



Universidade Norte do Paraná

UNOPAR

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO LEITE

SIBELE CAMILO CARDOSO

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE
EXOPOLISSACARÍDEOS EM IOGURTE NATURAL**

Londrina
2012

SIBELE CAMILO CARDOSO

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE
EXOPOLISSACARÍDEOS EM IOGURTE NATURAL**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Lina Casale Aragon Alegro

LONDRINA
2012

SIBELE CAMILO CARDOSO

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE
EXOPOLISSACARÍDEOS EM IOGURTE NATURAL**

Dissertação aprovada em 04 de junho de 2012, pela banca examinadora constituída pelos professores:

Profa. Dra. Lina Casale Aragon Alegro
Universidade Norte do Paraná

Profa. Dra. Cíntia Hoch Batista de Souza
Universidade Norte do Parana

Profa. Dra. Marcela de Rezende Costa
Universidade Federal do Mato Grosso do Sul

Aos meus pais...

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado forças para superar todas as dificuldades pelas quais estou passando e, ainda assim, concluir este trabalho;

À Profa. Lina Casale Aragon Alegro, pelo incentivo, pela amizade e apoio nos momentos difíceis, e acima de tudo, por sua orientação que me possibilitou desenvolver este trabalho com segurança e tranquilidade;

À Profa. Dra. Marcela de Rezende Costa, pelo apoio e incentivo dados para a execução deste trabalho;

Ao amigo Alisson Santana, uma pessoa imprescindível para realização deste trabalho;

Aos amigos Edson Honjoya e Mariana Shibayama Fernandes pela colaboração nas análises, nas produções e sempre que foi preciso;

Aos amigos Osney Inay e Priscila Costa, pelo apoio, colaboração e amizade nos momentos difíceis;

À amiga Alessandra Bosso, por seu carinho, amizade e apoio, uma querida amiga;

À todos, que nesta hora me falha a memória, mas que ajudaram direta ou indiretamente na execução deste trabalho;

Aos meus pais, sem eles não teria conseguido me levantar, talvez nem estaria escrevendo este agradecimento hoje. É para eles e por eles que me levantei, e agora sigo em frente. Obrigada pai, te amo! Obrigada mãe, te amo!

“Hoje levantei cedo pensando no que tenho a fazer antes que o relógio marque meia noite. É minha função escolher que tipo de dia vou ter hoje. Posso reclamar porque está chovendo ou agradecer às águas por lavarem a poluição. Posso ficar triste por não ter dinheiro ou me sentir encorajado para administrar minhas finanças, evitando o desperdício. Posso reclamar sobre minha saúde ou dar graças por estar vivo. Posso me queixar dos meus pais por não terem me dado tudo o que eu queria ou posso ser grato por ter nascido. Posso reclamar por ter que ir trabalhar ou agradecer por ter trabalho. Posso sentir tédio com o trabalho doméstico ou agradecer a Deus. Posso lamentar decepções com amigos ou me entusiasmar com a possibilidade de fazer novas amizades. Se as coisas não saírem como planejei posso ficar feliz por ter hoje para recomeçar. O dia está na minha frente esperando para ser o que eu quiser. E aqui estou eu, o escultor que pode dar forma. Tudo depende só de mim.”

Charles Chaplin

RESUMO

Os exopolissacarídeos (EPS) são gomas hidrossolúveis que podem ser adicionados em vários produtos, especialmente em leites fermentados, atuando como agentes de viscosidade, estabilizantes, emulsificantes ou geleificantes. Em iogurtes e leites fermentados, os EPS promovem aumento da viscosidade, melhora na consistência, textura e diminuição da sinérese. Recentemente, além da aplicação tecnológica, os EPS produzidos por bactérias lácticas vêm sendo investigados quanto à sua ação benéfica à saúde, como proteção contra úlceras gástricas, efeito prebiótico, redução do colesterol sanguíneo, capacidade de modulação do sistema imune e atividade antitumoral. Assim, o objetivo dessa pesquisa foi otimizar a produção de exopolissacarídeos por *Streptococcus thermophilus* em iogurte natural, visando o desenvolvimento de um produto com boas características tecnológicas. Com esse objetivo, foram realizados 11 experimentos, variando-se a concentração de dois açúcares: glicose e frutose. Foi utilizado um delineamento experimental central, composto por três pontos centrais e quatro axiais. Os iogurtes produzidos foram avaliados quanto ao tempo de fermentação e, após 1, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento sob refrigeração, foram analisados quanto à viabilidade microbiana, a capacidade de retenção de água, pós-acidificação, viscosidade e quantificação de EPS. Os resultados foram analisados por regressão linear múltipla, utilizando-se o programa Statistica. Os dados obtidos apontam que há influência da glicose, mas não da frutose, na multiplicação de *S. thermophilus* e, conseqüentemente, na produção de exopolissacarídeos. Quando adicionadas concentrações de glicose abaixo de 3,2 % ou acima de 6,2%, houve maior multiplicação de *S. thermophilus* e maior produção de EPS, independentemente da concentração de frutose usada. Além disso, quando se compara as concentrações de EPS nos iogurtes adicionados e sem adição de glicose e frutose, este parâmetro é pelo menos 2 vezes menor neste último, indicando que a glicose e a frutose, ou pelo menos um deles, estimularam a produção de EPS.

ABSTRACT

Exopolysaccharides (EPS) are water-soluble gums which may be added in various products, particularly fermented milks, acting as viscosity, stabilizers, emulsifying or gelling agents. In yoghurt and fermented milk, EPS further increase in viscosity, improve consistency, texture and decrease syneresis. Recently, in addition to technological application, EPS produced by lactic acid bacteria have been investigated for their beneficial effects to health, protecting against gastric ulcers, prebiotic effect, reducing blood cholesterol, ability to modulate the immune system and antitumoral activity. The objective of this research was to optimize the production of exopolysaccharides by *Streptococcus thermophilus* in yoghurt, developing a product with good technological characteristics. With this objective, we performed 11 experiments, varying the concentration of two sugars: glucose and fructose. We used an experimental design center composed of three central points and four axial ones. The yogurts produced were evaluated to fermentation time, and after 1, 7, 14, 21 and 28 days of storage under refrigeration, they were analyzed for microbial viability, water holding capacity, acidification, viscosity and EPS quantification. Results were analyzed by multiple linear regression, using Statistica. The data obtained indicate that there is an influence of glucose but not fructose, on the growth of *S. thermophilus*, and consequently, on the exopolysaccharides production. When added glucose concentrations below 3.2% or above 6.2%, we observed a greater growth of *S. thermophilus* and higher production of EPS, regardless of the concentration of fructose used. In addition, comparing the concentrations of EPS on yoghurts with and without the addition of glucose and fructose, this parameter is at least 2 times lower in the latter, indicating that glucose and fructose, or at least one of them stimulated the production of EPS.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1 Exopolissacarídeos.....	12
2.2 Produção de Exopolissacarídeos.....	14
2.3 Iogurte.....	20
3 ARTIGO.....	24
4 CONCLUSÃO.....	47
5 REFERÊNCIAS.....	48

1 INTRODUÇÃO

Os exopolissacarídeos (EPS) são gomas hidrossolúveis que possuem propriedades físicas, químicas e estruturais diferentes devido à variedade de micro-organismos produtores (SOUZA; CRUZ, 2004).

Dependendo da composição química do EPS formado, este pode ser classificado como homopolissacarídeo ou heteropolissacarídeo. Os primeiros são formados por um único tipo de monossacarídeo, sendo os mais comuns, a glicose e a frutose, além de apresentarem sua cadeia principal com graus variáveis de ramificações e sítios de ligações. Os heteropolissacarídeos são constituídos por repetidas unidades de diferentes monossacarídeos, geralmente com a combinação D-glicose, D-galactose e L-ramnose, além de outras moléculas orgânicas e inorgânicas (MONSAN et al., 2001; DE VUYST et al., 2001; BROADBENT et al., 2003; RUAS-MADIEDO e REYES-GAVILÁN, 2005). Os heteropolissacarídeos são comumente produzidos por algumas culturas “starter” de iogurtes (RICCIARDI et al., 2002; De VUYST et al., 2003).

Os polissacarídeos microbianos possuem muitas aplicações nas indústrias de alimentos, farmacêutica, petrolífera, cosmética, têxtil, de tintas e de produtos agrícolas, entre outras. Nas indústrias de alimentos, os EPS têm sido vistos como uma importante fonte industrial de material polimérico, que pode competir, sob o ponto de vista econômico, com gomas naturais de algas marinhas e plantas (LOPES; ANDRADE; MANO, 1991; LOPES; ANDRADE, 1995). Estes biopolímeros podem ser utilizados pelas indústrias alimentícias em vários produtos, como iogurtes e leites fermentados, atuando como estabilizantes, melhorando sua viscosidade (De VUYST; DEGEEST, 1999; RUAS-MADIEDO et al., 2002) e servindo como uma interessante alternativa aos estabilizantes convencionais (CERNING, 1990).

Atualmente, os EPS produzidos por bactérias ácido lácticas, têm sido alvo de interesse das indústrias alimentícias e farmacêuticas, por resultar em um produto final natural e saudável, já que a presença de EPS dispensa o uso de estabilizantes, emulsificantes, texturizantes, geleificantes e outros

aditivos não naturais (LEROY; VUYST, 2004; SARANGUI et al., 2006 ; LIN; CHANG CHIEN, 2007). De acordo com Laws e Marshall (2001), a ação dos exopolissacarídeos, ligando as bactérias à matriz protéica mucóide, resulta na ampliação do comportamento viscoso do produto.

As bactérias ácido lácticas, principais produtoras de exopolissacarídeos, pertencem aos gêneros *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Bifidobacterium* (MONSAN et al., 2001;. WALLING et al., 2005; KORAKLI; VOGEL, 2006; WERNING et al., 2006).

Além disso, os exopolissacarídeos apresentam propriedades benéficas à saúde (RUAS MADIEDO; REYES-GAVILÁN, 2005; LIN; CHANG CHIEN, 2007). Estudos realizados em ratos indicaram que os EPS podem ter atividade prebiótica, imunoestimulatória e imunomoduladora, incluindo ativação da atividade de macrófagos e linfócitos (HOSONO et al., 1997), antitumoral (KITAZAWA et al., 1991), e também na redução dos níveis de colesterol sanguíneo (NAKAJIMA et al., 1992). Assim, os EPS obtidos a partir das bactérias lácticas têm potencial para serem explorados como aditivos alimentares ou como ingredientes em alimentos funcionais, com vantagens econômicas e para a saúde (SUTHERLAND, 1999; De VUYST et al., 2001).

Por todas as vantagens do uso de polissacarídeos, a produção anual destes, em indústrias dos Estados Unidos, é de cerca de 3 milhões de toneladas. Além disso, apresentam uma taxa de crescimento de aproximadamente 3% ao ano, sendo o valor deste mercado superior a 3 trilhões de dólares (ZOHURIAAN; SHOKROLAHI, 2004).

Com isso, neste trabalho, buscou-se otimizar a produção de exopolissacarídeos em iogurte natural, visando o desenvolvimento de um produto com boas características tecnológicas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 EXOPOLISSACARÍDEOS

Os exopolissacarídeos (EPS) são definidos como polissacarídeos extracelulares, produzidos por alguns fungos e bactérias durante o processo de fermentação (KANG e COTTRELL, 1979). Estes polímeros possibilitam ao micro-organismo aderência e colonização de superfícies sólidas, onde há acúmulos de nutrientes (COSTERTON et al., 1987).

Estes polímeros protegem a célula do dessecamento e de outros estresses causados pelo ambiente, podem ainda colaborar com a fixação de minerais e nutrientes próximos a célula da bactéria (SUTHERLAND, 1988; WHITFIELD, 1988; WEINER., et al., 1995).

Os EPS de origem microbiana podem permanecer ligados à parede celular formando cápsulas ao redor da célula, ou serem excretados para fora da parede celular, como uma camada viscosa secretada no ambiente (MARGARITIS; PACE, 1985; DE VUYST; DEGEEST, 1999; RUAS MADIEDO et al., 2002; BROADBENT et al., 2003; RUAS MADIEDO e REYES-GAVILAN, 2005). A produção do EPS pelo micro-organismo pode produzir mudanças no meio de cultivo utilizado, resultando em aumento da viscosidade e mudanças na reologia da fermentação, desde um fluido Newtoniano de baixa viscosidade até um fluido não – Newtoniano de alta viscosidade (CORRADI da SILVA et al., 2006).

Estes exopolissacarídeos são gomas hidrossolúveis que possuem propriedades físicas, químicas e estruturais diferentes devido à variedade de micro-organismo produtor e devido a esta ampla diversidade os EPS possuem muitas aplicações em diversos ramos da indústria (SOUZA e CRUZ, 2004). Estes biopolímeros emergiram rapidamente no setor industrial e começaram a competir, sob o ponto de vista econômico, com outros tipos de material polimérico, como as gomas naturais de algas marinhas e de plantas (LOPES; ANDRADE; MANO, 1991; LOPES; ANDRADE, 1995).

Estes biopolímeros podem ser utilizados pelas indústrias alimentícias em vários produtos, como iogurtes e leites fermentados, atuando como estabilizantes, melhorando a viscosidade (De VUYST; DEGEEST, 1999; RUAS-MADIEDO et al., 2002) e servindo como uma interessante alternativa aos estabilizantes convencionais (CERNING, 1990).

Dependendo da composição química do exopolissacarídeo formado, este pode ser classificado como homopolissacarídeo ou heteropolissacarídeo. Os homopolissacarídeos são formados por um único tipo de monossacarídeo, sendo os mais comuns a glicose e a frutose, e tem sua cadeia principal com graus variáveis de ramificações e sítios de ligações. Os heteropolissacarídeos são constituídos por repetidas unidades de diferentes monossacarídeos, geralmente com a combinação D-glicose, D-galactose e L-ramnose, podendo ainda ter casos que aparecem N-acetilglicosamina, N-acetilgalactosamina, ácido glucurônico e outras moléculas orgânicas e inorgânicas (MONSAN et al., 2001; DE VUYST et al., 2001; BROADBENT et al., 2003; RUAS-MADIEDO e REYES-GAVILÁN, 2005).

Os heteropolissacarídeos são comuns em culturas “starters” de iogurtes; consistem de uma sequência de subunidades de três a oito monossacarídeos, como galactose, glicose e ramnose (URASHIMA et al., 1999; RICCIARDI; CLEMENTI, 2000; LAWS; MARSHALL, 2001; RICCIARDI et al., 2002; De VUYST et al., 2003).

Atualmente os EPS resultantes da produção por bactérias ácido lácticas, têm sido alvo de interesse das indústrias alimentícias e farmacêuticas, por resultar em um produto final seguro, natural e saudável, já que a presença de EPS dispensa o uso de estabilizantes, emulsificantes, texturizantes, geleificantes e outros aditivos não naturais (LEROY e VUYST, 2004; SARANGUI ET AL., 2006 ; LIN e CHANG CHIEN, 2007). Laws e Marshall (2001) mencionaram que a ação dos exopolissacarídeos, ligando as bactérias mucoídes à matriz proteica resulta na ampliação do comportamento viscoso do produto.

As bactérias ácido lácticas, principais produtoras de exopolissacarídeos pertencem aos gêneros *Streptococcus*, *Lactobacillus*,

Lactococcus, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Bifidobacterium* (MONSAN et al., 2001; WALLING et al., 2005; KORAKLI e VOGEL, 2006; WERNING et al., 2006).

Além disso, os exopolissacarídeos podem apresentar propriedades benéficas à saúde (RUAS MADIEDO e REYES- GAVILÁN, 2005; LIN e CHANG CHIEN, 2007). Estudos realizados em ratos indicaram que os EPS podem ter atividade prebiótica, imunoestimulatória, imunomodulação, incluindo ativação da atividade de macrófagos e linfócitos (HOSONO et al., 1997), antitumoral (KITAZAWA et al., 1991), e também na redução dos níveis de colesterol sanguíneo (NAKAJIMA et al., 1992). Assim, os EPS obtidos a partir das bactérias lácticas têm potencial para serem explorados como aditivos alimentares ou como ingredientes em alimentos funcionais, com vantagens econômicas e para a saúde (SUTHERLAND, 1999; De VUYST et al., 2001).

Por todas as vantagens do uso de polissacarídeos, o consumo anual destes, em indústrias dos Estados Unidos é de cerca de 3 milhões de toneladas e vem apresentando uma taxa de crescimento de aproximadamente 3% ao ano, sendo o valor deste mercado superior a 3 trilhões de dólares (ZOHURIAAN; SHOKROLAHI, 2004).

2.2 PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS

A capacidade de produzir exopolissacarídeos é facilmente encontrada em diferentes espécies microbianas, especialmente os procariontes. A grande maioria destes polissacarídeos pode ser útil para as indústrias, entretanto vários fatores dificultam sua comercialização como a possibilidade da bactéria ser patogênica, o alto custo da produção, e aceitabilidade, entretanto vários exopolissacarídeos produzidos por bactérias Gram- Negativas já foram bastante estudadas, são economicamente viáveis e tem sido muito utilizado como as gomas xantana e gelana (SUTHERLAND, 2001).

Para a produção dos exopolissacarídeos, podem ser utilizados diversos tipos de fonte de carbono como substrato como: glicose, frutose,

lactose entre outros. O tipo de micro-organismo utilizado e a fonte de carbono determinam o custo da produção (MARGARITIS; PACE, 1985).

Os microrganismos que produzem grandes quantidades de exopolissacarídeos têm maior potencial para comercialização, considerando ser um processo mais simples a recuperação dos EPS do meio de fermentação (MARGARITIS et al., 1985). A produção dos EPS por culturas lácticas mostrou-se diretamente influenciada pelo meio de crescimento disponível às bactérias, especialmente em relação às fontes de carbono e nitrogênio, minerais e vitaminas (MACEDO et al., 2002; RUAS-MADIEDO et al., 2002; DUEÑAS et al., 2003).

A xantana é o polímero mais estudado e utilizado, e o seu uso por indústrias alimentícias foi aprovado pela “Food and Drug Administration” (FDA), em 1969 (FDA, 1969). É também muito utilizada em indústrias farmacêuticas, em pesticidas agrícolas, fabricação de tintas e indústria têxtil devido a sua alta viscosidade, boa estabilidade em ampla faixa de pH, temperatura e força iônica (PASQUEL, 1999). A produção desta goma é feita pela linhagem de *Xanthomonas campestris* utilizando como fonte de carbono o xarope de glicose, derivados de amônia como fonte de nitrogênio, crescimento em condições anaeróbias a 28°C e agitação constante. Após a fermentação, a goma é extraída por precipitação em etanol, seca e moída (COTTRELL; KANG; KOVACS, 1980).

Outro polissacarídeo importante é a gelana, este tem sido apontado como um dos biopolímeros mais eficientes desenvolvidos até o momento foi aprovado pela FDA em 1992, e é produzido pela bactéria *Pseudomonas elodea* (PSZCZOLA, 1993).

O processo de produção de exopolissacarídeos é bem complexo, pois deve ser considerados diversos fatores que afetam diretamente a produção, como, a espécie microbiana utilizada, a composição do meio de cultivo, pH, disponibilidade das fontes de carbono e a temperatura de incubação. Estes fatores afetam diretamente a síntese, o rendimento e a composição dos exopolissacarídeos (FARIA, 2002; NAMPOOTHIRI et al., 2003).

As fontes de carbono são convertidas, durante o processo de fermentação, em biopolímeros. Concentrações limitantes de alguns nutrientes e o excesso de carboidratos favorecem a produção de exopolissacarídeos (SUTHERLAND, 1979). Quando ocorre conversão de 70-80% das fontes de carbono em polímero, considera-se que houve um bom rendimento no processo produtivo (MARGARITIS; PACE, 1985). A temperatura de incubação do meio é considerada um fator crítico na síntese dos EPS, crescimento maiores são encontrados em processos fermentativos ocorridos na faixa de temperatura 25-35°C, onde cada espécie apresenta sua temperatura ótima (KAWAI et al., 1992; GANDHI; RAY; PATEL, 1997; VERMANI; KELKAR; KAMAT, 1995)

As fontes de carboidratos como glicose e lactose influenciam na produção de EPS. Entretanto, não somente fontes naturais de carbono, mas combinações de monossacarídeos podem estimular a biossíntese de EPS (GAMAR; BLONDEAU; SIMONET, 1997; DEGGEST; De VUYST., 2000).

A biossíntese de EPS bacterianos é bastante complexa. Os genes que codificam as enzimas e proteínas regulatórias requeridas para a síntese de EPS têm origem plasmidial em cepas de bactérias lácticas mesofílicas, como *Lactococcus*, ou cromossômica, em cepas termofílicas de *Streptococcus* e *Lactobacillus* (VAN KRANENBURG et al., 1997; STINGELE et al., 1999; LAWS; MARSHALL, 2001). A via biossintética pode ser dividida em 4 sequências de reações separadas: as reações envolvidas com o transporte de açúcar para o citoplasma, a síntese de açúcar-1-fosfato, ativação e ligação de açúcares, e os processos envolvidos na secreção dos EPS (KLEEREBEZEM; HOLS; HUGENHOLTZ, 2000; De VUYST et al., 2001; LAWS et al., 2001). A produção de EPS pode ocorrer durante todo o crescimento bacteriano, durante a fase logarítmica e, para algumas bactérias, continua durante a fase estacionária de crescimento (DE SOUZA; SUTHERLAND, 1994 ,LAWS et al., 2001).

Após a polimerização das unidades repetidas de açúcar, o estágio final é a excreção do exopolissacarídeo na membrana citoplasmática, envolvendo passagem pelo peritoplasma, pela membrana e por último sua

excreção para o ambiente extracelular (SUTHERLAND, 2001). Já no exterior da célula os exopolissacarídeos podem permanecer soltos, como um muco viscoso, ou ligados covalentemente na superfície da célula, a um fosfodiéster ou a um lipídio, podendo formar capsulas que podem aderir firmemente a superfície (SILVA et AL, 2001; WHITFIELD; ROBERTS, 1999).

Muitas pesquisas tem tentado elucidar a produção dos exopolissacarídeos, pesquisando as condições de crescimento e a fisiologia bacteriana (SOUZA; GARCIA-CRUZ, 2004). Muitas vezes a produção é induzida pela limitação de um nutriente essencial, que não seja fonte de energia como o carbono. A relação C:N é considerada a condição ambiental mais significativa para uma boa produção dos exopolissacarídeos (NAMPOOTHIRI et al., 2003).

As condições de fermentação influenciam fortemente a produção de EPS. Estudos sugerem que as melhores condições para a produção de EPS são diferentes da condição ótima para o crescimento celular, principalmente para bactérias lácticas mesofílicas (GAMAR et al., 1997). A temperatura ótima para a síntese de EPS já foi determinada para algumas bactérias lácticas e pode variar de 25 °C, para *Lactococcus lactis*, até temperaturas acima de 45 °C, para *L. delbrueckii* (CERNING et al., 1994; LAWS et al., 2001). O efeito do pH na produção de EPS está relacionado à atividade das enzimas glicosil-hidrolases, responsáveis pela degradação de EPS após fermentações longas. Como a degradação de EPS não é desejável, a influência que o pH do meio tem sobre o rendimento de EPS depende do pH ótimo para a atividade das glicosil-hidrolases. O pH ótimo para a produção de EPS será o pH no qual os efeitos opostos de produção e degradação estejam balanceados (PHAM et al., 2000; LAWS et al., 2001; DEGEEST, MOZZI e VUYST, 2002; RUAS-MADIEDO, ALTING e ZOON, 2005).

Durante a síntese de exopolissacarídeos pode haver presença de polissacarases específicas ou polissacarídeo-liases que degradam o exopolissacarídeo produzido. Caso ocorra lise da célula bacteriana durante o cultivo, as enzimas podem ser liberadas para o meio extracelular podendo

degradar o material formado e a redução da massa (CONTI et al., 1994; SUTHERLAND; KENNEDY, 1996).

A produção de exopolissacarídeos bacterianos em cultivo submerso é frequentemente acompanhada por um substancial aumento da viscosidade do caldo fermentado, o qual resulta em irregular distribuição do oxigênio no meio. Sob estas condições, o oxigênio disponível pode tornar-se o fator limitante para o metabolismo celular e, assim, afetar negativamente a síntese e a qualidade dos EPS (WECKER; ONKEN, 1991). Fermentações no estado sólido têm sido sugeridas como uma alternativa à fermentação submersa, a fim de prevenir os problemas relacionados à viscosidade do meio de cultura. Outra vantagem da fermentação no estado sólido é que os substratos que podem ser usados neste processo podem ser mais baratos e facilmente disponíveis, como os subprodutos da agricultura e da indústria de alimentos (STREDANSKY et al., 1999).

A exploração comercial dos exopolissacarídeos como materiais para melhorar a textura e o sabor de alimentos requer a síntese de EPS com propriedades físicas adequadas e em quantidades suficientes para atender a demanda. Um dos principais problemas observados é o baixo nível de produção, que pode variar de poucos miligramas a aproximadamente 1 g/L. (De VUYST et al., 2001; LAWS et al., 2001) O aumento da produção de EPS pode ser alcançado através de manipulação genética ou pelo controle da fisiologia microbiana, modificando a direção das rotas metabólicas (De VUYST E DEGEEST, 1999; BOELS, et al., 2001; LAWS et al., 2001).

Algumas bactérias ácido lácticas (BAL) podem ser produtoras de exopolissacarídeos extracelulares e são economicamente viáveis pois podem conferir vantagens tecnológicas e terapêuticas ao produto formado (LOOIJESTEIJN et AL., 2001; WELMAN; MADDOX, 2003). Os EPS de bactérias lácticas têm apresentado bons resultados no aprimoramento da reologia, textura e corpo dos produtos lácticos fermentados, em especial o iogurte. Esses exopolissacarídeos geralmente apresentam cadeias longas e ramificadas, com repetições de monossacarídeos, principalmente glicose, manose, galactose, ácido glucurônico e com menor frequência ramnose, em

diferentes proporções ou derivados destes açúcares (McKELLAR; GEEST; CUI, 2003; WELMAN; MADDOX, 2003).

Na indústria alimentícia, os EPS produzidos por bactérias do grupo ácido lácticas são usados como agentes espessantes, estabilizantes ou emulsificantes para modificar as propriedades reológicas e de textura dos produtos. O uso de linhagens produtoras de exopolissacarídeos recebeu maior atenção nos últimos anos por se tratar de fonte natural de bioespessantes alimentícios (DE VUYST et al., 2003; RUAS-MADIEDO e REYES-GAVILÁN, 2005; SVENSSON et al., 2005). LAWS e MARSHALL (2001) mencionaram que a ação dos exopolissacarídeos, ligando as bactérias mucoídes à matriz proteica resulta na ampliação do comportamento viscoso do produto. Outra característica interessante é que alguns exopolissacarídeos produzidos por bactérias ácido lácticas parecem trazer benefícios para a saúde humana, mediante efeitos hipocolesterolêmico e prebióticos, imunomodulação (incluindo ativação da atividade de macrófagos e linfócitos) e atividade anticarcinogênica (RUAS-MADIEDO e REYESGAVILÁN, 2005; LIN e CHANG CHIEN, 2007).

As principais linhagens de bactérias do grupo ácido lácticas capazes de produzir exopolissacarídeos pertencem aos gêneros *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* e *Pediococcus*. Também já se verificou que algumas linhagens do gênero *Bifidobacterium* podem produzir esses biopolímeros (RUAS-MADIEDO e REYES-GAVILÁN, 2005).

O tempo de fermentação aparenta ser um dos parâmetros ambientais mais críticos que afetam o teor, a massa molar e a composição de açúcares do exopolissacarídeo (LIN e CHANG CHIEN, 2007). Dependendo da linhagem, a síntese de exopolissacarídeo pelas bactérias ácido lácticas pode ou não estar associada ao crescimento. A produção de exopolissacarídeo depende de fatores como: a composição do meio (como fonte de carbono/nitrogênio), condições de crescimento da cultura (pH, temperatura, concentração de oxigênio) e do tipo de linhagem utilizada. A relação carbono/nitrogênio e a limitação dessas fontes de nutrientes também influenciam a produção diferencial de exopolissacarídeos (mais de um

polímero) pela mesma linhagem (RUAS-MADIEDO, ALTING e ZOON, 2005). No caso do *Streptococcus thermophilus* também se deve dar atenção para a organização genética dos grupos de genes EPS e às enzimas envolvidas na biossíntese e interconversão dos nucleotídeos de açúcares (precursores dos exopolissacarídeos), ou na ligação das diferentes moléculas de açúcar (glicosiltransferases) (JOLLY e STINGELE, 2001; DEGEEST, MOZZI e VUYST, 2002).

2.3 IOGURTE

No início do século XX, a teoria de Metchnikoff, denominada “Teoria da Longevidade”, atribuiu ao iogurte vários efeitos benéficos à saúde humana. Segundo ele, a longevidade dos povos dos Bálcãs era resultado de uma dieta rica em leite fermentado, contendo um lactobacilo que, por muito tempo, foi considerado como *L. bulgaricus*. Posteriormente, verificou-se que o microrganismo contido em tais produtos deveria ser o *L. acidophilus*, pela afinidade deste com o trato intestinal humano. Embora esta teoria tenha exagerado no valor do iogurte, influenciou de forma significativa na sua difusão em vários países da Europa (TAMIME; ROBINSON, 1999).

No Brasil, o aumento do consumo de iogurte começou em 1970 e continuou, com uma taxa excepcional de crescimento, devido aos mais variados produtos disponíveis comercialmente (BRANDÃO, 1987). Sabe-se, que os leites fermentados, como o iogurte provêm muitos benefícios à saúde. Os microrganismos utilizados para a obtenção destes produtos são capazes de influir positivamente sobre a microbiota intestinal, produzindo efeitos anticarcinogênicos e hipocolesterêmicos, entre outros (SABOYA; OETTERER; OLIVEIRA, 1997).

Além disso, o iogurte constitui uma rica fonte de proteínas, cálcio, fósforo, vitaminas e carboidratos, sendo o seu consumo relacionado à imagem positiva de alimentação saudável e nutritiva (TEIXEIRA et al., 2000). Assim, o consumo crescente deste produto também pode ser atribuído à preocupação das pessoas em consumir produtos naturais, e aos benefícios

que o iogurte traz ao organismo, tais como: facilitar a ação das proteínas e enzimas digestivas no organismo humano, facilitar a absorção de cálcio, fósforo e ferro, bem como ser uma forma indireta de consumir leite (FERREIRA et al., 2001).

Existem, no mercado, vários tipos de iogurte, classificados de acordo com o processo de elaboração, adição de ingredientes, composição, consistência e textura (TAMIME; DEETH, 1980; BRANDÃO, 1987):

- Iogurte tradicional (set yogurt): o processo de fermentação ocorre dentro da própria embalagem, não ocorre homogeneização e o resultado é um produto firme, mais ou menos consistente;

- Iogurte batido (stirred yogurt): o processo de fermentação ocorre em fermentadeiras ou incubadoras, com posterior quebra do coágulo;

- Iogurte líquido (fluid yogurt): o processo de fermentação é realizado em tanques; o produto final é comercializado em embalagens plásticas tipo garrafa ou do tipo cartonadas.

De acordo com a legislação brasileira o iogurte é definido como "o leite fermentado com cultivos protosimbióticos de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, os quais podem ser acompanhados, de forma complementar, de outras bactérias ácido-lácticas que, por sua atividade contribuem para a determinação das características do produto final" (BRASIL, 2000).

As bactérias lácticas são muito utilizadas nas indústrias alimentícias, pois são capazes de utilizar os açúcares ácidos orgânicos, proteínas e gorduras, contidos no meio e convertê-los em componentes que dão aroma, sabor, melhoram a textura e a viscosidade de produtos fermentados (RUAS-MADIEDO et al., 2002).

As bactérias lácticas tradicionais na fabricação de iogurtes, *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*, utilizam a lactose como substrato energético, com liberação de ácido láctico. O crescimento associado destas duas culturas resulta em menor tempo de coagulação do leite, maior

produção de ácido láctico e maior desenvolvimento de sabor e aroma no iogurte. *S. thermophilus* é muito menos acidificante que o *L. bulgaricus* (TAMIME; DEETH, 1980; SABOYA; OETTERER; OLIVEIRA, 1997).

Durante o processo fermentativo, a atividade proteolítica dos bacilos promove a liberação de pequenos peptídeos e aminoácidos, especialmente a valina, que favorece o crescimento dos cocos. Similarmente, o desenvolvimento dos cocos estimula a multiplicação dos bacilos, devido à produção de ácido fórmico, gás carbônico e à redução da quantidade de oxigênio disponível no meio (WALSTRA et al., 2001; SHAH, 2001; TAMIME; DEETH, 1980).

De acordo com Tamime e Robinson (1999), a relação ótima entre cocos e bacilos para o desenvolvimento do sabor e aroma característicos do produto é dependente das propriedades das cepas utilizadas. Um balanço adequado da cultura é importante para a obtenção de um iogurte com boas características organolépticas relativas ao sabor, aroma e textura.

A predominância de qualquer uma das espécies pode acarretar em mudanças no produto final. Os principais fatores que podem afetar o balanço adequado entre os dois microrganismos são o tempo e temperatura de incubação, e a porcentagem de microrganismo inoculada no produto. Um tempo menor de incubação resultaria em um produto com maior proporção de cocos e com um sabor fraco. Por outro lado, um tempo maior de incubação ou um resfriamento inadequado favoreceria a predominância de bacilos, resultando num produto com sabor amargo (WALSTRA et al., 1999).

A temperatura ótima de crescimento do *S. thermophilus* está na faixa de 45 °C; para *L. bulgaricus*, a temperatura ótima de crescimento está na faixa 43 °C. Quando ocorre uma associação entre *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*, a temperatura ótima de crescimento fica entre 40 – 45 °C. A coagulação do iogurte pode demorar mais que quatro horas, dependendo da porcentagem de inóculo adicionada. Após o iogurte ter atingido o pH desejável (geralmente pH 4,7), o gel é resfriado a temperatura menor que 10 °C (LUCEY; SINGH, 1998).

As bactérias tradicionais utilizadas na fermentação de iogurtes, não pertencem à flora intestinal, não são resistentes à bile e, conseqüentemente, não sobrevivem durante a passagem através do trato gastrointestinal, portanto não são consideradas como probióticas. Porém, essas bactérias possuem efeitos positivos como ação inibidora contra bactérias patogênicas no trato gastrointestinal e melhoramento da digestão da lactose devido à presença de enzima β -galactosidase nas células das bactérias tradicionais de iogurte (LOURENS-HATTINGH; VILJOEN, 2001).

3 ARTIGO

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS EM IOGURTE NATURAL

Sibele Camilo CARDOSO¹, Alisson Santana da SILVA², Edson Renato HONJOYA³, Marcela de Rezende COSTA⁴, Elsa Helena Walter de SANTANA⁵, Lina Casale ARAGON-ALEGRO^{6*}

¹Mestranda em Ciência e Tecnologia do Leite, Universidade Norte do Paraná. Av. Paris, 675, 86041-120, Londrina, PR, Brasil. E-mail: bele_cardoso@hotmail.com.

²Graduando do curso de Biomedicina, Universidade Norte do Paraná. Av. Paris, 675, 86041-120, Londrina, PR, Brasil. E-mail: alissonsantana57@hotmail.com.

³Graduando do curso de Nutrição, Universidade Norte do Paraná. Av. Paris, 675, 86041-120, Londrina, PR, Brasil. E-mail: brother_eds_@msn.com.

⁴Médica veterinária, doutora em Tecnologia de Alimentos pela Universidade Estadual de Campinas, docente da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Av. Senador Filinto Müller, 2443, Cidade Universitária, 79074-460, Campo Grande, MS, Brasil. E-mail: marcela.rezende@ufms.br.

⁵Médica veterinária, doutora em Ciência Animal pela Universidade Estadual de Londrina, docente do curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite, Universidade Norte do Paraná. Av. Paris, 675, 86041-120, Londrina, PR, Brasil. E-mail: elsahws@hotmail.com.

^{6*}Bióloga, doutora em Ciência dos Alimentos pela Universidade de São Paulo, docente do curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite, Universidade

Norte do Paraná. Av. Paris, 675, 86041-120, Londrina, PR, Brasil. RG: 26.285.095-3. CPF: 261.148.178-42. E-mail: lcalegro@yahoo.com.br (autora pra correspondência)

RESUMO

Os exopolissacarídeos (EPS) são gomas hidrossolúveis que podem ser adicionados em vários produtos, especialmente em leites fermentados, atuando como agentes de viscosidade, estabilizantes, emulsificantes ou geleificantes. Em iogurtes e leites fermentados, os EPS promovem aumento da viscosidade, melhora na consistência, textura e diminuição da sinérese. Recentemente, além da aplicação tecnológica, os EPS produzidos por bactérias lácticas vêm sendo investigados quanto à sua ação benéfica à saúde, como proteção contra úlceras gástricas, efeito prebiótico, redução do colesterol sanguíneo, capacidade de modulação do sistema imune e atividade antitumoral. Assim, o objetivo dessa pesquisa foi otimizar a produção de exopolissacarídeos por *Streptococcus thermophilus* em iogurte natural, visando o desenvolvimento de um produto com boas características tecnológicas. Com esse objetivo, foram realizados 11 experimentos, variando-se a concentração de dois açúcares: glicose e frutose. Foi utilizado um delineamento experimental central, composto por três pontos centrais e quatro axiais. Os iogurtes produzidos foram avaliados quanto ao tempo de fermentação e, após 1, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento sob refrigeração, foram analisados quanto à viabilidade microbiana, a capacidade de retenção de água, pós-acidificação, viscosidade e quantificação de EPS. Os resultados foram analisados por regressão linear múltipla, utilizando-se o programa Statistica. Os dados obtidos apontam que há influência da glicose, mas não da frutose, na multiplicação de *S. thermophilus* e, conseqüentemente, na produção de exopolissacarídeos. Quando adicionadas concentrações de glicose abaixo de 3,2 % ou acima de 6,2%, houve maior multiplicação de *S. thermophilus* e maior produção de EPS, independentemente da concentração de frutose usada. Além disso, quando se compara as concentrações de EPS nos iogurtes adicionados e sem adição de glicose e frutose, este parâmetro é pelo menos 2 vezes menor neste último, indicando que a glicose e a frutose, ou pelo menos um deles, estimularam a produção de EPS.

1 INTRODUÇÃO

Os exopolissacarídeos (EPS) são gomas hidrossolúveis que possuem propriedades físicas, químicas e estruturais diferentes devido à variedade de micro-organismos produtores (SOUZA; CRUZ, 2004).

Dependendo da composição química do EPS formado, este pode ser classificado como homopolissacarídeo ou heteropolissacarídeo. Os primeiros são formados por um único tipo de monossacarídeo, sendo os mais comuns, a glicose e a frutose, além de apresentarem sua cadeia principal com graus variáveis de ramificações e sítios de ligações. Os heteropolissacarídeos são constituídos por repetidas unidades de diferentes monossacarídeos, geralmente com a combinação D-glicose, D-galactose e L-ramnose, além de outras moléculas orgânicas e inorgânicas (MONSAN et al., 2001; DE VUYST et al., 2001; BROADBENT et al., 2003; RUAS-MADIEDO e REYES-GAVILÁN, 2006). Os heteropolissacarídeos são comumente produzidos por algumas culturas “starter” de iogurtes (RICCIARDI et al., 2002; De VUYST et al., 2003).

Os polissacarídeos microbianos possuem muitas aplicações nas indústrias de alimentos, farmacêutica, petrolífera, cosmética, têxtil, de tintas e de produtos agrícolas, entre outras. Nas indústrias de alimentos, os EPS têm sido vistos como uma importante fonte industrial de material polimérico, que pode competir, sob o ponto de vista econômico, com gomas naturais de algas marinhas e plantas (LOPES; ANDRADE; MANO, 1991; LOPES; ANDRADE, 1995). Estes biopolímeros podem ser utilizados pelas indústrias alimentícias em vários produtos, como iogurtes e leites fermentados, atuando como estabilizantes, melhorando sua viscosidade (De VUYST; DEGEEST, 1999; RUAS-MADIEDO et al., 2002) e servindo como uma interessante alternativa aos estabilizantes convencionais (CERNING, 1990).

Atualmente, os EPS produzidos por bactérias ácido lácticas, têm sido alvo de interesse das indústrias alimentícias e farmacêuticas, por resultar em um produto final natural e saudável, já que a presença de EPS dispensa o uso de estabilizantes, emulsificantes, texturizantes, geleificantes e outros aditivos não naturais (LEROY; VUYST, 2004; SARANGUI et al., 2006 ; LIN;

CHANG CHIEN, 2007). De acordo com Laws e Marshall (2001), a ação dos exopolissacarídeos, ligando as bactérias à matriz protéica mucóide, resulta na ampliação do comportamento viscoso do produto.

As bactérias ácido lácticas, principais produtoras de exopolissacarídeos, pertencem aos gêneros *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Bifidobacterium* (MONSAN et al., 2001; WALLING et al., 2005; KORAKLI; VOGEL, 2006; WERNING et al., 2006).

Além disso, os exopolissacarídeos apresentam propriedades benéficas à saúde (RUAS MADIEDO; REYES-GAVILÁN, 2006; LIN; CHANG CHIEN, 2007). Estudos realizados em ratos indicaram que os EPS podem ter atividade prebiótica, imunoestimulatória e imunomoduladora, incluindo ativação da atividade de macrófagos e linfócitos (HOSONO et al., 1997), antitumoral (KITAZAWA et al., 1991), e também na redução dos níveis de colesterol sanguíneo (NAKAJIMA et al., 1992). Assim, os EPS obtidos a partir das bactérias lácticas têm potencial para serem explorados como aditivos alimentares ou como ingredientes em alimentos funcionais, com vantagens econômicas e para a saúde (SUTHERLAND, 1999; De VUYST et al., 2001).

Por todas as vantagens do uso de polissacarídeos, a produção anual destes, em indústrias dos Estados Unidos, é de cerca de 3 milhões de toneladas. Além disso, apresentam uma taxa de crescimento de aproximadamente 3% ao ano, sendo o valor deste mercado superior a 3 trilhões de dólares (ZOHURIAAN; SHOKROLAHI, 2004).

Com isso, neste trabalho, buscou-se otimizar a produção de exopolissacarídeos em iogurte natural, visando o desenvolvimento de um produto com boas características tecnológicas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O processamento e as análises dos iogurtes foram realizados nos laboratórios do Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite, da Universidade Norte do Paraná, em Londrina - PR.

2.1 PREPARO DAS CULTURAS

As culturas *starter Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus* (YO-MIX™ 496 LYO 100 DCU, Danisco), foram obtidas na forma liofilizada, e reativadas no dia anterior à produção dos iogurtes, na proporção de 2%. Para isto, leite em pó desnatado foi reconstituído (10% p/v) em água a 80 °C, resfriado a 42 °C e adicionado da cultura liofilizada. A mistura foi incubada em estufa a 42 °C. Quando o pH 4,6 foi atingido, as culturas foram refrigeradas (4 °C) até no máximo 24 horas.

2.2 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Foram realizados onze experimentos, variando-se a concentração de açúcar (glicose e frutose), com o objetivo de maximizar a produção de exopolissacarídeos. Para isto, foi utilizado um delineamento experimental composto por três pontos centrais e quatro axiais, descrito por Barros Neto (2001). O delineamento estatístico dos experimentos, com as variáveis codificadas e originais, está apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Planejamento experimental - Matriz de ensaios para o projeto fatorial com as variáveis nas unidades codificadas e originais.

Experimento	Glicose (X1)	Frutose (X2)	Glicose (%)	Frutose (%)
1	-1	-1	3,8	3,8
2	-1	1	3,8	6,2
3	1	-1	6,2	3,8
4	1	1	6,2	6,2
5	-1,411	0	3,31	5
6	1,411	0	6,69	5
7	0	-1,411	5	3,31
8	0	1,411	5	6,69
9	0	0	5	5
10	0	0	5	5
11	0	0	5	5

2.3 PRODUÇÃO DO IOGURTE

Os iogurtes foram elaborados conforme descrito a seguir: o leite em pó integral reconstituído (Nestlé) e o leite em pó desnatado (Nestlé) foram misturados, totalizando 14% de sólidos totais. Em seguida, foram adicionados os açúcares (glicose e frutose), reconstituídos em água, nas concentrações apresentadas na Tabela 1, sob agitação constante e vigorosa. Esta mistura foi aquecida até 85 °C e mantida nesta temperatura por 20 minutos, em banho-maria. A seguir, foi resfriada em banho de gelo, até a temperatura de 43 °C, quando foram adicionadas, em condições assépticas e na proporção de 2% (v/v), as culturas *starter Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus* (YO-MIXTM 496 LYO 100 DCU, Danisco). A mistura foi dispensada em embalagens de 100 mL, previamente higienizadas, e incubadas a 42 °C. O tempo de fermentação foi calculado a partir do início da inoculação, até obter-se o valor de pH próximo a 4,6 - 4,8. Terminada a fermentação, os iogurtes foram resfriados em banho de água e gelo e, em seguida, armazenados em refrigerador à temperatura de 4 °C, durante 28 dias.

Para melhor discussão dos dados, foi elaborado também, da mesma maneira que os outros, um iogurte sem adição de glicose e frutose.

2.4 PERÍODOS DE AMOSTRAGEM

Todas as amostras foram analisadas após 1, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento a 4 °C. As análises físico-químicas foram realizadas em triplicata e as microbiológicas, em duplicata.

2.5 VIABILIDADE MICROBIANA

Alíquotas de 10 g das amostras foram transferidas para bolsas para amostragem esterilizadas, onde foram adicionados 90 mL de solução salina (0,85% p/v). A partir desta diluição, foram efetuadas diluições decimais subsequentes, utilizando-se o mesmo diluente. Todas as análises microbiológicas foram realizadas de acordo com Lima et al. (2009) e tiveram seus resultados expressos em Unidades Formadoras de Colônia por grama de produto (UFC/g).

Para a enumeração de *Streptococcus thermophilus*, as diluições decimais foram semeadas em profundidade, em ágar M17, e as colônias foram contadas após dois dias de incubação a 37 °C, em aerobiose. A população de *Lactobacillus bulgaricus* foi avaliada semeando-se as diluições decimais em profundidade, em ágar MRS acidificado até pH 5,4, com ácido acético glacial. As placas foram incubadas em aerobiose, a 37 °C, durante 72 horas.

2.6 PÓS ACIDIFICAÇÃO

O pH dos iogurtes foi medido utilizando-se potenciômetro digital (TEC-2, Tecnal). A acidez titulável foi determinada titulando-se a amostra com solução de NaOH (Merck) 0,1N, na presença do indicador fenolftaleína (AOAC, 1995).

2.7 CAPACIDADE DE RETENÇÃO DE ÁGUA (CRA)

As determinações de CRA foram realizadas segundo descrito Cayot et al. (2003), com modificações, conforme descrito a seguir. Uma alíquota de 10 g de iogurte foi centrifugada a 5000 g por 10 minutos, a 5 °C. Em seguida, o sobrenadante foi pesado para a determinação da quantidade de água excluída. A capacidade de retenção de água foi expressa em %, de acordo com a seguinte equação:

$$\text{CRA (\%)} = 100 \times (\text{massa inicial da amostra} - \text{massa do sobrenadante}) / \text{massa da amostra}.$$

2.8 QUANTIFICAÇÃO DE EPS

O procedimento usado para quantificação de EPS, baseado em Tsutsumi et al. (2009) modificado, foi realizado conforme descrito a seguir: uma alíquota de 10 g de iogurte foi centrifugada a 5000 g por 20 minutos, à 4 °C. Em seguida, o sobrenadante foi separado, adicionado de 3 volumes de álcool etílico absoluto e armazenado em refrigerador por 48 horas. Após o período de refrigeração o material foi seco em estufa a 70 °C até peso constante.

2.9 ANÁLISE DOS DADOS

Foi realizada a otimização do efeito das variáveis independentes: glicose (X1) e frutose (X2) sobre a produção de EPS, o tempo de fermentação, a capacidade de retenção de água e a pós-acidificação. Os resultados foram analisados por regressão linear múltipla, utilizando-se o programa Statistica (STATSOFT, Tulsa, USA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A figura 1 mostra os valores de pH das amostras de iogurtes de durante o processo de fermentação.

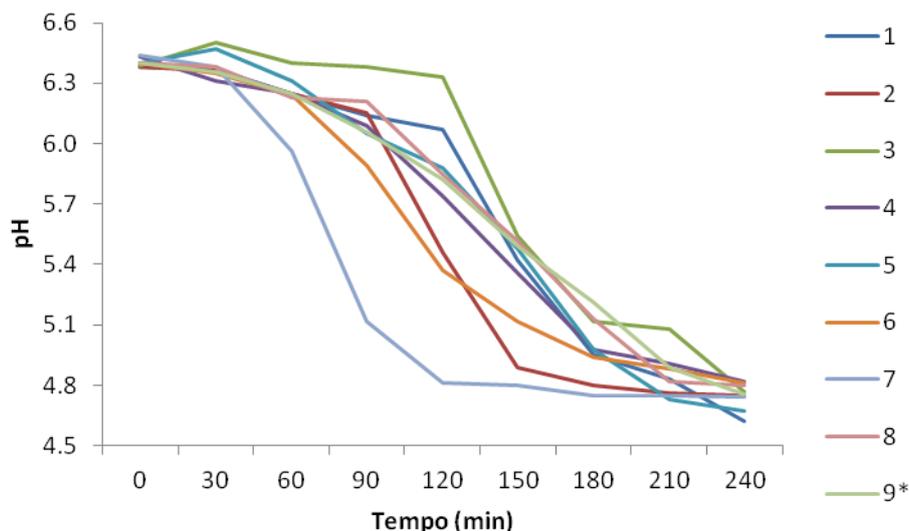


Figura 1. Valores médios de pH das amostras de iogurte durante o processo fermentativo. * média obtida a partir de 3 formulações iguais de iogurtes (ponto central).

Os valores iniciais de pH variaram de 6,38 a 6,44 e os finais, de 4,62 a 4,84. Todas as formulações apresentaram praticamente o mesmo tempo de fermentação, exceto a 7, (5,0%G; 3,31%F), que chegou ao pH desejado na metade do tempo das outras, e manteve-se constante a partir daí.

Comparando-se estes resultados com os obtidos no iogurte não adicionado de glicose e frutose, o tempo de fermentação foi semelhante em todos, com exceção do 7. A adição de 5% de glicose e 3,31 % de frutose acelerou o processo de fermentação do iogurte 7, porém, a concentração de açúcares nas outras concentrações testadas, pareceu não interferir no processo de fermentação dos iogurtes.

Inicialmente, as culturas do iogurte convertem parte da lactose em ácido láctico, originando uma diminuição do pH até um ponto em que a caseína se torna insolúvel e o leite, mais viscoso. A produção gradual de ácido láctico começa por desestabilizar os complexos de caseína e proteínas do soro desnaturadas, por solubilização do fosfato de cálcio e dos citratos. Os agregados de micelas de caseína e/ou micelas isoladas vão se associando e coalescem parcialmente, à medida em que o valor de pH se aproxima de seu ponto isoelétrico, de aproximadamente 4,6 a 4,7 (TAMIME; ROBINSON, 1991).

A tabela 1 apresenta os dados de pH, das amostras de 1 a 9 e do iogurte controle (sem adição de açúcar), durante os 28 dias de armazenamento refrigerado a 4 °C.

Tabela 1. Valores médios de pH dos iogurtes, durante os 28 dias de armazenamento.

Ensaio	1 dia	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias
1 (3,8% G; 3,8% F)	4.51	4.46	4.48	4.31	4.27
2 (3,8% G; 6,2% F)	4.78	4.65	4.42	4.45	4.42
3 (6,2% G; 3,8% F)	4.78	4.67	4.48	4.38	4.34
4 (6,2% G; 6,2% F)	4.65	4.57	4.27	4.41	4.35
5 (3,31% G; 5,0% F)	4.64	4.42	4.44	4.32	4.26
6 (6,69% G; 5,0% F)	4.58	4.53	4.23	4.36	4.33
7 (5,0% G; 3,31% F)	4.60	4.45	4.29	4.43	4.33
8 (5,0% G; 6,69% F)	4.84	4.84	4.72	4.61	4.13
9* (5,0% G; 5,0% F)	4.47	4.41	4.56	4.49	4.25
C (0% G; 0% F)	4,27	4,00	3,91	3,68	3,51

* média obtida a partir de 3 formulações iguais de iogurtes (ponto central).

O pH das amostras 1 a 9 diminuiu conforme o tempo de prateleira, mas, comparando-se com o produto que não contém açúcar, a queda dos valores foi bem maior neste último.

A diminuição nos valores de pH dos iogurtes, durante a vida-de-prateleira está relacionada à pós-acidificação dos produtos. Oliveira e Damim (2003) também observaram ligeira diminuição do pH, quando avaliaram a viabilidade de bactérias do iogurte e de culturas probióticas em leite fermentado sob refrigeração a 4 °C, durante o período de estocagem das amostras.

Neste trabalho, mesmo havendo queda do valor de pH ele não foi tão baixo. Isto é importante pois, quando o iogurte apresenta baixa acidez (pH<4,0), pode ocorrer contração do coágulo, devido à redução da hidratação das proteínas, o que leva ao dessoramento (BRANDÃO, 1995).

A tabela 2 apresenta os dados de acidez, das amostras de 1 a 9 e do controle (sem adição de açúcar), durante os 28 dias de armazenamento refrigerado a 4 °C.

Tabela 2. Valores médios de acidez dos iogurtes, em graus Dornic, durante os 28 dias de armazenamento.

	Ensaio	1 dia	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias
1	(3,8% G; 3,8% F)	77.3	86.3	92.3	91.7	107.0
2	(3,8% G; 6,2% F)	70.0	80.7	89.0	91.3	92.7
3	(6,2% G; 3,8% F)	73.0	78.3	80.0	84.7	89.7
4	(6,2% G; 6,2% F)	69.3	81.0	85.7	97.0	93.3
5	(3,31% G; 5,0% F)	73.3	83.3	91.0	92.0	94.3
6	(6,69% G; 5,0% F)	61.7	77.0	74.7	93.3	91.0
7	(5,0% G; 3,31% F)	76.0	81.7	78.7	95.0	97.7
8	(5,0% G; 6,69% F)	70.7	75.7	82.3	85.0	85.0
9*	(5,0% G; 5,0% F)	67.0	79.6	83.1	93.9	92.3
C	(0% G; 0% F)	111,7	136,2	150,0	195,8	203,5

Quanto a este fator, verificou-se aumento nos valores durante os 28 dias de armazenamento, para todos os produtos desenvolvidos. Porém, as formulações que continham açúcar não apresentaram valores tão altos como o iogurte controle. Entre as amostras com adição de açúcar, a formulação 1 (3,8% G; 3,8% F) foi a que apresentou acidez mais elevada (77,3 °D no dia 1 e 107,0 °D, no dia 28). O iogurte não adicionado de açúcares apresentou 111,67 e 203,50 °D no primeiro e no último dia, respectivamente.

L. bulgaricus é o principal responsável pela pós-acidificação dos iogurtes, mas, por outro lado, contribui consideravelmente para a produção de compostos aromáticos, especialmente o acetaldeído, característico deste alimento (GUYOT, 1992). De acordo com Tamime e Robinson (1991), o valor de pH implica na atividade metabólica das bactérias, podendo favorecer um determinado grupo, em detrimento do outro. No caso do iogurte, bactérias do

gênero *Lactobacillus* multiplicam-se e toleram valores de pH mais baixos do que as pertencentes ao gênero *Streptococcus*.

Não foi observada influência da glicose ou da frutose na população de *L. bulgaricus* no 1º dia de armazenamento. A amostra com maior crescimento desta bactéria foi o iogurte 9 (5,0% G, 5,0% F) e a com menor crescimento, a 2 (3,8% G, 6,2 % F), sendo as populações, neste dia, 5,72 e 3,00 log UFC/g, respectivamente.

A Figura 2 mostra as superfícies de respostas para a enumeração de *L. bulgaricus* em função das concentrações codificadas de glicose e frutose.

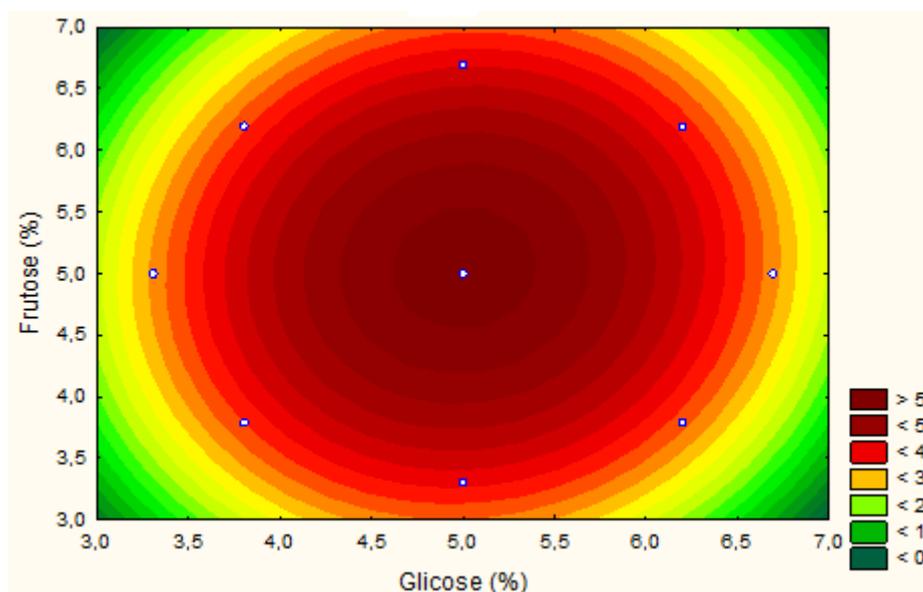


Figura 2. Superfície de respostas para enumeração de *L. bulgaricus* em iogurte natural em função das concentrações de glicose (x1) e frutose (x2).

No 28º dia de armazenamento a amostra 9 ainda apresentava a maior população (5,60 log UFC/g) e a amostra 3 (6,2% G; 3,8% F), a menor (2,15 log UFC/g). O iogurte sem adição de açúcares apresentou populações maiores de *L. bulgaricus*, sendo 7,30 log UFG/g no dia 1, e 8,85 log UFC/g no dia 28. Este resultado é interessante, uma vez que a adição de qualquer quantidade testada de glicose ou frutose parece ter inibido *L. bulgaricus*.

Segundo Lourens-Hattingh e Viljoen (2001), uma excessiva pós-acidificação ocorre, principalmente, devido ao crescimento incontrolável de

L. bulgaricus nas temperaturas de refrigeração. Portanto, as indústrias fabricantes de culturas lácticas fornecem culturas tradicionais de iogurte com uma menor concentração de *L. bulgaricus* e uma maior concentração de *S. thermophilus*. A redução na contagem de *L. bulgaricus* no produto final contribui para diminuir a pós-acidificação do iogurte durante a vida de prateleira. Isto é importante, tanto para garantir ao produto final um sabor suave, quanto para evitar efeitos adversos do pH baixo sobre os microrganismos (DAVE; SHAH, 1997).

Estudos têm mostrado que as bactérias do iogurte (*S. thermophilus* e *L. bulgaricus*) sobrevivem bem no produto durante a vida de prateleira (DONKOR et al., 2006). As altas concentrações de açúcar podem ser responsáveis pela diminuição da população de *L. bulgaricus* nos iogurtes, o que explica a menor acidez desses produtos até o final da vida de prateleira, quando comparada com o iogurte sem açúcar.

De maneira geral, o *S. thermophilus* pareceu ser influenciado pela glicose, apresentando menores populações quando este açúcar é adicionado em concentrações menores que 3,5% e maiores que 7% (Figura 3). Este dado é interessante, uma vez que o responsável pela produção de EPS nos iogurtes produzidos é justamente o *S. thermophilus*.

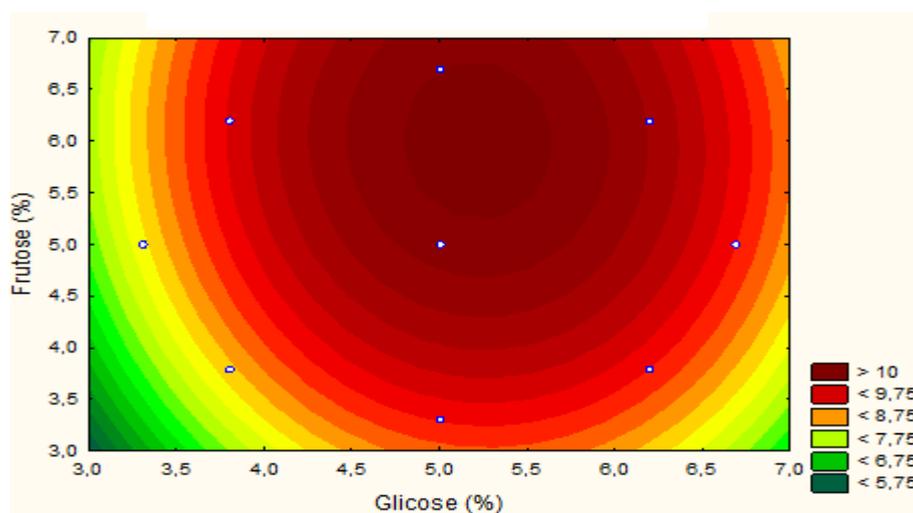


Figura 3. Superfície de respostas para enumeração de *S. thermophilus* em iogurte natural em função das concentrações de glicose (x1) e frutose (x2).

As populações de *S. thermophilus* observadas nas diferentes formulações variaram entre 8,57 e 10,47 log UFC/g, sendo que a amostra com maior população foi a 9 (5,0% G; 5,0% F) e a menor, a 3 (6,2% G; 3,8% F).

A população de *S. thermophilus* diminuiu no geral, mas manteve-se sempre acima de 7,07 log UFC/g. Nos iogurtes 8 (5,0% G; 6,69% F) e 9 (5,0% G; 5,0% F), verificou-se aumento da população deste microrganismo, de aproximadamente 2 ciclos logarítmicos. Este aumento pode ter ocorrido devido as altas concentrações de açúcares nestas formulações, principalmente da glicose.

A presença de carboidratos na mistura base pode inibir o crescimento dos microrganismos do iogurte. Estudos comprovaram uma diminuição na velocidade de produção de ácido por *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* quando se aumenta a concentração de açúcar de 6 para 12%. A inibição do crescimento das culturas do iogurte com um extrato seco total de 14 - 16%, adicionado de açúcar (10 - 12%), se deve principalmente ao efeito osmótico adverso dos solutos do leite, assim como a baixa atividade de água (TAMIME & ROBINSON, 1991).

A população do *S. thermophilus* no iogurte sem adição de açúcares, foi de 9,52 e 13,08 log UFC/g, nos dias 1 e 28, respectivamente, mostrando ter ocorrido aumento da população. Contudo, não se verificou diferenças entre a adição ou não de açúcares para a população de *S. thermophilus*.

As figuras 4a e 4b mostram as superfícies de respostas para a produção de exopolissacarídeos em função das concentrações codificadas de glicose e frutose, no primeiro e no último dia de análise, respectivamente.

Comparando-se com as concentrações de EPS presentes no iogurte sem adição de açúcar (26,24 mg/100g), verificou-se que todas as amostras que foram adicionadas de açúcar apresentaram uma maior produção de EPS, desde o primeiro dia de armazenamento refrigerado, variando entre 99,38 e 153,80 mg/100g, sendo que o iogurte 4 (6,2% G; 6,2% F) foi o que apresentou a concentração mais alta.

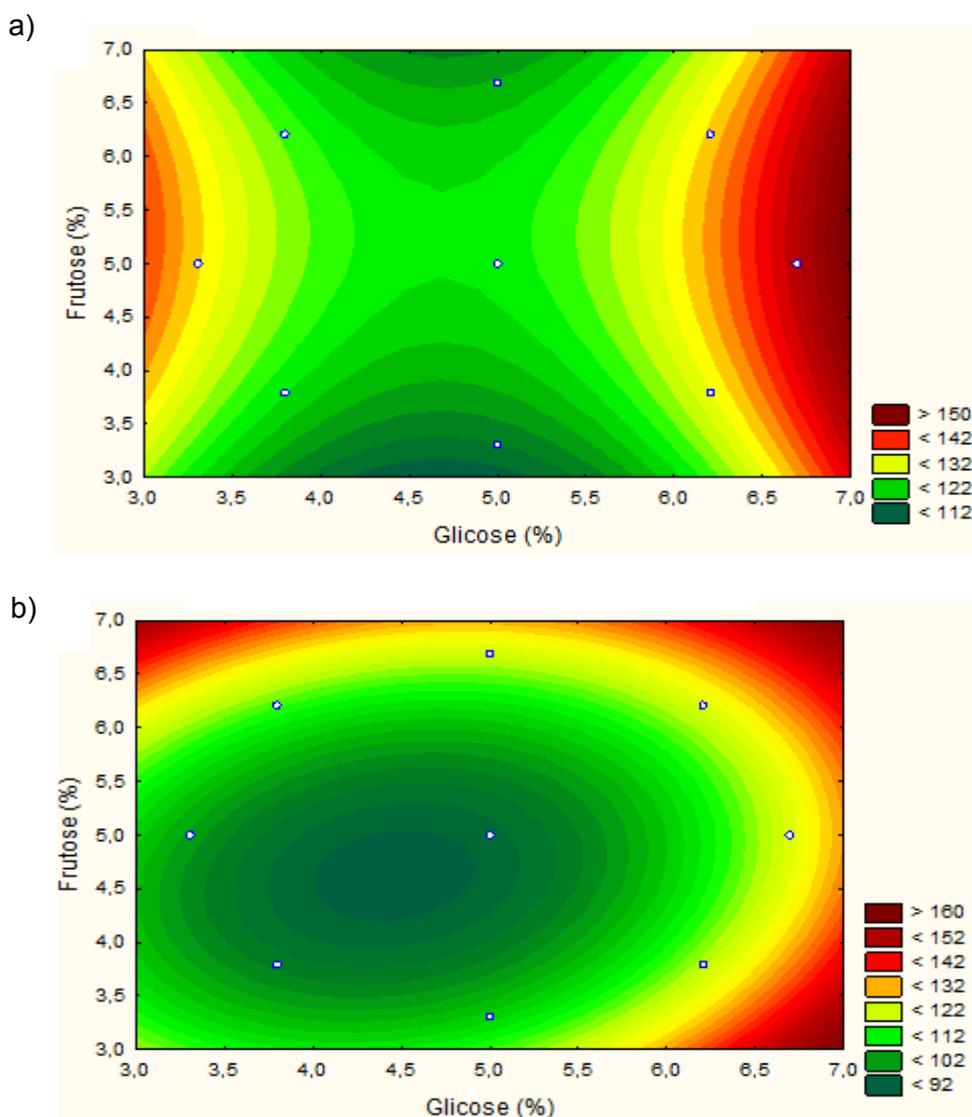


Figura 4. Superfície de respostas para produção de exopolissacarídeos em iogurte natural em função das concentrações de glicose (x1) e frutose (x2), no primeiro (a) e no último (b) dia da vida-de-prateleira.

De acordo com a figura 4a, a quantidade de glicose nas amostras influenciou a produção de EPS, da seguinte maneira: a produção é melhor em meio contendo abaixo de 3,2 ou acima de 6,2% de glicose. A frutose pareceu não ter relação com o crescimento do EPS.

Este resultado faz sentido, uma vez que já foi verificada a influência da glicose na multiplicação do *S. thermophilus*, microrganismo produtor de EPS utilizado nos iogurtes.

A concentração de EPS diminuiu durante a vida de prateleira das amostras, variando, no último dia de análise, entre 93,17 e 128,31 mg/100g, sendo o iogurte 3 (6,2% G; 3,8 F) o que continha o maior valor. O iogurte 8 (5,0% G; 6,2% F), que havia apresentado o menor valor de EPS no dia 1, foi o único que apresentou aumento desta substância durante os 28 dias. Apesar disso, o iogurte controle, sem adição de açúcar, apresentou valor de EPS bem mais baixo no 28º dia de armazenamento, de 47,64 mg/100g.

De acordo com De Vuyst e Degeest (1999) e Duboc e Mollet (2001), isto pode acontecer com modelos biológicos envolvendo microrganismos que apresentam comportamento instáveis, em que não há controle do que se pretende obter durante os processos fermentativos.

Observa-se, na figura 4b, que a quantidade de glicose nas amostras influenciou a produção de EPS, também no último dia de análise. A concentração de EPS foi maior quando utilizou-se glicose acima de 6,2%. Além disso, valores abaixo de 4% de glicose também estimularam a produção de EPS, quando existiam altas concentrações de frutose (>6%).

A produção de EPS por bactérias lácticas pode ser afetada pelas fontes de carbono utilizadas. Mozzi et al. (2001) avaliaram o efeito da galactose e glicose sobre a produção de EPS, por *Lactobacillus casei*, e verificaram que a produção do polissacarídeo foi quase duas vezes maior em meio contendo galactose do que o com glicose.

Dupont et al. (2000) não encontraram diferenças significativas na produção de EPS em meio contendo glicose ou lactose, em pH controlado e na temperatura de fermentação entre 32 e 37 °C, para três linhagens de *Lactobacillus spp.*

De acordo com a literatura, os níveis de EPS variam de 10-1000 mg/L em leite e produtos lácteos, e a quantidade de EPS produzida em leite por diferentes espécies e linhagens bacterianas varia consideravelmente dependendo dos métodos empregados para purificação do EPS, já que pode ocorrer degradação do polímero durante a manipulação, e ainda, a presença

de componentes interferentes no meio pode levar a determinações errôneas (DUBOC; MOLLET, 2001; RUAS-MADIEDO et al., 2002 ; TORINO et al., 2005).

As figuras 5a e 5b mostram as superfícies de respostas para a capacidade de retenção de água em função das concentrações codificadas de glicose e frutose, no primeiro e no último dia de análise, respectivamente.

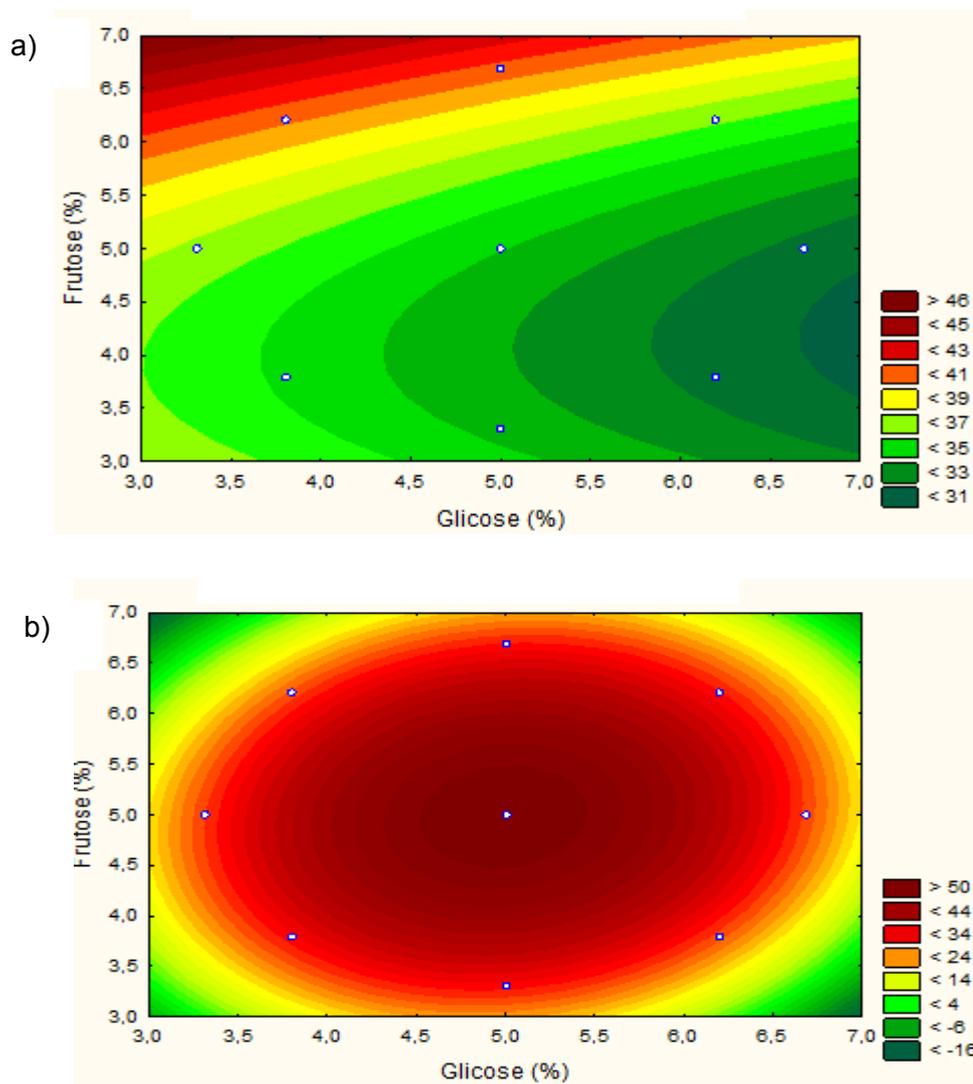


Figura 5. Superfície de respostas para a capacidade de retenção de água em iogurte natural em função das concentrações de glicose (x1) e frutose (x2), no primeiro (a) e no último (b) dia da vida-de-prateleira.

No primeiro dia de análise, observa-se, na figura 5a, que a frutose influenciou na CRA dos iogurtes, uma vez que as amostras que apresentavam concentrações de frutose acima de 6% mostraram maior CRA.

Os resultados de CRA variaram de 45,99% e 29,86% nas amostras de 1 a 9, sendo que a amostra com melhor resultado foi a 8 (5,0% G; 6,69% F). A amostra 7 (5,0% G; 3,31% F) foi a que apresentou o resultado mais baixo, comprovando que a frutose influenciou neste parâmetro no 1º dia de armazenamento.

Porém, durante a vida-de-prateleira esta influência deixou de existir. No dia 28, pode-se observar na figura 5b, que não houve influência de nenhum dos açúcares utilizados, nas concentrações testadas. Neste dia, os valores de CRA variaram entre 51,97% e 22,63%, sendo que a amostra 9 (5,0% G; 5,0% F) apresentou o melhor resultado e a amostra 2 (3,8% G; 6,2% F), o mais baixo.

A amostra 9 (5,0% G; 5,0% F) foi a única amostra que apresentou aumento da capacidade de retenção de água, durante o tempo de armazenamento.

Ruas- Madiedo et al. (2008), sugerem que a utilização de EPS em leites fermentados promove uma melhora nas propriedades do iogurte, entre elas a CRA. Porém, tal resposta não foi alcançada nas concentrações e nas condições impostas aos tratamentos utilizados neste trabalho.

De acordo com Laws e Marshall (2001), os efeitos das propriedades físicas do EPS, depende não somente da quantidade de EPS formado, mas também do conjunto de características físico-químicas do meio, dos polímeros formados e das interações dos EPS com as proteínas do leite.

4 CONCLUSÃO

Os dados obtidos apontam que há influência da glicose, mas não da frutose, na multiplicação de *S. thermophilus* e, conseqüentemente, na produção de exopolissacarídeos. Quando adicionadas concentrações de glicose abaixo de 3,2 % ou acima de 6,2%, houve maior multiplicação de *S.*

thermophilus e maior produção de EPS, independentemente da concentração de frutose usada.

Além disso, quando compara-se as concentrações de EPS nos iogurtes adicionados e sem adição de glicose e frutose, este parâmetro é pelo menos 2 vezes menor neste último, indicando que a glicose e a frutose, ou pelo menos um deles, estimularam a produção de EPS.

5 REFERÊNCIAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official Methods of Analysis**. 16.ed. AOAC, Washington, DC, 1995.

BARROS NETO, B. B., SCARMINIO, I. S., BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos**. Editora Unicamp, Campinas, SP: Editora da UNICAMP, 401p, 2001.

BRANDÃO, S. C. C. Tecnologia da fabricação de iogurte. **Revista do Instituto de Laticínios Candido Tostes**, v. 42, n. 250, p. 3-8, 1995.

BROADBENT, J.R.; MCMAHON, D.J.; WELKER, D.L.; OBERG, C.J.; MOINEAU, S. Biochemistry genetics and applications of exopolysaccharide production in *Streptococcus thermophilus*: a review. **Journal of Dairy Science**, v.86, n.2, p. 407-423, 2003.

CAYOT, P; FARAISE, J.F; COLAS, B; LORIENT, D; BRULE, G. Improvement of rheological properties of firm acids gels by skim milk heating is conserved after stirring. **Journal of Dairy Research**, v.70, p.423-431, 2003.

CERNING, J.; Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiol. Rev.** 87: 113-130.1990.

DAVE, R.I.; SHAH, N.P. Effect of cysteine on the viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurt made with commercial starter cultures. **Int. Dairy J.**, v.7, p.537-545, 1997.

DE VUYST, L., DEGEEST, B. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. **FEMS Microb. Rev.**, v. 23, n. 2, 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. AND VANINGELGEM, F., Exopolysaccharide-producing *Streptococcus thermophilus* strains as functional starter cultures in the production of fermented milks. **Int. Dairy J.**, 13, 707-717,2003.

DONKOR, O.N.; HENRIKSSON, A.; VASILJEVIC, T.; SHAH, N.P. Effect of acidification on the activity of probiotics in yoghurt during cold storage. **Int. Dairy J.**, v.16, p.1181-1189, 2006.

DUBOC, P.; MOLLET, B.. Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 759–768, 2001.

DUPONT J, MAGNIN S, PARONNAUD J, ROQUEBERT M.F. The genus *Phaeoacremonium* from a molecular point of view. **Phytopathologia Mediterranea** 39, 119–24, 2000.

GUYOT, A. Recent progress in reactive surfactants in emulsion polymerisation. **Macromol. Symp.**, 179: 105–132, 2002.

HOSONO A, LEE J, AMETANI A, NATSUME M, HIRAYAMA M, ADACHI T, KAMINOAWA, S.; Characterization of a water-soluble polysaccharide fraction with immunopotentiating activity from *Bifidobacterium adolescentis* M101-4. **Biosci Biotechnol Biochem** 61:312–316, 1997.

KITAZAWA, H., TOBA, T., ITOH, T., KUMANO, N., ADACHI, S., YAMAGUCHI, T.; Antitumoral activity of slime-forming, encapsulated *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris* isolated from Scandinavian ropy sour milk, “villi”. **Animal Science Technology**, v. 62, p. 277-283, 1991.

KORAKLI, M., GANZLE, M.G., VOGEL, R.F. Metabolism by *bifidobacteria* and lactic acid bacteria of polysaccharides from wheat and rye, and exopolysaccharides produced by *Lactobacillus sanfranciscensis*. **J. Appl. Microbiol.** 92, 958-965, 2006.

LAWS, A.P; MARSHALL, V.M. Relevance of exopolysaccharides to the rheological properties in milk fermented with ropy strains of lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v.11, p.709-721, 2001.

LIMA, C.D.L.C.; LIMA, L.A.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; FERREIRA, E.G.; ROSA, C.A. Bactérias do ácido láctico e leveduras associadas com o queijo de minas artesanal produzido na região da Serra do Salitre, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.1, p.266-272, 2009.

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

LIN, T.Y.; CHANG CHIEN, M.-F. Exopolysaccharides production as affected by lactic acid bacteria and fermentation time. **Food Chemistry**, v. 100, n. 4, p. 1419-1423, 2007.

LOPES, L.; ANDRADE, C. T.; MANO, E.B. O valor das gomas para as indústrias. **Ciência Hoje**, São Paulo, v.12, n.71, p.65-67, mar. 1991.

LOPES, L.; ANDRADE, C. T. Polímeros de origem microbiana: polissacarídeos bacterianos. **Revista de Química Industrial**, Rio de Janeiro, v.703, p.19-23, out./dez 1995.

LOURENS-HATTINGH, A.; VILJOEN, B.C. Yogurt as probiotic carrier food. **Int. Dairy J.**, v.11, p.1-17, 2001

MONSAN, P.F; BOZONNET, S; ALBENNE, C; JOUCLA, G; WILLEMOT, R.M; REMAUND-SIMEON, M. Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v.11, p.675-685, 2001.

MOZZI, F.; ROLLAN, G.; de GIORI, G.S.; de VALDEZ, G.F. Effect of galactose and glucose on the exopolysaccharide production and the activities of

biosynthetic enzymes in *Lactobacillus casei* CRL 87. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 91, n.1, p. 160-167, 2001.

NAKAJIMA, H; SUZUKI, Y; KAIZU, H; HIROTA, T. Cholesterol lowering activity of ropy fermented milk. **Journal of food science**, v.57, p.1327-1329, 1992.

OLIVEIRA, M. N., DAMIN, M. R. Efeito do teor de sólidos e da concentração de sacarose na acidificação e na viabilidade de bactérias do iogurte e das probióticas em leite fermentado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v.23, n.(supl.), p.172 - 176, 2003.

RICCIARDI, A; CLEMENTI, F. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: Structure, production and technological applications. **Italian Journal of Food Science**, v.12, p.23–45, 2000.

RICCIARDI, A.; PARENTE, E.; CRUDELE, M.; ZANETTI, F.; SCOLARI, G.; MANNAZZU, I.. Exopolysaccharide production by *Streptococcus thermophilus* SY: production and preliminary characterization of the polymer. **Journal of Applied Microbiology** 92:297–308, 2002.

RUAS-MADIEDO, P.; HUGENHOLTZ, J. and ZOON, P.; An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, vol. 12, no. 2-3, p. 163-171, 2002.

RUAS-MADIEDO, P.; REYES-GAVILÁN, C.G.D.L. Methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. **Journal of Dairy Science**, v.88, n.3, p.843-856, 2006.

RUAS-MADIEDO, P., MEDRANO, M., SALAZAR, N., DE LOS REYES-GAVILÁN, C.G., PÉREZ, P.F.; ABRAHAM, A.G. Exopolysaccharides produced by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains abrogate in vitro the cytotoxic effect of bacterial toxins on eukaryotic cells. **Journal of Applied Microbiology**, 109: 2079–2086. doi: 10.1111/j.1365-2672.2010.04839, 2008.

SARANGUI, I.; GHOSH, D.; BHUTIA, S.K.; MALLIK, S.K.; MAITI, T.K. Anti tumor and immunomodulating effects of *Pleurotus ostreatus* mycelia-derived proteoglycans. **International Immunopharmacology**, v. 6, p. 1287-1297,2006.

SOUZA, M.D.; CRUZ, G. H. C. Produção fermentativa de polissacarídeos extracelulares por bactérias. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.25, n.4, p. 331-340, out/dez. 2004.

SUTHERLAND, I. W. Polysaccharases for microbial exopolysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v.38, p. 319-328, 1999.

TAMIME, A. Y.; ROBINSON, R. K. **Yogurt ciencia y tecnología, Zaragoza:Acribia**, 367p, 1991.

TORINO, M. I., MOZZI, F.; VALDEZ, G. Exopolysaccharide biosynthesis by *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807. **Applied Microbiology Biotechnology**. Vol. 68, pp. 259 – 265, ISSN 1432-0614, 2005.

TSUTSUMI, P. N.; NETO, O. P.; BARBOSA, M. A.; LIMA, G. M. V. Influencia de diferentes carboidratos na produção de exopolissacarídeo por *Lasiodiplodia theobromae*. Faculdade Julio de Mesquita Filho, UNESP, Campus de Assis, 2009.

URASHIMA, T.; ARIGA, H.; SAITO, T.; NAKAMURA, T.; TANAKA, S.; ARAI, I. Exocellular polysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus*. **Milchwissenschaft** 54:190–193, 1999.

WALLING, E., GINDREAU, E., LONVAUD-FUNEL, A. A putative glucan synthetase gene *dps* detected in exopolysaccharide-producing *Pediococcus damnosus* and *Oenococcus oeni* isolated from wine and cider. **Int. J. Food Microbiol.** 98, 53-62, 2005.

WERNING, M.L., IBARBURU, I., DUEÑAS, M.T., IRASTORZA, A., NAVAS, J., & LÓPEZ, P. *Pediococcus parvulus* *gtf* gene encoding the GTF glycosyltransferase and its application for Specific PCR detection of β -D-glucan-producing bacteria in foods and beverages. **Journal of Food Protection**, Vol.69, No.1, (January 2006), pp. 161-169.

ZOHURIAAM, M. J.; SHOKROLAHI, F. Thermal studies on natural and modified gums. **Polymer Testing**. v. 23, p. 575-579, 2004.

4 CONCLUSÃO

Os dados obtidos apontam que há influência da glicose, mas não da frutose, na multiplicação de *S. thermophilus* e, conseqüentemente, na produção de exopolissacarídeos. Quando adicionadas concentrações de glicose abaixo de 3,2 % ou acima de 6,2%, houve maior multiplicação de *S. thermophilus* e maior produção de EPS, independentemente da concentração de frutose usada.

Além disso, quando compara-se as concentrações de EPS nos iogurtes adicionados e sem adição de glicose e frutose, este parâmetro é pelo menos 2 vezes menor neste último, indicando que a glicose e a frutose, ou pelo menos um deles, estimularam a produção de EPS.

5 REFERÊNCIAS

- BOELS, I. C., RAMOS, A., KLEEREBEZEM, M., DE VOS, W. M.. Functional Analysis of the *Lactococcus lactis* galU and galE Genes and Their Impact on Sugar Nucleotide and Exopolysaccharide Biosynthesis. **Appl. Environ. Microbiol.** 67: 3033-3040, 2001.
- BRANDÃO, S. C. C. Tecnologia da fabricação de iogurte. **Revista do Instituto de Laticínios Candido Tostes**, v. 42, n. 250, p. 3-8, 1987.
- BRASIL. Leis, decretos, etc. Recomendação nº 31 de 12 de junho de 1997 (Consulta Pública) **Regulamento Técnico Mercosul de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados, Diário Oficial da União, Brasília, 3 jul 1997, Seç. 1, p. 14064.** (Internalizada no Brasil DIPOA/MA Resolução nº 5 de 13 de novembro de 2000 republicada em 2/01/2001. Disponível: http://www.agricultura.gov.br/das/dipoa/resolução_leite_fermentado.htm.
- BROADBENT, J.R.; MCMAHON, D.J.; WELKER, D.L.; OBERG, C.J.; MOINEAU, S. Biochemistry genetics and applications of exopolysaccharide production in *Streptococcus thermophilus*: a review. **Journal of Dairy Science**, v.86, n.2, p. 407-423, 2003.
- CERNING, J.; Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiol. Rev.** 87: 113-130.1990.
- CERNING, J.; RENARD, C. M. G. C.; THIBAUT, J. F.; BOULLANNE, C.; LANDON, M.; DESMAZEAUD, M. and TOPISIROVIC, L.. Carbon source requirements for exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* CG11 and partial structure analysis of the polymer. **Appl. Environ. Microbiol.**, 60, 3914-3919, 1994.
- CONTI, E.; FLAIBANI, A.; REGAN, M.; SUTHERLAND, I. W. Alginate from *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: production and properties. **Microbiology**, New York, v.140, p.1128-1132, 1994.
- CORRADI DA SILVA, M. L.; 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**, 2006, vol.29, n.1, p.85-92.
- COSTERTON, JW; CHENG, KJ; GEESEY, GG; LADD, TL; NICKEL, JC; DASGUPTA, M AND MARRIE, TJ. Bacterial biofilms in nature and disease. **Annu. Rev. Microbiol.** 49: 711 – 745, 1987.
- COTTRELL, I. W.; KANG, K. S.; KOVACS, P. **Handbook of water-soluble gums and resins.** New York: Mc Graw Hill, 1980.
- DEGEEST, B; DE VUYST, L. Correlation of activities of the enzymes a-phosphoglucomutase, UDP-galactose 4-epimerase, and UDP-glucose pyrophosphorylase with exopolysaccharide biosynthesis by *Streptococcus thermophilus* LY03. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.3519–3527, 2000.
- DE SOUZA, A. M.; SUTHERLAND, I. W. Exopolysaccharide and storage polymer production in *Enterobacter aerogenes* type 8 strains. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.76, p.463-468, 1994.

DE VUYST, L., DEGEEST, B. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. **FEMS Microb. Rev.**, v. 23, n. 2, 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. AND VANINGELGEM, F., Exopolysaccharide-producing *Streptococcus thermophilus* strains as functional starter cultures in the production of fermented milks. **Int. Dairy J.**, 13, 707-717, 2003.

DUEÑAS, M.; MUNDUATE, A.; PEREA, A.; IRASTORZA, A. Exopolysaccharide production by *Pediococcus damnosus* 2.6 in a semidefined medium under different growth conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 87, n. 1-2, p. 113-120, 2003.

FARIA, L. H. G. B. **Caracterização taxonômica e produção de polissacarídeos utilizando bactérias isoladas de amostras de solo.** Tese (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2002.

FERREIRA, C. L. L. F.; MALTA, H. L.; DIAS, A. S.; GUIMARÃES, A.; JACOB, F. E.; CUNHA, R. M.; CARELI, R. T.; PEREIRA, S.; FERREIRA, S. E. R. Verificação da qualidade físico-química e microbiológica de alguns iogurtes vendidos na região de Viçosa. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 56, n. 321, p. 152- 158, 2001.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria.** Córdoba, 2001. 34p. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probioreport_en.pdf>. Acesso em: 03 set. 2007.

GAMAR, L; BLONDEAU, K; SIMONET, J.-M. Physiological approach to extracellular polysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* strain C83. **Journal of Applied Microbiology**, v.83, p. 281–287, 1997.

GANDHI, H. P.; RAY, R. M.; PATEL, R. M. Exopolymer production by *Bacillus* species. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v.34, p.323-327, 1997.

HOSONO A, LEE J, AMETANI A, NATSUME M, HIRAYAMA M, ADACHI T, KAMINOGAWA, S.; Characterization of a water-soluble polysaccharide fraction with immunopotentiating activity from *Bifidobacterium adolescentis* M101-4. **Biosci Biotechnol Biochem** 61:312–316, 1997.

JOLLY, L.; STINGELE, F. Molecular organization and functionality of exopolysaccharide gene clusters in lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 9, p. 733-745, 2001.

KANG, K. S.; COTTRELL, I. W. **Polysaccharides in microbial technology.** New York: Academic Press, 1979.

KAWAI, H.; ISOBE, Y.; KORIBE, M.; TOKUDA, J.; TOKUNO, I.; ENDO, K.; KAWAI, F. Production of a novel extracellular polysaccharide by a *Bacillus*

strain isolated from Soil. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, Tokio, v.56, n.6, p.853-857, 1992.

KITAZAWA, H., TOBA, T., ITOH, T., KUMANO, N., ADACHI, S., YAMAGUCHI, T.; Antitumoral activity of slime-forming, encapsulated *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris* isolated from Scandinavian ropy sour milk, "villi". **Animal Science Technology**, v. 62, p. 277-283, 1991.

KLEEREBEZEM, M., HOLS, P., HUGENHOLTZ, J.; Lactic acid bacteria as a cell factory: Rerouting of carbon metabolism in *Lactococcus lactis* by metabolic engineering. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 840-848, 2000.

LAWS, A.P; MARSHALL, V.M. Relevance of exopolysaccharides to the rheological properties in milk fermented with ropy strains of lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v.11, p.709-721, 2001.

LOOIJESTEIJN, J. P.; TRAPET, L.; VRIES, E.; ABEE, T.; HUGENHOLTZ, J. Physiological function of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.64, p.71-80, 2001.

KORAKLI, M., GANZLE, M.G., VOGEL, R.F. Metabolism by bifidobacteria and lactic acid bacteria of polysaccharides from wheat and rye, and exopolysaccharides produced by *Lactobacillus sanfranciscensis*. **J. Appl. Microbiol.** 92, 958-965, 2006.

LAWS, A.P; MARSHALL, V.M. Relevance of exopolysaccharides to the rheological properties in milk fermented with ropy strains of lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v.11, p.709-721, 2001.

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

LIN, T.Y.; CHANG CHIEN, M.-F. Exopolysaccharides production as affected by lactic acid bacteria and fermentation time. **Food Chemistry**, v. 100, n. 4, p. 1419-1423, 2007.

LOPES, L.; ANDRADE, C. T.; MANO, E.B. O valor das gomas para as indústrias. **Ciência Hoje**, São Paulo, v.12, n.71, p.65-67, mar. 1991.

LOPES, L.; ANDRADE, C. T. Polímeros de origem microbiana: polissacarídeos bacterianos. **Revista de Química Industrial**, Rio de Janeiro, v.703, p.19-23, out./dez 1995.

LOURENS-HATTINGH, A.; VILJOEN, B.C. Yogurt as probiotic carrier food. **Int. Dairy J.**, v. 11, p. 1-17, 2001.

LUCEY, J.A.; SINGH, H. – Formation and physical properties of acid milk gels: a review. **Food Research International**. v. 30, n.7, p. 529-542, 1998.

MACEDO, M. G.; LACROIX, C.; GARDNER, N. J.; CHAMPAGNE, C. P. Effect of medium supplementation on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M in whey permeate. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 419-426, 2002.

McKELLAR, R. C.; GEEST, J. V.; CUI, W. Influence of culture and environmental conditions on the composition of exopolysaccharide produced by

Agrobacterium radiobacter. **Food hydrocolloids**, Oxford, v.17, p.429-437, 2003.

MARGARITIS, A. PACE, C. Immobilization of *Kluyveromyces marxianus* cells containing inulinase activity in open pore gelatin matrix: 2. Application for high fructose syrup production. **Enzyme Microb. Technol.**, 7, 459-469, 1985.

MONSAN, P.F; BOZONNET, S; ALBENNE, C; JOUCLA, G; WILLEMOT, R.M; REMAUND-SIMEON, M. Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v.11, p.675-685, 2001.

NAKAJIMA, H; SUZUKI, Y; KAIZU, H; HIROTA, T. Cholesterol lowering activity of ropy fermented milk. **Journal of food science**, v.57, p.1327-1329, 1992.

NAMPOOTHIRI, K. M.; SINGHANIA, R. R.; SABARINATH, C.; PANDEY, A. Fermentative production of gellan using *Sphingomonas paucimobilis*. **Process Biochemistry**, London, v.38, p.1513-1519, 2003.

PASQUEL, A. Gomas: utilização e aspectos reológicos. **BOL. CBCTA**. 33(1) – 86-97, jan/jun, 1999.

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

PSZCZOLA, D. E. Gellan gum wins IFT's Food Technology Industrial Achievement award. **Food Technology**, Chicago, v.47, n.9, p.94-96, 1993.

RICCIARDI, A; CLEMENTI, F. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: Structure, production and technological applications. **Italian Journal of Food Science**, v.12, p.23–45, 2000.

RICCIARDI, A.; PARENTE, E.; CRUDELE, M.; ZANETTI, F.; SCOLARI, G.; MANNAZZU, I.. Exopolysaccharide production by *Streptococcus thermophilus* SY: production and preliminary characterization of the polymer. **Journal of Applied Microbiology** 92:297–308, 2002.

RUAS-MADIEDO, P.; HUGENHOLTZ, J. and ZOON, P.; An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, vol. 12, no. 2-3, p. 163-171, 2002.

RUAS-MADIEDO, P.; ALTING, A.C.; ZOON, P. Effect of exopolysaccharides and proteolytic activity of *Lactococcus lactis subsp. cremoris* strains on the viscosity and structure of fermented milks. **International Dairy Journal**, v. 15, n. 2, p. 155-164, 2005.

RUAS-MADIEDO, P.; REYES-GAVILÁN, C.G.D.L. Methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. **Journal of Dairy Science**, v.88, n.3, p.843-856, 2006.

SABOYA, L.V.; OETERER, M.; OLIVEIRA, A.J. Propriedades profiláticas e terapêuticas de leites fermentados – Uma revisão. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 31(2): 176-85, jul./dez., 1997.

SARANGUI, I.; GHOSH, D.; BHUTIA, S.K.; MALLIK, S.K.; MAITI, T.K. Anti tumor and immunomodulating effects of *Pleurotus ostreatus* mycelia-derived proteoglycans. **International Immunopharmacology**, v. 6, p. 1287-1297, 2006.

SILVA, F. R.; VETTORE, A. L.; KEMPER, E. L.; LEITE, A.; ARRUDA, P. Fastidium gum: the *Xylella fastidiosa* exopolysaccharide possibly involved in bacterial pathogenicity. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, n.203, p.165-171, 2001.

SHAH, N. P.; Functional foods form probiotics and prebiotics. **Food Tecnology**, v. 55, n.11, p. 46-52, 2001.

SOUZA, M.D.; CRUZ, G. H. C. Produção fermentativa de polissacarídeos extracelulares por bactérias. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.25, n.4, p. 331-340, out/dez. 2004.

STINGELE, F., VINCENT, S. J. F., FABER, E. J., NEWELL, J. W., KAMERLING, J., NEESER, J. R. Introduction of the exopolysaccharide gene cluster from *Streptococcus thermophilus* Sfi6 into *Lactococcus lactis* MG1363: Production and characterization of an altered polysaccharide. **Molecular Microbiology**, v. 32, p. 1287-1295, 1999.

STREDANSKY, M., CONTI, E., NAVARINI, L., BERTOCCHI, C. Production of bacterial exopolysaccharides by solid substrate fermentation. **Process Biochemistry**, v. 34, p. 11-16, 1999.

SUTHERLAND, I. W. Bacterial exopolysaccharides. **Advances in Microbial Physiology**, London, v.8, p.142- 213, 1979.

SUTHERLAND, I. W. Bacterial surface polysaccharides: structure and function. **Internacional Review of Cytology**, New York, v. 113, p. 233-269, 1988.

SUTHERLAND, I. W. Polysaccharases for microbial exopolysaccharides. **Carbohydrate Polymers, Barking**, v.38, p. 319-328, 1999.

SUTHERLAND, I. W.; KENNEDY, L. Polysaccharide lyases from gellan-producing *Sphingomonas* spp. **Microbiology**, New York, n.142, p.867-872, 1996.

SVENSSON, M.; WAAK, E.; SVENSSON, U.; RADSTRÖM, P. Metabolically improved exopolysaccharide production by *Streptococcus thermophilus* and its influence on the rheological properties of fermented milk. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 10, p. 6398-6400, 2005.

TAMIME, A.Y., DEETH, H.C. Yogurt: technology and biochemistry. **J. Food Protec.**, v. 43, n.12, p. 939- 977, 1980.

TAMIME, A.Y.; ROBINSON, R.K. **Yoghurt: science and technology**. 2.ed. Boca Raton: CRC, 368p, 1999.

TEIXEIRA, A. C. P.; MOURTHÉ, K.; ALEXANDRE, D. P.; SOUZA, M. R.; PENNA, C.F. A. M. Qualidade do logurte Comercializado em Belo Horizonte. **Leite & Derivados**, v. 1, n. 51, p. 32-39, 2000.

URASHIMA, T.; ARIGA, H.; SAITO, T.; NAKAMURA, T.; TANAKA, S.; ARAI, I. Exocellular polysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus*. **Milchwissenschaft** 54:190–193, 1999.

- VAN KRANENBURG, R., MARUGG, J. D., VAN SWAM, I. I., WILLEM, N. J., DE VOS, W. M. . Molecular characterization of the plasmid encoded eps gene cluster essential for exopolysaccharide biosynthesis in *Lactococcus lactis*. **Molecular Microbiology**, v. 24, p. 387-397, 1997.
- VERMANI, M. V.; KELKAR, S. M.; KAMAT, M. Y. Production and optimization of certain growth parameters for an exopolysaccharide from *Azotobacter vinelandii* MTCC 2460 isolated from a plant rhizosphere. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v.80, n.6, p.599- 602, 1995.
- WALLING, E., GINDREAU, E., LONVAUD-FUNEL, A. A putative glucan synthetase gene dps detected in exopolysaccharide-producing *Pediococcus damnosus* and *Oenococcus oeni* isolated from wine and cider. **Int. J. Food. Microbiol.** 98, 53-62, 2005.
- WALSTRA, et al.. **Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos**. Trad. Rosa María Oria. Edit Acribia S. A. España. 12-14, 151-163 p, 2001.
- WECKER, A., ONKEN, V. Influence of dissolved oxygen concentration and shear rate on the production of pullulan by *Aureobasidium pullulans*. **Biotechnology Letters**, v. 13, p.155-160, 1991.
- WEINER, R.; LANGILLE, S. and QUINTERO, E. Structure, function and immunochemistry of bacterial exopolysaccharides. **Journal of Industrial Microbiology**, v.15, p.339-346, 1995.
- WELMAN, A. D.; MADDOX, I. S. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v.21, n.6, p.269-274, 2003.
- WERNING, M.L., IBARBURU, I., DUEÑAS, M.T., IRASTORZA, A., NAVAS, J., & LÓPEZ, P. *Pediococcus parvulus* gtf gene encoding the GTF glycosyltransferase and its application for Specific PCR detection of β -D-glucan-producing bacteria in foods and beverages. **Journal of Food Protection**, Vol.69, No.1, pp. 161-169, 2006.
- WHITFIELD, C. Bacterial extracellular polysaccharides. **Canadian Journal Microbiology** v. 34, p. 415-420, 1988.
- WHITFIELD, C.; ROBERTS, I. S. Structure, assembly and regulation of expression of capsules in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, Salem, n.31, p.1307-1319, 1999.
- ZOHURIAAM, M. J.; SHOKROLAHI, F. Thermal studies on natural and modified gums. **Polymer Testing**. v. 23, p. 575-579, 2004.