepa recombinante *Lactococcus lactis*. Dentre essas, *Lactococcus lactis* apresentou bandas similares às encontradas no polissacarídeo produzido por *Lactobacillus fermentum*: 3393 cm^{-1} , 2915 cm^{-1} , 1639 cm^{-1} , 1423 cm^{-1} , 1377 cm^{-1} , 1079 cm^{-1} , 1033 cm^{-1} , 894 cm^{-1} . A banda de absorção em torno de 890 cm^{-1} não observada no polissacarídeo em estudo é atribuída aos β anômeros.

Wang et al. (2008) analisaram o espectro de infravermelho de um exopolissacarídeo purificado produzido por *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3, os espectros revelaram características funcionais, tais como um grupo OH com banda larga que se estende em 3405 cm^{-1} e um fraco alongamento C-H de grupo metila em 2.924 cm^{-1} . Um trecho largo de C-O-C,

C-O a $1000-1200\text{ cm}^{-1}$ corresponde a presença de carboidratos, de modo que na região abaixo de 1500 cm^{-1} as bandas caracterizam a molécula como um todo, a banda de absorção forte a 1067 cm^{-1} está atribuindo que aquela substância é polissacarídeo. Absorção forte em 1643 cm^{-1} corresponde a amida, e um pico em 1378 cm^{-1} poderia ser atribuído a C=O e banda C-O de COO^- .

Ai et al. (2008) isolou e purificou o EPS produzido por *L. casei* LC2W para estudar as propriedades físico-químicas das diferentes frações (LCP1, LCP2 e LCP3) e sua utilização como anti-hipertensivo. A banda mais larga de absorção entre 3700 e 3000 cm^{-1} era devido ao alongamento dos grupos hidroxila, -OH. Cada polissacarídeo apresentou alta absorção na região $1200-950\text{ cm}^{-1}$, que estava na chamada região de impressão digital, em que a posição e a intensidade das bandas eram específicas para cada polissacarídeo permitindo a sua possível identificação, esta região foi dominada por vibrações de anel sobrepostas com vibrações de alongamento (C-OH) de grupos laterais e o (C-O-C) vibração da banda glicosídica. A diferença notável entre LCP1 e as outras frações foi a absorbância a 1732 cm^{-1} e 1258 cm^{-1} , que foram picos característicos do grupo esterificável, -COOR.

5.3.3 Análises térmicas do polissacarídeo produzido por *L. fermentum*

Na figura 5.12 ilustram-se as características de uma curva de TGA e uma curva de DSC por compensação de potência a um fluxo de 5° C por minuto para um processo de decomposição térmica do polímero produzido por *Lactobacillus fermentum* ocorrida em uma única etapa.

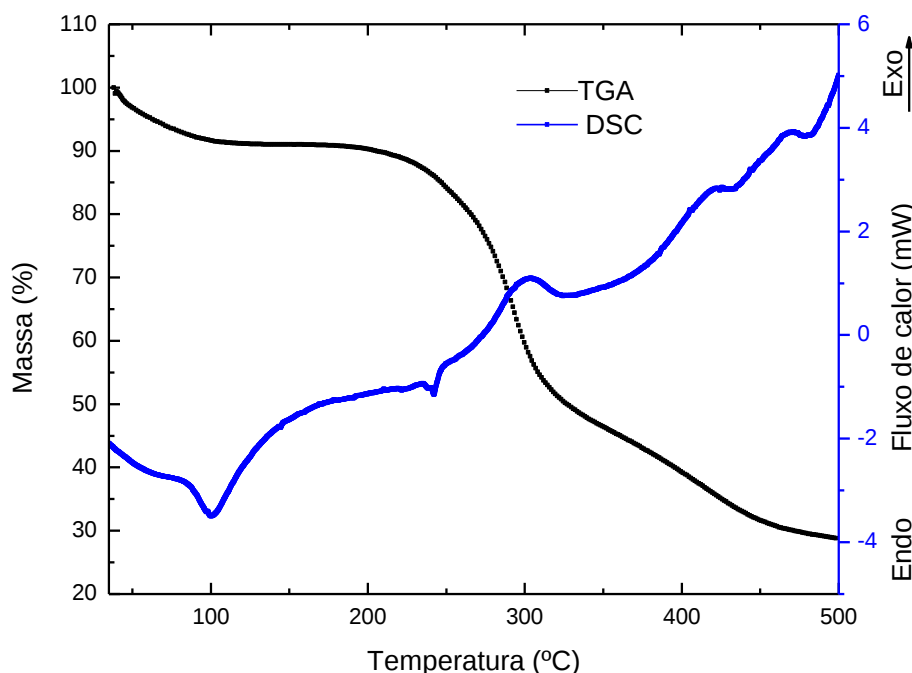


Figura 5.12 - Análise termogravimétrica (TGA) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) do biopolímero produzido por *Lactobacillus fermentum*.

Observando a curva termogravimétrica, processo caracterizado como dinâmico ou não-isotérmico em que a perda de massa é registrada continuamente à medida que a temperatura aumenta a uma razão constante, o biopolímero apresentou uma perda de massa considerável em torno de 8,43% na região entre 38,9° a 99°C, relacionada a desidratação. O EPS permanece estável até cerca de 200 °C, essa temperatura é denominada de temperatura inicial que caracteriza a temperatura correspondente às variações acumuladas de massa que a balança consegue detectar, a partir desse ponto inicia-se o processo de perda de massa, com uma região principal entre 200 e 350°C, onde há perda de cerca de 43,92% da massa total. O ponto em torno de 400 °C corresponde a temperatura final na qual as variações acumuladas de massa atingem um valor máximo, a amostra não foi completamente degradada ao final da análise na temperatura de 500°C, ficando cerca de 28,8% do polímero remanescentes.

As análises no DSC revelaram os eventos endotérmicos e exotérmicos do biopolímero apresentados com o aquecimento. O evento endotérmico é o início do processo de decomposição térmica em que há absorção de energia para que ocorram rompimentos de ligações químicas e volatilização do composto formado, quando a transferência de energia é

aumentada os eventos são ditos endotérmicos e com a transferência de energia diminuída acontecem com os eventos exotérmicos (STORPIRTIS, et al., 2011).

O primeiro pico observado em torno de 100 °C corresponde à perda de água por desidratação, o segundo pico endotérmico em torno de 250 °C corresponde ao ponto de decomposição da amostra, confirmado com análise para observação do ponto de fusão do polímero em equipamento Fisatom 430, o qual apresentou o valor em torno de 225 °C.

As curvas termogravimétricas quando observadas em consonância com as curvas do DSC podem ser indicativas de características térmicas favoráveis ao polímero. Esses resultados podem indicar que o mesmo possui um tempo de meia vida longa, conseqüentemente apresentando uma boa vida de prateleira ou podendo ter sua utilização associada a fabricação de excipientes para composição de medicamentos ou como base para cosméticos.

Wang et al. (2010) caracterizaram o exopolissacarídeo produzido por *L. planturum* KF5 e detectaram a partir da análise termogravimétrica (TGA), realizada de forma dinâmica, que o polímero apresentou uma perda de massa inicial entre 40 e 100 °C devido a perda de umidade que é gerada pelo aumento dos grupos carboxilas em polissacarídeos. O polímero se decompõe a partir de 100 °C a uma temperatura de degradação em torno de 279,59 °C e a goma xantana foi utilizada como referência, sendo a temperatura de degradação da mesma em torno de 282,65 °C. O ponto de fusão das amostras foram detectados a partir do DSC, sendo a temperatura de fusão do EPS KF5 86,35 °C e da goma xantana 153,4 °C. As características físicas encontradas no EPS eram diferentes das outras gomas disponíveis comercialmente, desse modo há a possibilidade do polímero ser aplicado na indústria de alimentos.

5.3.4 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear ^1H e ^{13}C

As análises de RMN (^1H) foram realizadas a temperatura de 26°C (299K) com 16 repetições para o polissacarídeo produzido a partir de *L. fermentum* e estão ilustradas na figura 5.13 e nos apêndices A e B. Cinco sinais foram evidentes, sendo o maior pico encontrado referente a água deuterada utilizada como diluente da amostra, foram encontrados um sinal em δ 4,96 e três sinais entre δ 4,0 e 3,5 os quais são sugestivos de carboidratos; esses resultados corroboram com os resultados encontrados por Fukuda et al. (2010) que encontraram cinco sinais e entre eles dois sinais em 4,978 e 5,314 sugestivos de α -anômero,

similar ao pico encontrado na amostra em δ 4,96. Destoando dos resultados encontrados, Fukuda encontrou dois sinais em δ 4,510 e δ 4,725 sugestivos de β anômeros.

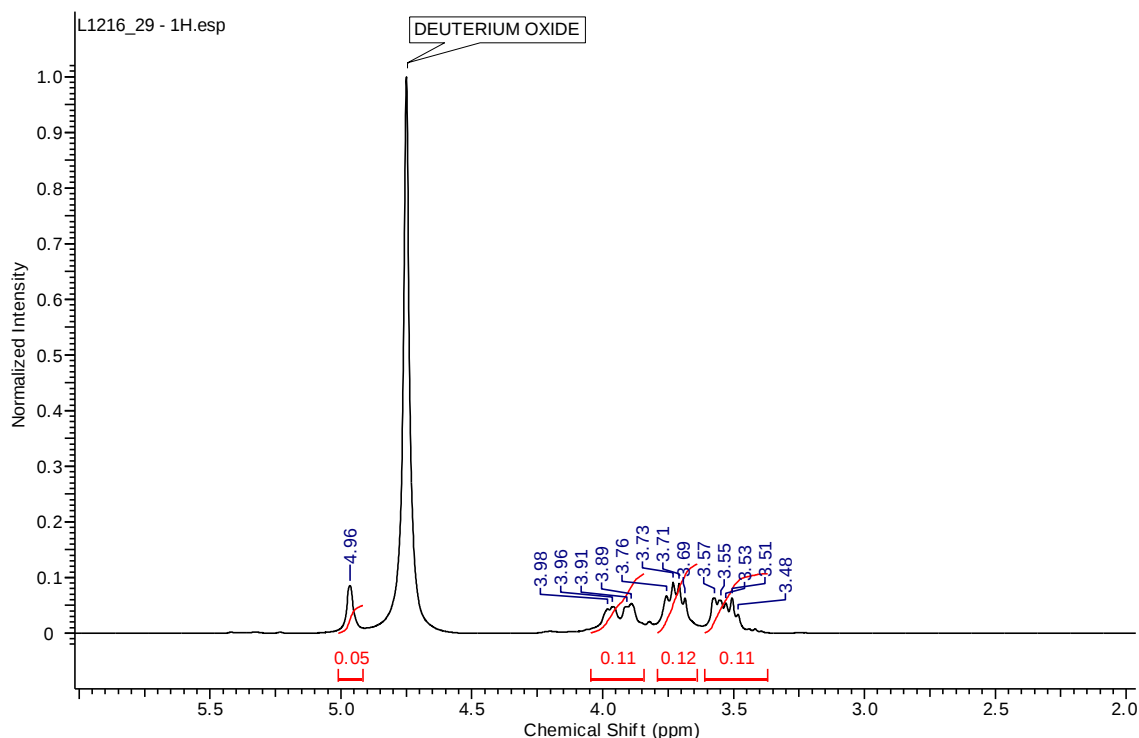


Figura 5.13 – Ampliação detalhada do Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Próton (^1H).

Gerwig et al. (2013) produziu o polímero de *L. fermentum* TDS 030603 em meio MRS e em meio quimicamente definido suplementado com glicose e encontrou que os espectros de RMN (^1H) obtidos a partir dos meios diferentes eram semelhantes. Nas regiões anoméricas quatro sinais (^1H) estavam presentes e foram apresentados em δ 5,674; δ 5,325 e δ 4,985; esses valores sugerem tratar-se de α anômeros, enquanto outro sinal em δ 4,731 é sugestivo de β anômero.

Os espectros de (^{13}C) estão ilustrados nas Figuras 5.14 e no apêndice C, as análises foram realizadas utilizando água deuterada como solvente a temperatura de 26°C (299,1 K) com 16.000 repetições. Foram evidenciados oito sinais (δ 97,66; δ 73,36; δ 73,06; δ 71,36; δ 70,15; δ 69,51; δ 65,52; δ 60,45).

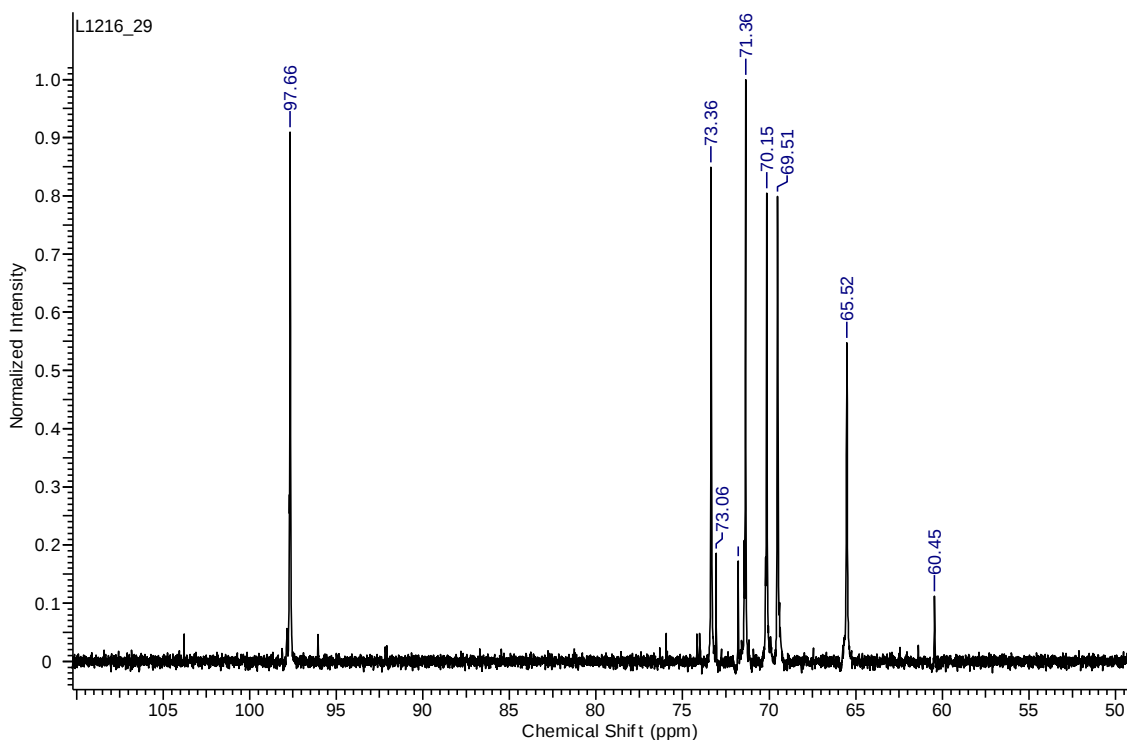


Figura 5.14 – Ampliação do Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono (^{13}C).

Segundo os dados de RMN (^1H e ^{13}C), o polímero isolado não possui em sua cadeia sinais referentes a prótons e carbonos anoméricos com conformação β (beta), ou seja, apenas α (alfa). O sinal de C1 presente no espectro de ^{13}C também sustenta a ocorrência de um único tipo de carbono (δ 97,66ppm), não ocorrendo outros sinais referentes aos demais tipos (β). A Figura 5.15 ilustra a estrutura proposta para o biopolímero em estudo baseada nas informações adquiridas pelos espectros de RMN (^1H e ^{13}C).

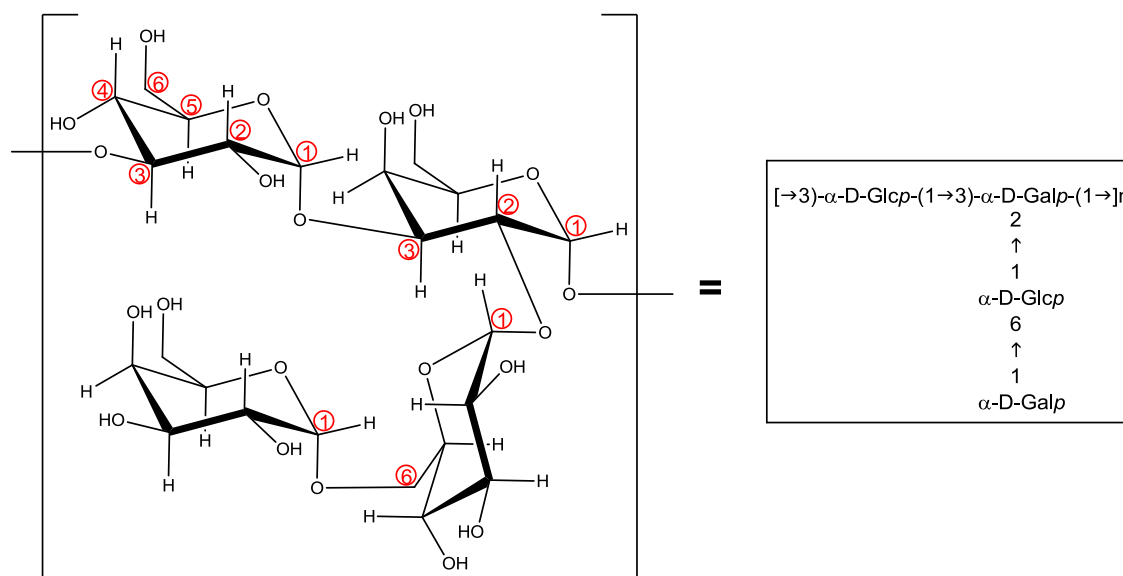


Figura 5.15 – Estrutura proposta para o exopolissacarídeo produzido por *L. fermentum*.

Os resultados, os quais indicaram uma relação muito próxima de galactose em relação à glicose (1,15 : 1) e cuja a estrutura proposta foi evidenciada acima, justificam que possivelmente a linhagem de *Lactobacillus fermentum* isolada e sequenciada no presente estudo, consiste em uma nova linhagem capaz de produzir EPS com essas características conformacionais ainda não descritas na literatura e que podem significar propriedades diferenciadas importantes, tanto do ponto de vista biológico (farmacológico) quanto físico-químico.

6 CONCLUSÃO

O bastonete Gram-positivo isolado no Laboratório de Processos Fermentativos do Departamento de Antibióticos – CCB (UFPE) foi identificado com o auxílio de métodos bioquímicos e moleculares (amplificação do gene *rDNA 16S*) como pertencente à espécie *Lactobacillus fermentum*. Confirmou-se que a produção do citado biopolímero pode ser levada a termo em quantidades relativamente altas, utilizando-se o meio melaço-sacarose e que a produção deve ser conduzida por 72 horas de fermentação, a 35 °C e pH inicial 6,5. Concluiu-se também que a condição estática comparada ao processo agitado com 210 rpm é a condição mais adequada para que se obtenha um bom rendimento em polímero, pois comprovou-se que a aeração ocasiona prejuízos no rendimento do processo e redução na concentração de polímero.

O biopolímero produzido pela citada linhagem teve sua metodologia de purificação definida e sua natureza química confirmada. A caracterização química assegurou que o mesmo é um polissacarídeo, identificando-se nele grupos funcionais como: C=C e éter (C-O-C), característicos de carboidratos e avaliados a partir da espectroscopia na região do infravermelho.

O polissacarídeo produzido por *L. fermentum* é constituído por glicose e galactose, na razão 1,15 : 1,0 e o conhecimento das suas propriedades térmicas, estabelecidas por TGA e DSC, comprovou que o mesmo possui uma alta temperatura de decomposição (em torno de 225°C). A observação das características viscosimétricas e térmicas desse polissacarídeo e o fato de ser produzido por uma bactéria do grupo BAL, permitem afirmar que o mesmo apresenta potencial de uso pela indústria biotecnológica, com aplicação possível na indústria alimentícia ou farmacêutica, como excipiente na composição de medicamentos, membranas, curativos ou como base para cosméticos.

Além da possibilidade de apresentar propriedades terapêuticas, comuns a tantos outros polissacarídeos, a citar: atividade anti-inflamatória, anti-tumoral, imuno-moduladora, anti-oxidante e anti-aterogênica, o próprio micro-organismo pode ser visto como um possível probiótico, que poderá vir a ser utilizado no desenvolvimento de produtos nutracêuticos.

Finalmente, a identificação da linhagem permitiu concluir que, sendo a mesma não patogênica, pode ser classificada como de nível de biossegurança NB1, o que a torna um micro-organismo sem restrições de uso em plantas industriais de fermentação para produção em larga escala.

REFERÊNCIAS

- AI, L.; ZHANG, H.; GUO, B.; CHEN, W.; WU, Z.; WU, Y. Preparation, partial characterization and bioactivity of exopolysaccharides from *Lactobacillus casei* LC2W. **Carbohydrate Polymers**, v.74, p.353–357, 2008.
- AMAN, A.; SIDDIQUI, N. N.; QADER, S. A. U. Characterization and potential applications of high molecular weight dextran produced by *Leuconostoc mesenteroides* AA1. **Carbohydrate Polymers**, v.87, p.910-915, 2012.
- ANANTHI, S.; RAGHAVENDRAN, H. R. B.; SUNIL, A. G.; GAYATHRI, V.; MAKRISHNAN, G.; VASANTHI, H. R. In vitro antioxidant and in vivo anti-inflammatory potential of crude polysaccharide from *Turbinaria ornata* (Marine Brown Alga). **Food and Chemical Toxicology**, v.48, p. 187–192, 2010.
- ARAÚJO, P. R. L. **Caracterização de um biopolímero bacteriano**. Recife: UFPE, 2006. Relatório Final de Iniciação Científica.
- ASLIM, B.; KSEKDAG, Z. N. Y.; BEYATLI, Y.; MERCAN, N. Exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbruckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* strains under different growth conditions. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.21, p. 673-677, 2005.
- BADEL, S.; BERNARDI, T.; MICHAUD, P. New perspectives for *Lactobacilli* exopolysaccharides. **Biotechnology Advances**, v.29, p. 54-66, 2011.
- BANIK, R. M.; KANARI, B.; UPADHYAY, S. N. Exopolysaccharide of the gellan family: prospects and potential. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.16, p.407-414, 2000.
- BAO, Y.; ZHANG, Y. C.; ZHANG, Y.; LIU, Y.; WANG, S. Q.; DONG, X. M.; WANG, Y. Y.; ZHANG, H. P. Screening of potential probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from traditional dairy products. **Food Control**, v. 21, p. 695-701, 2010.
- BEIJERINCK, M. W. Sur les ferments lactiques de l'industrie. **Archives Néerlandaises des Sciences Exactes et Naturelles**, v.6, p. 212-243, 1901.
- BERGEY'S Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore, MD: Williams & Wilkins, 1989. v. 1.
- BERGEY'S Manual of Determinative Bacteriology**. 2. ed. Lippincott: Williams & Wilkins, 2009. v. 3.
- LE BLANC, J. G.; GARRO, M. S.; DE GIORI, G. S. Effect of pH on *Lactobacillus fermentum* growth, raffinose removal, α -galactosidase activity and fermentation products. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 65, p. 119-123, 2004.
- BOELS, I. C.; KRANENBURG, R.; HUGENHOLTZ, J.; KLEEREBEZEM, M.; DE VOS, W.M. Sugar catabolism and its impact on the biosynthesis and engineering of

exopolysaccharide production in lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v. 11, p.723-732, 2001.

BRANDÃO, L.V.; NERY, T. B. R.; MACHADO, B. A. S.; ESPERIDIÃO, M. C. A.; DRUZIAN, J .I. Produção de goma xantana obtida a partir do caldo de cana. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, p.217-222, 2008.

CALDERON, M.; LOISEAU, G.; GUYOT, J. P. Fermentation by *Lactobacillus fermentum* Ogi E1 of different combinations of carbohydrates occurring naturally in cereals: consequences on growth energetics and α -amylase production. **International Journal of Food Microbiology**, v.80, p.161-169, 2003.

CALAZANS, G. M. T.; LOPES, C. E.; LIMA, R. M. O. C.; FRANÇA, F. P. Antitumour activities of levans produced by *Zymomonas mobilis* strains. **Biotechnology Letters**, v.19, n. 1, p.19-21, 1997.

CALAZANS, G. M. T.; LIMA, R. C.; DE FRANÇA, F. P.; LOPES, C. E. Molecular weight and antitumour activity of *Zymomonas mobilis* levans. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.27, p.245-247, 2000.

CALDERON, M.; LOISEAU, G.; GUYOY, J.P. Nutritional requirements and simplified cultivation medium to study growth and energetics of a sourdough lactic acid bacterium *Lactobacillus fermentum* Ogi E1 during heterolactic fermentation of starch. **Journal of Applied Microbiology**, v.90, p.508-516, 2001.

CLARRIDGE III, J. E. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v.17, n. 4, p.840-862, 2004

CAPELLARI, J.B.; **Biossíntese de ácido láctico por *Lactobacillus amylovorus* a partir de resíduos agroindustriais**.2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos)- Universidade da Região de Joinville, Joinville, SC, 2010.

CAO, R.; NAYA, S.; ARTIAGA, R.; GARCIA, A.; VARELA, A. Logistic approach to polymer degradation in dynamic TGA. **Polymer Degradation and Stability**, v. 85, p.667-674, 2004.

CAZETTA, M. L.; CELLIGOI, M. A. P. C. Aproveitamento do melaço e vinhaça de cana-de-açúcar como substrato para produção de biomassa protéica e lipídica por leveduras e bactéria. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v.26, n.2, p.105-112, 2005.

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

CERNING, J.; RENARD, C. M. G. C.; THIBAUT, J. F.; BOUILLANNE, C.; LANDON, M. DESMAZEAUD, M.; TOPISIROVIC, L. Carbon source requirements for

exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11 and partial structure analysis of the polymer. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p.3914-3919, 1994.

CERVANTES– UC, J. M.; CAUICH-RODRIGUEZ, J. V.; VAZQUEZ-TORRES, H.; LICEA-CLAVERI, A. TGA/FTIR study on thermal degradation of polymethacrylates containing carboxylic groups. **Polymer Degradation and Stability**, v.91, p.3312-3321, 2006.

CHARALAMPOPOULOS, D.; VAZQUEZ, J. A.; PANDIELLA, S. S. Modelling and validation of *Lactobacillus plantarum* fermentations in cereal-based media with different sugar concentrations and buffering capacities. **Biochemical Engineering Journal**, v.44, p. 96-105, 2009.

CHERUBIN, R.A. **Efeitos da viabilidade da levedura e da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica**. 2003. Tese (Doutorado em Agronomia)-Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2003.

CHIN, P. M.; INGLEDEW, W. M. Effect of lactic acid bacteria on wheat mash fermentations prepared with laboratory backset. **Enzyme and Microbial Technology**, v.16, p.311-317, 1994.

COIMBRA, C. G. O.; LOPES, C. E.; CALAZANS, G. M. T. Three-phase partitioning of hydrolyzed Levan. **Bioresource Technology**, Essex, GB, v. 101, p.4725–4728, 2010.

COUTINHO, H. L. C.; OLIVER, V. M.; MANFIO, G. P.; ROSADO, A. S. Evaluating the microbial diversity of soil samples: metodological innovation. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.71, n.3, p.491-503, 1999.

CUNHA, P. L. R.; PAULA, R. C. M.; FEITOSA, J. P. A. Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 649-660, 2009.

DAN, T.; FUKUDA, K.; SUGAI-BANNAI, M.; TAKAKUWA, N.; MOTOSHIMA, H.; URASHIMA, T. Characterization and expression analyses of the exopolysaccharide gene cluster in *Lactobacillus fermentum* TDS030603. **Bioscience Biothecnology Biochemistry**, v.12, p. 2656-2664, 2009.

DOLS-LAFARGUE, M.; WILLEMOT, R. M., MONSAN, P. F., REMAUD-SIMEON, M. Factors affecting α ,-1,2 glucooligosaccharide synthesis by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299 dextranucrase. **Biotechnology and Bioengineering**, v.74, n.6, p. 498-504, 2001.

DRUZIAN, J. I.; PAGLIARINI, A. P. Produção de goma xantana por fermentação do resíduo de suco de maçã. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.27, n.1, p.26-31, 2007.

DWEK, R.A. Glycobiology: Toward understanding the function of sugars. **Chemical Review**, v.96, p.683-720, 1996.

EIRAS, C.; PASSOS, I. N. G.; BRITO, A. C. F.; SANTOS JÚNIOR, J. R. dos. Nanocompósitos eletroativos de poli -*o*-metoxianilina e polissacarídeos naturais. **Química Nova**, São Paulo, v.30, n.5, p.1158-1162, 2007.

ERNANDES, F. M. P. G.; GARCIA-CRUZ, C. H. Levana bacteriana: aspectos tecnológicos, características e produção. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.26, n.1, p.71-82, 2005.

FABER, E. J.; KAMERLING, J. P.; VLIEGENTHART, J. F. G. Structure of the extracellular polysaccharide produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 291. **Carbohydrate Research**, v.331, p.183-94, 2001.

FONS, M.; HEGE, T.; LADIRE, M.; RAIBAUD, P.; DUCLUZEAU, R.; MAGUIN, E. Isolation and characterization of a plasmid from *Lactobacillus fermentum* conferring erythromycin resistance. **Plasmid**, v.37, p.199-203, 1997.

FUKUDA, E. K.; VASCONCELOS, A. F. D.; MATIAS, A. C.; BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; DA SILVA, M. L.C. Polissacarídeos de parede celular fúngica: purificação e caracterização. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.30, n.1, p.117-134, jan./mar. 2009.

FUKUDA, K.; SHI, T.; NAGAMI, K.; LEO, F.; NAKAMURA, T.; YASUDA, K.; SENDA, A.; MOTOSHIMA, H.; URASHIMA, T. Effects of carbohydrate source on physicochemical properties of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus fermentum* TDS030603 in a chemically defined medium. **Carbohydrate Polymers**, v.79, p.1040-1045, 2010.

GARCIA-OCHOA, F.; SANTOS, V. E.; CASAS, J. A. GÓMEZ E. Xanthan gum: production, recovery, and properties. **Biotechnology Advances**, v.18, p.549-57, 2000.

GERWIG, G.J.; DOBRUCHOWSKA, J.M.; SHI, T.; URASHIMA, T.; FUKUDA, K.; KAMERLING, J.P. Structure determination of the exopolysaccharide of *Lactobacillus fermentum* TDS030603-A revision. **Carbohydrate Research**, v.378, p.84-90, 2013.

GOLEBIEWSKI, J.; GALESKI, A. Thermal stability of nanoclay polypropylene composites by simultaneous DSC and TGA. **Composites Science and Technology**, p.3442-3447, n.67, 2007.

GROBBEN, G. J.; SMITH, M. R.; SIKKEMA, J.; DE BONT, J. A. M. Influence of fructose and glucose on the production of exopolysaccharides and the activities of enzymes involved in the sugar metabolism and the synthesis of sugar nucleotides in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.46, p.279-284, 1996.

GROBBEN, G. J.; VAN CASTEREN, W. H. M.; SCHOLS, H. A.; OOSTERVELD, A.; SALA, G.; SMITH, M. R.; SIKKEMA, J.; DE BONT, J. A. M. Analysis of the exopolysaccharides produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772 grown in continuous culture on glucose and fructose. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.48, p.516-521, 1997.

GROVER, S.; SHARMA V. K.; MALLAPA, R. H.; BATISH, V. K. Draft Genome Sequence of *Lactobacillus fermentum* Lf1, an Indian Isolate of Human Gut Origin. **Genome Announcements**, v.1, n.6, p. 1-2, 2013.

HOWE, K. J.; ISHIDA, K. P.; CLARK, M. M. Use of ATR/FT-IR spectrometry to study fouling of microfiltration membranes by natural waters. **Desalination**, v.147,

251–255, 2002.

HUARD, R. C.; LAZZARINI, L. C. O.; BUTLER, W. R.; VAN SOOLINGEN, D.; HO, J. L. 2003. PCR-based method to differentiate the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex on the basis of genomic deletions. **Journal Clinical Microbiology**, v.41, p.1637-1650, 2003.

HUGENHOLTZ, J.; KLEEREBEZEM, M. Metabolic engineering of lactic acid bacteria: Overview of the approaches and results of pathway rerouting involved in food fermentations. **Current Opinion in Biotechnology**, v.10, p.492-497, 1999.

ISMAIL, B.; NAMPOOTHIRI, K. M. Production, purification and structural characterization of an exopolysaccharide produced by a probiotic *Lactobacillus plantarum* MTCC 9510. **Archives of Microbiology**, v.192, p.1049-1057, 2010.

JANSSON, P. E.; KENNE, L.; LINDBERG, B. Structure of the extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*. **Carbohydrate Research**, v.45, p.275-282, 1975.

JAYASHREE, S.; POOJA, S.; PUSHPANATHAN, M.; VISHNU, U.; SANKARASUBRAMANIAN, J.; RAJENDHRAN, J.; GUNASEKARAN, P. Genome Sequence of *Lactobacillus fermentum* Strain MTCC 8711, a Probiotic Bacterium Isolated from Yogurt. **Genome Announcements**, Sept./Oct. v.1, n.5, 2013.

JENNY, K.; DELTRIEU, V.; KAPPELLI, O. Lipopeptide production by *Bacillus licheniformis*. In: DEKKER M. **Biosurfactants-Production, Properties, Applications**. New York, Naim Kosaric, 1993. p. 135-156. (Serie Surfactant Science series, 48).

JOLLY, L.; VINCENT, S. J. F.; DUBOC, P.; NEESER, J. R. Exploiting exopolysaccharides from lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.82, p.367-374, 2002.

KACURÁKOVÁ, M.; WILSON, R.H. Developments in mid-infrared FT-IR spectroscopy of selected carbohydrates. **Carbohydrate Polymers**, v.44, p.291-303, 2001.

KAewnOPPARAT, S.; DANGMANEEA, N.; KAewnOPPARAT, N.; SRICHANAA, T.; CHULASIRI, M.; SETTHARAKSA, S. In vitro probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* SK5 isolated from vagina of a healthy woman. **Anaerobe**, v.22, p.6-13, 2013.

KAUR, B.; BALGIR, P.; MITTU, B.; KUMAR, B.; GARG, N. Biomedical Applications of Fermenticin HV6b Isolated from *Lactobacillus fermentum* HV6b MTCC10770. **BioMed Research International**. v.2013, article ID 168438, 8 pages. DOI: doi.org/10.1155/2013/168438.

KANDLER, O. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, NL, v.49, p.209-224, 1983.

KARLYSHEV, A. V.; RAJU, K.; ABRAMOV, V. M. Draft Genome Sequence of *Lactobacillus fermentum* Strain 3872. **Genome Announcements**, v.1, n.6, p.1, 2013.

KENNES, C.; VEIGA, M. C.; DUBOURGUIER, H. C.; TOUZEL, J. P.; ALBAGNAC, G.; NAVEAU, H.; NYNS, E. J. Trophic relationships between *Saccharomyces cerevisiae* and

Lactobacillus plantarum and their metabolism of glucose and citrate. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v.54, n.4, p.1046-1051, 1991.

KOZDRÓJ, J.; VAN ELSAS, J. D. Response of bacterial community to root exudates in soil pollutes with heavy metals assessed by molecular and cultural approaches. **Soil Biology Biochemistry**, v.32, p.1405-1417, 2000.

KUÇUKASIK, F.; KAZAK, H.; GUNEY, D.; FINORE, I.; POLI, A.; YENIGUN, O.; NICOLAUS, B.; ONE, E. T. Molasses as fermentation substrate for levan production by *Halomonas* sp. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, DE, v.89, n.6, Mar. p.1729-1740, 2011.

LANE, D. L.; PACE, B.; OLSEN, G. J.; STAHL, D. A.; SOGIN, M. L.; PACE, N. R. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.82, p.6955-6959, 1985.

LAWS, A.; GU, Y.; MARSHALL, V. Biosynthesis, characterisation, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. **Biotechnology Advances**, v.19, p.597-625, 2001.

LAZARIDOU, A.; ROUKAS, T.; BILIADERIS, C. G.; VAIKOUSI, H. Characterization of pullulan produced from beet molasses by *Aureobasidium pullulans* in a stirred tank reactor under varying agitation. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, US, v.31, p. 122-132, 2002.

LEO, F.; HASHIDA, S.; KUMAGAI, D.; UCHIDA, K.; MOTOSHIMA, H.; ARAI, I.; ASAKUMA, S.; FUKUDA, K.; URASHIMA, T. Studies on a neutral exopolysaccharide of *Lactobacillus fermentum* TDS 030603. **Journal of Applied Glycoscience**, v.54, p.223-229, 2007.

LEROY, F.; DEGEEST, B.; DE VUYST, L. A novel area of predictive modelling: describing the functionality of beneficial microorganisms in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v.73, p.251-259, 2002.

LEROY, F.; DE VUYST, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Trends in Food Science & Technology**, v.15, p.67-78, 2004.

LIN, T. Y.; CHANG CHIEN, M. F. Exopolysaccharide production as affected by lactic acid bacteria and fermentation time. **Food Chemistry**, v.100, p.1419-1423, 2007.

LIU, C.; LU, J.; LU, L.; LIU, Y.; WANG, F.; XIAO, M. Isolation, structural characterization and immunological activity of an exopolysaccharide produced by *Bacillus licheniformis* 8-37-0-1. **Bioresource Technology**, v. 101, p.5528-5533, 2010.

LOPES, W. A.; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do Infravermelho. **Química Nova**, v.27, n.4, p.670-673, 2004.

LOW, D.; AHLGREN, J. A.; HORNE, D.; MCMAHON, D. J.; OBERG, C. J.; BROADBENT, J. R. Role of *Streptococcus thermophilus* MR.1C capsular exopolysaccharide

in cheese moisture retention. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n.6, p.2147-2151, 1998.

MACIEL, J. C.; ANDRAD, P. L.; NERI, D. F. M.; CARVALHO JUNIOR., L. B.; CARDOSO, C. A.; CALAZANS, G. M. T.; ALBINO AGUIAR, J.; SILVA, M. P. C. Preparation and characterization of magnetic levan particles as matrix for trypsin immobilization. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, Amsterdam, NL, v.324, p.1312-1316, 2012.

MACRAE, A. The use of 16S rDNA methods in soil microbial ecology. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.31, p.77-82, 2000.

MAGGI, L.; MASTROMARINO, P.; MACCHIA, S.; BRIGIDI, P.; PIROVANO, F.; MATTEUZZI, D.; CONTE, U. Technological and biological evaluation of tablets containing different strains of lactobacilli for vaginal administration. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.50, n.3, p. 389-395, 2000.

MANANDHAR, S.; VIDHATE, S.; D'SOUZA, N. Water soluble levan polysaccharide biopolymer electrospun fibers. **Carbohydrate Polymers**, v.78, p.794-798, 2009.

MARINHO-SORIANO, E.;BOURRET, E. Polysaccharides from the red seaweed *Gracilaria dura* (Gracilariales, Rhodophyta). **Bioresource Technology**, v.96, p.379-382, 2005.

MENDONÇA, C. M. S. de; LIMA, I. P. de B.; ARAGÃO, C. F. S.; GOMES, A. P. B. Thermal compatibility between hydroquinone and retinoic acid in pharmaceutical formulations. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, p.1-9, 2013. DOI: 10.1007/s10973-013-2941-6.

MELO, I. R.; PIMENTEL, M. F.; LOPES, C. E.; CALAZANS, G. M. T . Application of Fractional Factorial Design to Levan Production by *Zymomonas mobilis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, SP, v.38, p.1-7, 2007.

MELTON, L. D.; MINDT, L.; REES, D.A.; SANDERSON, G. R. Covalent structure of the extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*: evidence from partial hydrolysis studies. **Carbohydrate Research**, v. 46, p. 245-257, 1976.

MIKELSAAR, M.; ZILMER, M. *Lactobacillus fermentum* ME-3- an antimicrobial and antioxidative probiotic. **Microbial Ecology in Health and Disease**. v.21, p.1-27, 2009.

MITIĆ, Ž.; ČAKIĆ, M.; NIKOLIĆ, G. M.; NIKOLIĆ, R.; NIKOLIĆ, G. S.; PAVLOVIĆ, R.; SANTANIELLO, E. Synthesis, physicochemical and spectroscopic characterization of copper(II)–polysaccharide pullulan complexes by UV–vis, ATR-FTIR, and EPR. **Carbohydrate Research**, v.346, p.434–441, 2011.

MITIĆ, Ž.; NIKOLIĆ, G. S.; ČAKIĆ, M.; PREMOVIĆ, P.; ILIĆ, L. FTIR spectroscopic characterization of Cu (II) coordination compounds with exopolysaccharide pullulan and its derivatives. **Journal of Molecular Structure**, v.924-926, p.264-273, 2009.

MORRIS, V. J.; MILES, M. J. Effect of natural modifications on the functional properties of extracellular bacterial polysaccharides. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.8, p.342-348, 1986.

MOTHÉ, C. G.; DE SOUZA, I. A.; CALAZANS, G. M. T. Antitumor activity of cashew gum from *Anacardium Occidentale* L. **Agro Food industry hi-tech**, Milano, IT, v.19, n.6, p.50-52, 2008.

NARENDRANATH, N. V.; HYNES, S. H.; THOMAS, K. C.; INGLEDEW, W. M. Effects of *Lactobacilli* on Yeast-Catalyzed Ethanol Fermentations. **Applied and environmental microbiology**, v.63, n.11, p.4158-4163, 1997.

NITSCHKE, M.; RODRIGUES, V.; SCHINATTO, L. F. Formulação de meios de cultivo à base de soro de leite para produção de goma xantana por *Xanthomonas campestris* C7L. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.21, n.1, p.82-85, 2001.

NOTARARIGO, S.; NACHER-VAZQUEZ, M.; IBARBURU, I.; WERNING, M. L.; DE PALENCIA, P. F.; DUENAS, M. T.; AZNAR, R.; LOPEZ, P.; PRIETO, A. Comparative analysis of production and purification of homo- and hetero-polysaccharides produced by lactic acid bacteria. **Carbohydrate Polymers**, v.93, p.57- 64, 2013.

OLIVE, D. M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n.6, p.1661-1669, 1999.

PADILHA, R. J. S. A. **Caracterização microbiológica de uma bactéria produtora de exopolissacarídeo**. 2009. Monografia (Graduação em Biomedicina)- Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009.

PAULA, V. C. de; PINHEIRO, I. O.; LOPES, C. E.; CALAZANS, G. M. T. Microwave-assisted hydrolysis of *Zymomonas mobilis* levan envisaging oligofructan production. **Bioresource Technology**, Essex, GB, v. 99, p. 2466–2470, 2008.

PEDERSON, C. S. The gas-producing species of the genus *Lactobacillus*. **Journal of Bacteriology**, New York, v.3, n.19, p.95-108, 1937.

PHAM, P. L.; DUPONT, I.; ROY, D.; LAPOINTE, G.; CERNING, J. Production of exopolysaccharides by *Lactobacillus rhamnosus* R and analysis of its enzymatic degradation during prolonged fermentation. **Applied and environmental microbiology**, v. 66, p. 2302-2310, 2000.

PLANT, L.; LAM, C. CONWAY, P. L.; O' RIORDAN, K. Gastrointestinal microbial community shifts observed following oral administration of a *Lactobacillus fermentum* strain to mice. **FEMS Microbiology Ecology**, Mar. v. 43, n.2, p.133-140, 2003.

PIMENTA, F. D.; LOPES, L. M. A.; FRANÇA, F. P. Processing Parameters Matching Effects upon *Rhizobium tropici* Biopolymers' Rheological Properties. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.150, p. 33-49, 2008.

QUADRI, L. E. N.; Regulation of antimicrobial peptide production by autoinducer-mediated quorum sensing in lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.82, n.1-4, p.133-145, 2002.

QIAN, F.; AN, L.; HE, X.; HAN, Q.; LI, X. Antibacterial activity of xantho-oligosaccharide cleaved from xanthan against phytopathogenic *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Process Biochemistry**, v. 41, p.1582-1588, 2006

REID, G.; BURTON, J. Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic bacteria. **Microbes and Infection**, v.4, p. 319-324, 2002

REISS, M.; HARTMEIER, W. Levan production with a flocculent strain of *Zymomonas mobilis*, **Food Biotechnology**, v.4, p.69-75, 1990.

REQUE, E. F.; PANDEY, A.; FRANCO, S. G.; SOCCOL, C. R. Isolation, identification and physiological study of *Lactobacillus fermentum* LPB for use as probiotic in chickens. **Brazilian Journal of Microbiology**, n.31, p.303-307, 2000.

RINAUDO, M. Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. **Polymer International**, v.57, p.397-430, 2008.

RIZZARELLI, P.; CARROCCIO, S. Modern mass spectrometry in the characterization and degradation of biodegradable polymers, **Analytica Chimica Acta**, 2013. DOI: 10.1016/j.aca.2013.11.001

RUAS-MADIEDO, P.; DE LOS REYES-GAVILAN, C.G. Invited review: methods for the screening, isolation and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. **Journal of Dairy Science**, v.88, p.843-856, 2005.

SALAZAR, N.; GUEIMONDE, M.; HERNANDEZ-BARRANCO, A. M.; RUAS-MADIEDO, P.; DE LOS REYES-GAVILÁN, C. G. Exopolysaccharides produced by intestinal Bifidobacterium strains act as fermentable substrates for human intestinal bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, n.15, p.4737-4745, 2008.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. v.3.

SANTOS, L. F.; CAVALCANTI, O. A.; CELLIGOI, M. A. P. C. Production and use of exopolysaccharids: levan polysaccharide and the moderate permission potential of drugs. **Revista Saúde e Pesquisa**, Maringá, PR, v.4, n.2, p.254-270, 2011.

SAVAGODO, A.; OUATTARA, C. A. T.; SAVAGODO, P. W.; BARRO, N.; OUATTARA, A. S.; TRAORÉ, A. S. Identification of exopolysaccharides-producing lactic acid bacteria from Burkina Faso fermented milk samples. **African Journal of Biotechnology**, v.3, p.189-194, 2004.

SCHNEEGURT, M. A.; KULPA, C. F. J. The application of molecular techniques in environmental biotechnology for monitoring microbial systems. **Biotechnology Applied. Biochemistry**, v.27, p.73-79, 1998.

SHAMALA, T. R.; PRASAD, M. S. Preliminary studies on the production of high and low viscosity dextran by *Leuconostoc* spp. **ProcessBiochemistry**, v.30, n.3, p.237-241, 1995.

SHI, T. **Studies on Exopolysaccharide Produced by *Lactobacillus fermentum* TDS030603**. 2009. Master (Course of Food and Animal Hygiene) - Graduate school of Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, 2009.

SHIN, I. L.; SHIEH, C. J.; HSIEH, C. Y. Selective production and characterization of levan by *Bacillus subtilis* (Natto) Takahashi. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.53, n.21, p. 8211-8215, 2005

SHINGEL, K. I. Determination of structural peculiarities of dextran, pullulan and γ -irradiated pullulan by Fourier-transform IR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v.337, p.1445-1451, 2002.

SHENE, C.; CANQUIL, N.; BRAVO, S.; RUBILAR, M. Production of the exopolysaccharides by *Streptococcus thermophilus*: Effect of growth conditions on fermentation kinetics and intrinsic viscosity. **International Journal of Food Microbiology**, v.124, p.279-284, 2008

SHOJI, A. S.; OLIVEIRA, A. C.; BALIEIRO, J. C. C.; FREITAS, O.; THOMAZINI, M.; HEINEMANN, R. J. B.; OKURO, P. K.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Viability of *L. acidophilus* microcapsules and their application to buffalo milk yoghurt. **Food and Bioproducts Processing**, v. 91, p.83-88, 2013.

SILVA, E. C.; PAOLA, M. V. R. V.; MATOS, J. R. Análise térmica aplicada à cosmetologia. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v.43, n.3, jul./set. 2007.

SILVA, L. M. C.; MARTINEZ, P. F.; IZELI, N. L.; SILVA, I. R.; VASCONCELOS, A. F. D.; CARDOSO, M. S. Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas. **Química Nova**, São Paulo, v.29, n.1, p.85-92, 2006.

SILVESTER, M. E.; DICKS, L. M. T. Identification of lactic acid bacteria isolated from human vaginal secretions. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 83, p.117-123, 2003.

STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J. E.; CHIANN, C.; GAI, M. N. **Biofarmacotécnica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

SUTHERLAND, I. A sticky business. Microbial polysaccharides: current products and future trends, **Microbiology Today**, London, UK, v.29, p.70-71, 2002.

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

SUTHERLAND, I. W. Microbial Biopolymers from Agricultural Products: Production and Potential. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Barking, GB, v.38, n. 3-4, p. 249-261, 1997.

SUTHERLAND, I. W. Novel and established applications of microbial polysaccharides. **Tibtech**, v.16, p.41-46, 1998.

SUTHERLAND, I. W. Polysaccharide lyases. **FEMS Microbiology Reviews**, v.16, p.323-347, 1995.

THOMAS, K. C.; HYNES, S. H.; INGLEDEW, W. M. Influence of Medium Buffering Capacity on Inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* Growth by Acetic and Lactic Acids. **Applied and environmental microbiology**, v.68, n. 4, p.1616-1623, 2002.

THOMSEN, M. H.; GUYOT, J. P.; KIEL, P. Batch fermentations on synthetic mixed sugar and starch medium with amylolytic lactic acid bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.74, p.540-546, 2007.

TORINO, M. I.; TARANTO, M. P.; SESMA, F.; DE VALDEZ, G. F. Heterofermentative pattern and exopolysaccharide production by *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807 in response to environmental pH. **Journal Applied Microbiology**, v.91, p.846-52, 2001.

TROY, F. A. The chemistry and biosynthesis of selected bacterial capsular polymers. **Annual Review of Microbiology**, v.33, p.519-560, 1979.

VANDAMME, P.; POT, B.; GILLIS, M.; DE VOS, P.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiology Reviews**, v.60, n.2, p.407-438, 1996

VAN DE GUCHTE, M.; SERROR, P.; CHERVAUX, C.; SMOKVINA, T.; EHRLICH, S.D.; MAGUIN, E. Stress responses in lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.82, p.187-216, 2002.

VAN GEEL SCHUTTEN, G. H.; FLESH, F.; TEN BRINCK, B.; SMITH, M. R.; DIJKHUIZEN, L. Screening and characterization of *Lactobacillus* strains producing large amounts of exopolysaccharides. **Applied Biology and Biotechnology**, v.50, p.697-703, 1998.

VANHAVERBEKE, C.; BOSSO, C.; COLIN-MAREL, P.; GEY, C.; GAMAR-NOURANI, L.; BLONDEAU, K.; SIMONET, J.; HEYRAUD, A. Structure of an extracellular polysaccharide produced by *Lactobacillus rhamnosus* strain C83. **Carbohydrate Research**, v.314, p.211-220, 1998.

VEDAMUTHU, E. R.; NEVILLE, J. M. Involvement of a plasmid in production of ropiness (mucoidness) in milk cultures by *Streptococcus cremoris* MS. **Applied and Environmental Microbiology**, v.51, p.677-682, 1986.

VELEZ, M. P.; DE KEERSMAECKER, S. C.; VANDERLEYDEN, J. Adherence factors of *Lactobacillus* in the human gastrointestinal tract. **FEMS Microbiol Lett**, v.276, p.140-148, 2007.

VELRAEDS, M.M.C.; VAN DER MEI, H.C.; REID, G.; BUSSCHER, H.J. Physicochemical and biochemical characterization of biosurfactants released by *Lactobacillus* strains. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.8, p.51-56, 1996.

VIDEROLA, G.; PERDIGON, G.; DUARTE, J.; FARNWORTH, E.; MATAR, C. Effects of the oral administration of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranoferiens* on the gut mucosal immunity. **Cytokine**, v.36, p.254-260, 2007.

DE VOS, W. M. Metabolic engineering of sugar catabolism in lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.70, p.223-242, 1996.

VRANCKEN, G.; RIMAUX, T.; DE VUYST, L.; LEROY, F. Kinetic analysis of growth and sugar consumption by *Lactobacillus fermentum* IMDO 130101 reveals adaptation to the acidic sourdough ecosystem. **International Journal of Food Microbiology**, v.128, p.58-66, 2008.

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

DE VUYST, L.; DE VIN, F.; VANINGELGEM, F.; DEGEEST, B. Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v.11, p.687-707, 2001.

DE VUYST, L.; ZAMFIR, M.; MOZZI, F.; ADRIANY, T.; MARSHALL, V.; DEGEEST, B.; VANINGELGEM, F. Exopolysaccharides producing *Streptococcus thermophilus* strains as functional starter cultures in the production of fermented milks. **International Dairy Journal**, v.13 p.707–717, 2003.

ZHANG, M.; CUI, S.W.; CHEUNG, P. C. K.; WANG, Q. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. **Trends in Food Science & Technology**, v.18, p.4-19, 2007.

ZHANG, Y.; LI, S.; ZHANG, C.; LUO, Y.; ZHANG, H.; YANG, Z. Growth and exopolysaccharide production by *Lactobacillus fermentum* F6 in skim milk. **African Journal of Biotechnology**, v.10, n.11, p.2080-2091, 2011.

ZHANG, Y.; LIU, Y.; BAO, Y.; ZHANG, H. Influence of pH, Heat and Enzymatic Treatments on the Activity of Antibacterial Substance in MRS and Milk Media Produced by *Lactobacillus fermentum* F6. **Agricultural Sciences in China**, v.9, n.6, p.911-920, 2010.

ZAUNMULLER, T.; EICHERT, M.; RICHTER, H.; UNDEN, G. Variations in the energy metabolism of biotechnologically relevant heterofermentative lactic acid bacteria during growth on sugars and organic acids. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.72, p.421-429, 2006.

YADAV, V.; PRAPPULLA, S. G.; JHA, A.; POONIA, A. A novel exopolysaccharide from probiotic *Lactobacillus fermentum* CFR 2195: Production, purification and characterization. **Biotechnololy**, v. 1, n. 4, p.415-421, 2011.

YANG, L.; ZHANG, L. M. Chemical structural and chain conformational characterization of some bioactive polysaccharides isolated from natural sources. **Carbohydrate Polymers**, v.76, p.349-361, 2009.

WANG, Y.; AHMED, Z.; FENG, W.; LI, C.; SONG, S. Physicochemical properties of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.43, p.283-288, 2008.

WANG, Y.; LI, C.; LIU, P.; AHMED, Z.; XIAO, P.; BAI, X. Physical characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* KF5 isolated from Tibet Kefir. **Carbohydrate Polymers**, v.82, p.895–903, 2010.

WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v.173, p.697-703, 1991.

WELMAN, A. D.; MADDUX, I. S. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. **TRENDS in Biotechnology**, v.21, n.6, p.269-274, 2003.

WOESE, C. R. Interpreting the universal phylogenetic tree. **Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A**, v.97, n.15, p.8392-8396, 2000.

ANEXO A - Meios de cultura

Tabela 1 - Composição do meio de cultivo (MSA) para reativação da cultura (pH=6,5).

Componente	Concentração (g L ⁻¹)
Melaço	50,0
Sacarose comercial	75,0
K ₂ HPO ₄	1,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0
Extrato de levedura	1,5
Peptona	1,5
Ágar	20,0

Tabela 2 - Composição do meio Melaço-Sacarose (MS) para preparação do inóculo da cultura bacteriana (pH=6,5).

Componente	Concentração (g L ⁻¹)
Melaço	50,0
Sacarose comercial	75,0
K ₂ HPO ₄	1,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0
Extrato de levedura	1,5
Peptona	1,5

Tabela 3 - Composição do meio MBP-Sacarose para crescimento do micro-organismo (pH=6,5).

Componente	Concentração (g L ⁻¹)
Sacarose comercial	100,0
K ₂ HPO ₄	1,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0
Extrato de levedura	1,5
Peptona	1,5
Ágar	20,0

Tabela 4 - Composição do meio MBP-Glicose para crescimento do micro-organismo (pH=6,5).

Componente	Concentração (g L ⁻¹)
Glicose	100,0
K ₂ HPO ₄	1,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0
Extrato de levedura	1,5
Peptona	1,5
Ágar	20,0

Tabela 5 - Composição do meio MBP-Fructose para crescimento do micro-organismo (pH=6,5).

Componente	Concentração (g L ⁻¹)
Frutose	100,0
K ₂ HPO ₄	1,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0
Extrato de levedura	1,5
Peptona	1,5
Ágar	20,0

Tabela 6 - Composição do meio MBP-Glicose/Fructose para crescimento do micro-organismo (pH=6,5).

Componente	Concentração (g L ⁻¹)
Frutose	50,0
Glicose	50,0
K ₂ HPO ₄	1,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0
Extrato de levedura	1,5
Peptona	1,5
Ágar	20,0

Tabela 7 - Composição do meio BHI líquido para crescimento do micro-organismo e extração de DNA (pH=7,4).

Componente	Concentração (g L ⁻¹)
Infusão cérebro-coração	17,5
Peptona	10,0
Dextrose	2,0
NaCl	5,0
Na ₂ HPO ₄	2,5

ANEXO B – Tampões utilizados para extração de DNA

Tabela 8 - Composição do tampão TAS.

Componente	Volume (ml)
Tris-HCl 50mM	2,5
EDTA 50mM	5,0
NaCl 150mM	1,5
H ₂ O destilada	41,0

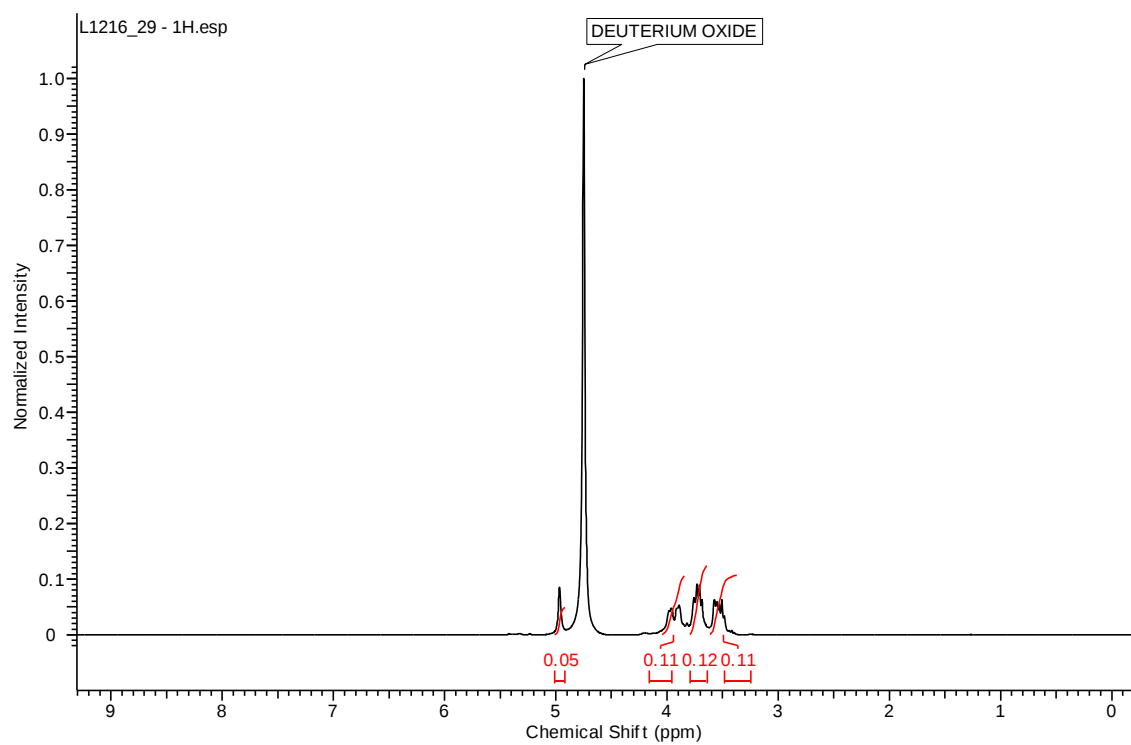
Tabela 9- Composição do tampão TE.

Componente	Volume (ml)
Tris HCl 10mM	1,0
EDTA 1mM	0,2
H ₂ O deionizada	98,8

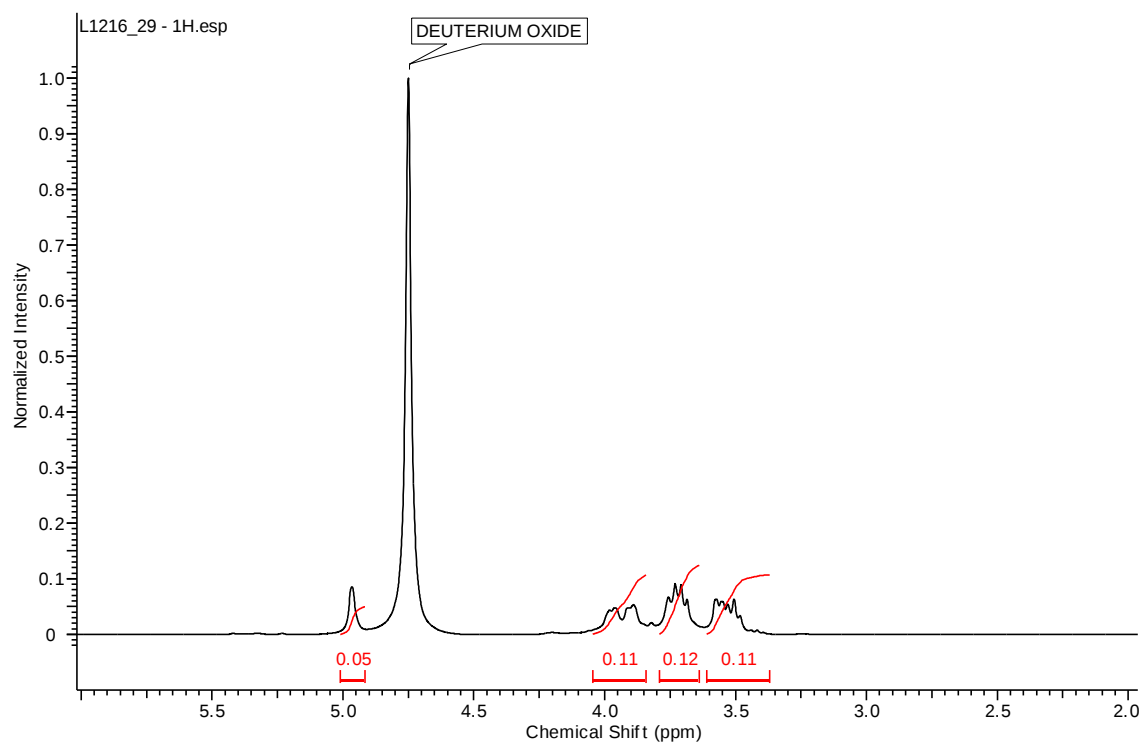
Tabela 10 – Composição do tampão de amostra para DNA.

Componente	Quantidade
Glicerol 30%	3,0 ml
Azul de bromofenol	25 mg
H ₂ O deionizada	10 ml

APÊNDICE A – Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Próton (^1H) do polímero isolado



APÊNDICE B - Ampliação do Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Próton (^1H) do polímero isolado



APÊNDICE C – Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono (^{13}C) do polímero isolado

