



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

FERNANDA SILVA FARINAZZO

**ESTUDO DE POTENCIAIS PROPRIEDADES PROBIÓTICAS
E SÍNTESE DE EXOPOLISSACARÍDEO DE BACTÉRIAS
ÁCIDO LÁCTICAS ISOLADAS DE FRUTO JUÇARA
(*EUTERPE EDULIS MARTIUS*) NATIVO DA MATA
ATLÂNTICA**

Londrina
2020

FERNANDA SILVA FARINAZZO

**ESTUDO DE POTENCIAIS PROPRIEDADES PROBIÓTICAS
E SÍNTESE DE EXOPOLISSACARÍDEO DE BACTÉRIAS
ÁCIDO LÁCTICAS ISOLADAS DE FRUTO JUÇARA
(*EUTERPE EDULIS MARTIUS*) NATIVO DA MATA
ATLÂNTICA**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em
Ciência de Alimentos, nível Doutorado, da
Universidade Estadual de Londrina, como quesito
parcial à obtenção do Título de doutor em Ciência de
Alimentos

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sandra Garcia

Londrina
2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

F225 Farinazzo, Fernanda Silva .
Estudo de potenciais propriedades probióticas e síntese de exopolissacarídeo de bactérias ácido lácticas isoladas de fruto juçara (*Euterpe edulis Martius*) nativo da Mata Atlântica. / Fernanda Silva Farinazzo. - Londrina, 2020.
183 f.

Orientador: Sandra Garcia.
Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2020.
Inclui bibliografia.

1. *Leuconostoc* sp - Tese. 2. *Lactococcus* sp - Tese. 3. Dextrana - Tese. 4. Potenciais propriedades probióticas - Tese. I. Garcia, Sandra . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. III. Título.

CDU 641.1

FERNANDA SILVA FARINAZZO

**ESTUDO DE POTENCIAIS PROPRIEDADES PROBIÓTICAS E
SÍNTESE DE EXOPOLISSACARÍDEO DE BACTÉRIAS ÁCIDO
LÁCTICAS ISOLADAS DE FRUTO JUÇARA (*EUTERPE EDULIS*
MARTIUS) NATIVO DA MATA ATLÂNTICA**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em
Ciência de Alimentos, nível Doutorado, da
Universidade Estadual de Londrina, como quesito
parcial à obtenção do Título de doutor em Ciência de
Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Garcia
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Magali Soares dos Santos Pozza
Universidade Estadual de Maringá - UEM

Profa. Dra. Maria Antonia Pedrine Colabone
Celligoi
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Adriana Aparecida Bosso Tomal
Universidade do Estado de Minas Gerais – UEMG

Profa. Dra. Karla Bigetti Guergoletto
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 09 de dezembro de 2020.

Aos meus pais Luiz Eduardo e Lucinda, pelo amor, apoio, confiança e motivação incondicional. Por me mostrarem a direção correta, a importância da família e o caminho da honestidade e persistência. Aos meus irmãos Carolina e Eduardo, pelo amor, amizade e carinho. Amo todos vocês.

Dedico

AGRADECIMENTOS

“Gratidão é a memória do coração”. Ao longo de nossas vidas sempre aparecem pessoas que nos ajudam e sem as quais nossos objetivos seriam muito difíceis de alcançar, ou seriam inatingíveis. Por isso esta parte da tese é tão especial, e quero aqui expressar a todos, pessoas ou instituições, meus agradecimentos.

Antes de mais nada, gostaria de agradecer a Deus e Nossa Senhora, por sempre me concederem sabedoria nas escolhas dos melhores caminhos, na busca das melhores pessoas para me apoiarem, coragem para acreditar, força para não desistir e proteção para me amparar.

Agradeço à prof^a. Dr^a. Sandra Garcia, pela confiança depositada, pela orientação, disposição, amizade e ensinamentos. Pelo exemplo, competência profissional, caráter e generosidade. Minha admiração e respeito. Obrigada pelo puxões de orelha nos momentos oportunos, afinal, também aprendemos com nossos erros. Obrigada pelas conversas além da orientação, que nossa amizade e cumplicidade permaneça para sempre.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade de participar e pelas contribuições acerca desta tese.

Aos docentes e funcionários do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina pelos ensinamentos que passaram desde o mestrado, os quais foram, são e serão muito importantes para toda minha vida profissional. Obrigada por estarem sempre a disposição para auxiliarem nas dúvidas e terem tornado possível a realização deste trabalho.

A pós-doutoranda Adriana Aparecida Bosso Tomal, pelos ensinamentos, disposição para auxiliar nas dúvidas e amizade. Obrigada pelo carinho, dedicação e paciência. Grande amiga.

A pós graduação em Ciência e Tecnologia de Leites e Derivados da Universidade Norte do Paraná (UNOPAR), na pessoa de Alessandra Bosso, pelas inúmeras liofilizações de amostras. Além de grande amiga, uma parceira na pesquisa. Obrigada amiga.

Ao Laboratório de Desenvolvimento de Instrumentação e Automação Analítica (DIA) e em especial a prof^a Dr^a. Suzana Lucy Nixdorf, pela oportunidade de fornecer espaço no laboratório para que pudesse realizar as determinações cromatográficas. Pela amizade, disposição e ensinamentos.

Ao Laboratório de Espectroscopia da UEL (LABSPEC) e em especial à técnica Natalia Romero, por colaborar nas análises térmicas. Obrigada pela disposição e execução dos experimentos.

À Ane Simionato pela colaboração e atenção sempre que necessário nos cadastros de sequenciamento dos microrganismos identificados ao Banco de Dados de Sequência Genética (GenBank). Pela amizade, disposição e ensinamentos.

À Universidade Federal Tecnológica do Paraná (UTFPR) campus Medianeira, na pessoa da Daneysa Lahis Kalschne, pós-doutoranda que colaborou nas análises reológicas. Pela amizade, disposição e execução do experimento.

À Universidade Federal do Paraná na pessoa do prof. Dr. Andersson Barison pelas análises de RMN realizadas.

Às colegas Bruna Yoshida e Ana Clara Longhi pela colaboração nas análises de propriedades emulsificantes realizadas. Pela amizade, disposição e ensinamentos.

À empresa Neopropecta Microbiome Technologies (Florianópolis, Brasil) pelo profissionalismo e apoio prestado na identificação dos microrganismos.

À Fazenda Bimini, na pessoa de Daniel Steidle, por gentilmente coletar e fornecer os frutos da palmeira juçara, que foi fundamental na realização da pesquisa. Além disso, seus ensinamentos, atenção e envolvimento nas questões ambientais e na preservação da palmeira juçara.

À Universidade Estadual de Londrina, pela infraestrutura e facilidades proporcionadas.

Ao CNPq pela bolsa de estudos concedida e incentivo. Foi de fundamental importância para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus amados pais, Luiz Eduardo e Lucinda, por me proporcionarem a oportunidade de estudar e de seguir o caminho desejado. Vocês são os melhores pais do mundo. Pelo amor, dedicação, compreensão, amizade e carinho. Obrigado por estarem sempre presentes.

Ao meu amado irmão Eduardo pelo convívio diário e por me apoiar todos os dias, mesmo nos mais estressantes. Pela disponibilidade em me auxiliar sempre que necessário, pela amizade e companheirismo. Te amo irmãozinho.

À minha amada irmã Carolina, pelos conselhos, alento, amizade e por sempre estar presente em meus dias apesar da distância. Te amo minha irmã.

Aos meus avós, Alice, Felício (*in memoria*) e Aurora (*in memoria*), que dignamente me apresentaram o apoio da família, a direção correta, e a ter fé na vida. Obrigada por tudo. Amo eternamente vocês. Ter avós é ter tudo.

Ao meu tios, em especial, João Marcos e Margareti; ao meu cunhado João Paulo Trindade; e aos meus primos, em especial, Leonardo e Gabriel, vocês são minha família e meus amigos. Obrigada pelos conselhos, apoio e por sempre torcerem pelo meu sucesso. Amo vocês.

Às minhas amigas Carolina Saori Ishii Mauro e Maria Thereza Carlos Fernandes pela

amizade sincera, carinho, por estarem sempre presentes em todos os momentos de dificuldades, pela colaboração nos experimentos e artigos. Pelas risadas que amenizavam o estresse diário, por nossos congressos, viagens e eventuras juntas. Sentirei saudades de tudo isso. Com certeza, uma amizade além da UEL, parceiras para a vida. Amo esse trio.

Aos demais colegas do laboratório 758, Francine Fernandes, Rayssa Amancio, Debora Pinhatari, Juliana Morilha, Danilo Bordini e Fabio Martins, pelos momentos engraçados e conversa durante os dias no laboratório. Em especial ao José Renato Silva pela amizade sincera, carinho e por estar sempre presente. Amigo para a vida.

A estagiária Letícia Valente pela amizade, colaboração e dedicação na execução dos experimentos.

Aos demais colegas e estagiários do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, em especial ao Anderson Takihara meu parceiro e vice. Obrigada por aquele ano que fomos representante dos alunos, apesar de cansativo em alguns momentos, foi enriquecedor.

Às minhas grandes amigas Mariana Bortholazzi Almeida, Camila Campos Felix e Barbara Gimenez, pela amizade, conselhos e apoio em todos os períodos de insegurança. Importantes em todos momentos. Amo.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho, direta e indiretamente, para que essa etapa da minha vida pudesse ser concretizada.

“Há verdadeiramente duas coisas diferentes: saber e crer que se sabe. A ciência consiste em saber; em crer que se sabe reside a ignorância.”

Hipócrates, 460 a.C – 370 a.C

FARINAZZO, Fernanda Silva. **Estudo de potenciais propriedades probióticas e síntese de exopolissacarídeo de bactérias ácido lácticas isoladas de fruto juçara (*Euterpe edulis Martius*) nativo da Mata Atlântica**. 2020. 186 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

RESUMO

Os frutos de juçara (*Euterpe edulis* Martius), palmeira da Mata Atlântica ameaçada de extinção, possuem uma rica diversidade de microrganismos, entre eles as bactérias ácido lácticas (BAL). As BAL são amplamente aplicadas como probióticos, além de serem capazes de sintetizar diversos compostos, como exopolissacarídeos (EPS). Estes biopolímeros de carboidratos extracelulares têm apresentado ampla aplicabilidade devido suas propriedades tecnológicas e funcionais. Tendo em vista estas abordagens, o presente estudo teve como objetivo identificar novos candidatos probióticos a partir de BAL isoladas de frutos de juçara e, sobretudo, verificar a produção, isolar e caracterizar o exopolissacarídeo. As cepas de *Lactococcus lactis* J7 e *Leuconostoc pseudomesenteroides* JF17, foram isoladas de frutos juçara, identificadas pela técnica de Sequenciamento de Nova Geração (NGS) e investigadas quanto seu potencial probiótico *in vitro*. Foi examinada a capacidade de *L. pseudomesenteroides* JF17 em produzir EPS, sendo este analisado quanto sua estrutura química por HPLC, FTIR e RMN de ^1H e ^{13}C , análise térmica por TGA e DSC, propriedade reológica, emulsificante, físico-química e capacidade antioxidante por radical DPPH $^{\bullet}$, ABTS $^{+\bullet}$ e radical hidroxila. Os resultados mostraram que a cepa *L. lactis* J7 foi resistente, mantendo uma viabilidade ao final da fase entérica de $6,07 \pm 0,16$ log UFC / mL e também apresentou o maior valor em termos de hidrofobicidade ($12,55 \pm 0,52$ %), autoagregação ($25,63 \pm 0,75$ %) e capacidade de coagregação com *E. coli* ATCC 25922 ($21,52 \pm 0,98$ %) e *S. enteritidis* ATCC 13076 ($22,68 \pm 1,01$ %), quando comparado com a cepa JF17. *L. pseudomesenteroides* JF17 teve alta capacidade de produção de EPS ($53,77$ mg / mL). O EPS consistiu em um homopolissacarídeo composto de unidades de glicose, sendo uma dextrana formada por unidades de D-glicose ligadas por α -(1 \rightarrow 6). A análise térmica indicou que o EPS teve efeito positivo na estabilidade com temperatura de degradação de $320,8$ °C, ponto de fusão de $279,81$ °C, e entalpia de $106,557$ J / g. Apresentou alta capacidade de retenção de água ($470,89 \pm 39,67$ %, p / v) e óleo ($89,945 \pm 4,16$ %, p / v), podendo estar relacionado à estrutura porosa revelada pelas imagens de MEV. Exibiu comportamento típico de fluido pseudoplástico não-newtoniano e apresentou maior capacidade de emulsão ($26,73 \pm 0,31$ mL de óleo / g dextrana) do que a goma guar ($15,45 \pm 1,33$ mL óleo / g goma), além de ter proporcionado uma significativa capacidade de estabilização de emulsão (~ 65 %). A solução viscosa da dextrana produzida pela cepa JF17 mostrou coesividade e elasticidade semelhantes às relatadas para gel de goma de guar. O biopolímero também apresentou capacidade de sequestro sobre os diferentes radicais livres testados, indicando alta atividade antioxidante. No geral, os resultados sugeriram que o EPS de *L. pseudomesenteroides* JF17 apresentou qualidades tecnológicas potenciais para aplicações na indústria de alimentos, sendo um bom agente viscosificante, estabilizante, emulsificante e antioxidante. Além disso, a cepa *L. lactis* J7 pode ser considerada uma candidata promissora a probiótico, para o desenvolvimento de produtos funcionais.

Palavras-chave: *Leuconostoc* sp. *Lactococcus* sp. Dextrana. Simulação Gastrointestinal. Emulsificante.

FARINAZZO, Fernanda Silva. **Study of potential probiotic properties and exopolysaccharide synthesis by lactic acid bacteria isolated from juçara fruit (*Euterpe edulis Martius*) native to the Atlantic Forest.** 2020. 186 p. Thesis (Doctor Degree in Food Science) - State University of Londrina, Londrina, 2020.

ABSTRACT

Juçara fruits (*Euterpe edulis Martius*), an endangered palm from the Atlantic Forest, have a rich diversity of microorganisms, including lactic acid bacteria (LAB). LAB are widely applied as probiotics, in addition to being able to synthesize several compounds, such as exopolysaccharides (EPS). These extracellular carbohydrate biopolymers have shown wide applicability due to their technological and functional properties. In view of these approaches, the present study aimed to identify new probiotic candidates from LAB isolated from juçara fruits and, mainly, to verify production, isolate and characterize the exopolysaccharide. The strains of *Lactococcus lactis* J7 and *Leuconostoc pseudomesenteroides* JF17, were isolated from juçara fruits, identified by Next Generation Sequencing (NGS) technique, and investigated for their probiotic potential *in vitro*. The ability of *L. pseudomesenteroides* JF17 to produce EPS was verified, which was checked for its chemical structure by HPLC, FTIR and ¹H and ¹³C NMR, thermal analysis by TGA and DSC, rheological, emulsifying, physical-chemical and antioxidant capacity by radical DPPH[•], ABTS^{•+} and hydroxyl radical. The results showed that the *L. lactis* J7 strain was resistant, maintaining a viability at the end of the enteric phase of 6.07 ± 0.16 log CFU / mL and also showed the highest value in terms of hydrophobicity (12.55 ± 0.52 %), autoaggregation (25.63 ± 0.75 %) and coaggregation capacity with *E. coli* ATCC 25922 (21.52 ± 0.98 %) and *S. enteritidis* ATCC 13076 (22.68 ± 1.01 %), when compared to the JF17 strain. *L. pseudomesenteroides* JF17 had a high EPS production capacity (53.77 mg / mL). EPS consisted of a homopolysaccharide composed of units of glucose, being a dextran formed by units of D-glucose linked by α -(1→6). The thermal analysis indicated that the EPS had a positive effect on stability with a degradation temperature of 320.8 °C, melting point of 279.81 °C, and enthalpy of 106.557 J / g. It had a high water retention capacity (470.89 ± 39.67 %, w / v) and oil (89.945 ± 4.16 %, w / v), which may be related to the porous structure revealed by the MEV images. It exhibited typical non-Newtonian pseudoplastic fluid behavior and had a higher emulsion capacity (26.73 ± 0.31 mL of oil / g dextran) than guar gum (15.45 ± 1.33 mL oil / gum), in addition to providing significant emulsion stabilization capacity (~ 65 %). The viscous dextran solution produced by the JF17 strain showed cohesiveness and elasticity similar to those reported for guar gum gel. The biopolymer also showed a capacity for sequestration on the different free radicals tested, indicating high antioxidant activity. Overall, the results suggested that the EPS of *L. pseudomesenteroides* JF17 showed potential technological qualities for applications in the food industry, being a good viscosifying, stabilizing and emulsifying agent and antioxidant capacity. In addition, *L. lactis* J7 can be considered a promising probiotic candidate for the development of functional products.

Key words: Dextran. *Leuconostoc* sp. *Lactococcus* sp. Simulated Gastrointestinal. Emulsifier.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1	Palmeira juçara (<i>Euterpe edulis</i> Martius)	24
Figura 2	Cacho de fruto da palmeira juçara	25
Figura 3	Descrição do sequenciamento do gene 16S rRNA	31
Figura 4	Metabolismo de Bactérias Ácido Lácticas. (A) Metabolismo homofermentativo; (B) Metabolismo heterofermentativo	39
Figura 5	Bactéria Ácido Lácticas como fonte produtora de compostos industriais.....	40
Figura 6	Biossíntese de homopolissacarídeos e heteropolissacarídeos em bactérias ácido lácticas.....	46
Figura 7	Estrutura química da dextrana	49
Figura 8	Mecanismo de produção da dextrana.....	50

CAPÍTULO II

Figure 1	Survival of the isolates, <i>L. lactis</i> J7 and <i>L. pseudomesenteroides</i> JF17 (log CFU/mL), before (0 h) and during exposure to in vitro simulated gastric (2 h) and enteric (4 and 6 h) conditions (n = 3, x ± SD)	84
Figure 2	The effect of temperature and NaCl on the growth of <i>L. lactis</i> J7 and <i>L. pseudomesenteroides</i> JF17. (a) Viability at 15 °C and 2%, 4% and 6% NaCl. (b) Viability at 45 °C and 2%, 4% and 6% NaCl. Bars are means ± standard error of the mean. Control: <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5®	90

CAPÍTULO III

Figure 1	Response surface plot (A, C and E) and contour graph (B, D and F) for EPS production (mg/mL) as a function of sucrose concentration (%), temperature (°C) and initial pH after 48 h of fermentation of <i>L. pseudomesenteroides</i>	111
-----------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

Figure 2	Kinetic curves of growth, substrate consumption and extracellular metabolite production associated with <i>L. pseudomesenteroides</i> JF17 grown in MRS broth supplemented with sucrose at 20 °C and initial pH 7.30 (optimized conditions). All values are the mean of three experiments	113
-----------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

CAPÍTULO IV

Figure 1	HPLC Chromatogram showing the glucose monomer from EPS produced by JF17	133
Figure 2	FT-IR spectrum of EPS produced by <i>L. pseudomesenteroides</i> JF17 at the region 3000 and 400/cm.....	134
Figure 3	¹ H (A) and ¹³ C (B) NMR of EPS by <i>L. pseudomesenteroides</i> JF17 (400 MHz, in D ₂ O)	136
Figure 4	Analysis of TGA (A) and DSC (B) of EPS produced by JF17 strain.....	138
Figure 5	Scanning electron microscopy showing the surface morphology of the EPS at various magnifications at 500× (A), 2000× (B), 5000× (C), 10000× (D).....	139
Figure 6	Antioxidant activities by scavenging activity of the radicals: DPPH (A), hydroxyl (B) e ABTS [•] (C) from EPS by <i>L. pseudomesenteroides</i> JF17 and ascorbic acid. Data are presented as the mean ± SD of the triplicates.....	142

CAPÍTULO V

Figure 1	Viscosity as a function of the shear rate of aqueous solutions, including 0.5, 1.0, 2.0 % dextran-JF17 and 0.5 % commercial guar gum (A), and 1.0, 2.0 % commercial guar gum (B).....	160
Figure 2	Photomicrographs of emulsions prepared with 1 % (w/v) of (a) dextran-JF17, (b) guar gum (40 ×) with soybean oil.....	165

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1	Diferentes exopolissacarídeos (EPS) produzidos por microrganismos	43
Tabela 2	Diferentes exopolissacarídeos (EPS) produzidos por bactérias ácido lácticas de diferentes fontes alimentares	48

CAPÍTULO II

Table 1	Autoaggregation percentage of <i>L. lactis</i> J7 and <i>L. pseudomesenteroides</i> JF17.....	87
Table 2	Coaggregation percentage with the <i>L. lactis</i> J7 and <i>L. pseudomesenteroides</i> JF17 strains against pathogens, <i>E. coli</i> ATCC 25922 and <i>S. enteritidis</i> ATCC 13076.....	87

CAPÍTULO III

Table 1	Coded and real values, and the response obtained by the application of CCF during fermentation by <i>L. pseudomesenteroides</i> JF17.....	107
Table 2	Analysis of variance (ANOVA) of quadratic models for the EPS production after fermentation by <i>L. pseudomesenteroides</i> JF17	109
Table 3	Predicted and experimental values of EPS production under optimal conditions for fermentation by <i>L. pseudomesenteroides</i> JF17	112
Table 4	Model parameters for EPS production of <i>L. pseudomesenteroides</i> JF17.....	115

CAPÍTULO V

Table 1	Physicochemical properties of the dextran-JF17 produced by <i>L. pseudomesenteroides</i> JF17.....	157
Table 2	Effect of various concentrations of aqueous solutions of dextran-JF17 and commercial guar gum on the rheological parameters	159
Table 3	Technical-functional properties of dextran-JF17 and commercial guar gum	161
Table 4	Emulsification activity of dextran-JF17 or commercial guar gum (1.0 % w/v, aqueous solutions) at different time intervals.....	163

Table 5	Textural properties of viscous solution of dextran-JF17 (2% w/v) and guar gum gel (2% w/v)	166
----------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS•+	Radical 2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfate acid)
ATP	Adenosina trifosfato
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BAL	Bactérias ácido lácticas
CCF	Face-centered central composite
CFU	Colony forming unit
DNA	Deoxyribonucleic acid
DPPH•	Radical 2,2-Diphenyl- 1-picrylhydrazyl
DSC	Differential scanning calorimeter
EC	Emulsifying capacity
EA	Emulsifying activity
EPS	Exopolissacarídeos
FAO	Food and Agriculture Organization
FTF	Frutosil transferase
FDA	Food and Drug Administration
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscop
GIT	Tolerance to simulated gastrointestinal
GRAS	Generally Recognized as Safe
GTF	Glicosil transferase
HEPS	Heteropolissacarídeos
HOPS	Homopolissacarídeos
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
LAB	Lactic acid bacteria
MRS	De Man, Rogosa e Sharpe
NGS	Sequenciamento de Nova Geração - Next Generation Sequencing
NMR	Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy
OHC	Oil holding capacity
PP	Productivity of EPS
PCR	Polymerase chain reaction
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	Ribonucleic acid

rRNA	RNA ribossomal
RSM	Response surface methodology
SEM	Scanning electron microscopy analysis
TGA	Thermogravimetric analysis
TPA	Texture profile analysis
UFC	Unidades formadoras de colônias
UTO	Unidades Taxonômicas Operacionais
WSI	Determination of water solubility index
WHC	Water holding capacity
WHO	World Health Organization
YX/S	Growth yield on total sugar
YP/X	EPS yield on cell growth
μ_X	Specific cell growth rate
α	Yield of product synthesis per log CFU produced
β	Specific rate of non-growth associated product synthesis

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	18
OBJETIVOS	20
OBJETIVO GERAL	20
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
REFERÊNCIAS	21
CAPÍTULO I	23
1 REFERENCIAL TEÓRICO	24
1.1 JUÇARA	24
1.2 MICROBIOTA NATIVA DE FRUTOS.....	27
1.3 SEQUENCIAMENTO DE GENOMAS.....	29
1.4 BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS.....	32
1.4.1 Probióticos.....	33
1.5 BIOTECNOLOGIA MICROBIANA.....	36
1.5.1 Metabólitos produzidos por Bactérias Ácido Láticas.....	38
1.6 POLISSACARÍDEOS MICROBIANOS	42
1.6.1 Exopolissacarídeos produzidos por Bactérias Ácido Láticas	44
1.6.2 Dextrana	49
1.6.3 Caracterização de Exopolissacarídeos.....	51
1.6.4 Avaliação Tecnológica de Exopolissacarídeos	53
1.6.4.1 Propriedade reológica.....	53
1.6.4.2 Propriedade de emulsão.....	55
1.6.5 Exopolissacarídeos - Potenciais Benefícios à Saúde.....	56
REFERÊNCIAS	58
CAPÍTULO II	76
CAPÍTULO III	98

CAPÍTULO IV	122
CAPÍTULO V	149
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	173
ANEXOS	175

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui grande diversidade de biomas e a Mata Atlântica se destaca pela riqueza de seus frutos (RIGUEIRA; DA ROCHA; MARIANO-NETO, 2013). Os frutos em geral, são importantes habitats para uma variedade de espécies de microrganismos na natureza, devido à alta concentração de açúcares, baixo pH e intensa visitação por insetos vetores (LACHANCE et al., 2001). Estes microrganismos autóctones dos frutos, denominados de microbiota, têm sido amplamente identificados, isolados e descritos por apresentarem distintas propriedades biotecnológicas (MARCHESI; RAVEL, 2015).

Considerando a diversidade fértil da Mata Atlântica, a palmeira Juçara (*Euterpe edulis* Martius) tem destaque. É reconhecida por produzir um palmito de excelente qualidade comercial (BICUDO; RIBANI; BETA, 2014), o que levou à exploração extrativista e ao esgotamento da espécie nas reservas naturais. Entretanto, uma das estratégias para o manejo da palmeira, seria a exploração sustentável de seus frutos (CHAIMSOHN; CHIQUETTO, 2013). Frutos da juçara, além de serem ricos em fonte de ácidos graxos, proteínas, fibras, minerais, vitaminas e compostos bioativos (BORGES et al., 2011), também podem apresentar uma rica diversidade microbiana.

Alguns dos microrganismos frequentemente isolados de frutos são bactérias ácido lácticas (BAL) sendo estes altamente capazes de sintetizar diversos compostos ao longo de suas respectivas vias metabólicas. As BAL fermentam principalmente glicose e lactose para produzir ácido láctico. Contudo, em decorrência da nova engenharia metabólica, diversos outros metabólitos produzidos pelas BAL, que não o ácido láctico, vem sendo estudados, como os exopolissacarídeos (EPS) (DEMAIN, 2000; HUGENHOLTZ et al., 2002). Além disso, as BAL têm uma ampla gama de aplicações como organismos probióticos por renderem benefícios multifatoriais para humanos e outros animais (VIDHYASAGAR; JEEVARATNAM, 2013). Segundo a FAO/WHO (2002) os probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro.

EPS são polímeros de carboidratos, extracelulares, produzidos e secretados por microrganismos, que se acumulam fora das células (MOSCOVISCI, 2015). A produção de EPS é bem documentada entre várias espécies de BAL pertencentes a *Leuconostoc* spp., *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp. e *Streptococcus* spp. (SARAVANAN; SHETTY, 2016). Estruturalmente dois tipos de EPS, homopolissacarídeos e heteropolissacarídeos, podem ser produzidos por BAL, formados por um e dois ou mais tipos de monossacarídeos, respectivamente (ZANNINI et al., 2016). Na indústria de alimentos, os EPS são usados como

espaesantes devido às suas propriedades estabilizantes, emulsificantes ou gelificantes. Além disso, tem sido sugerido que alguns EPS produzidos por BAL podem conferir benefícios à saúde dos consumidores, como atividade antioxidante (WANG et al., 2014).

Neste contexto, o presente estudo propõe identificar novos candidatos probióticos a partir de BAL isoladas de frutos de juçara, caracterizando-os por técnicas de biologia molecular, além de verificar a produção de exopolissacarídeo. Examinar as características estruturais do EPS isolado, avaliar a viscosidade, propriedades físico-químicas, antioxidantes, térmicas e funcionais, especialmente a formação de emulsão, capacidade de absorção de água e óleo e formação de gel.

Para facilitar a organização e o entendimento do leitor sob a pesquisa realizada, a tese foi dividida em cinco capítulos: I - Referencial Teórico; II - Artigo 1: Evaluation of lactic acid bacteria strains isolated from native Atlantic Forest juçara fruit for probiotic properties *in vitro*; III - Artigo 2: Statistical optimization of exopolysaccharide production by *Leuconostoc pseudomesenteroides* JF17 from native Atlantic Forest juçara fruit; IV - Artigo 3: Characterization and antioxidant activity of an exopolysaccharide produced by *Leuconostoc pseudomesenteroides* JF17 from juçara fruits (*Euterpe edulis* Martius); V - Artigo 4: Techno-functional properties of a dextran produced by *Leuconostoc pseudomesenteroides* JF17 from juçara palm fruit (*Euterpe edulis* Martius); sendo concluída com as considerações finais sobre todos os temas abordados.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi identificar novos candidatos probióticos a partir de bactérias ácido lácticas isoladas de frutos de juçara e, sobretudo verificar a produção, isolar e caracterizar o exopolissacarídeo

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e identificar bactérias ácido lácticas nativas do fruto de juçara;
- Verificar potencial probiótico de *Leuconostoc pseudomesenteroides* JF17 e *Lactococcus lactis* J7 isolados de fruto juçara;
- Verificar a produção de exopolissacarídeo por *L. pseudomesenteroides* JF17 isolado de fruto juçara;
- Otimizar da produção de exopolissacarídeo;
- Caracterizar a estrutura química, propriedades térmicas e a capacidade antioxidante do exopolissacarídeo;
- Analisar as propriedades, reológicas, físico-químicas e funcionais do exopolissacarídeo.

REFERÊNCIAS

- BICUDO, M. O. P.; RIBANI, R. H.; BETA, T. Anthocyanins, Phenolic Acids and Antioxidant Properties of Juçara Fruits (*Euterpe edulis M.*) Along the On-tree Ripening Process. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 69, p. 142–147, 2014.
- BORGES, G. S. C., VIEIRA, F. G. K., COPETTI, C., GONZAGA, L. V., ZAMBIAZI, R. C., FILHO, J. M., FETT, R. Chemical characterization, bioactive compounds, and antioxidant capacity of Jussara (*Euterpe edulis*) fruit from the Atlantic Forest in southern Brazil. **Food Research International**, v. 44, p. 2128–2133, 2011.
- CHAIMSOHN, F. P.; CHIQUETTO, N. C. Construção do marco legal para a produção de açaí de juçara: contribuições da “oficina interestadual sobre legislação, comercialização e marketing para exploração de frutos da palmeira juçara. **Revista Conexão UEPG**, Ponta Grossa, v. 9, n. 2, jul./dez. 2013.
- DEMAIN, A. L. Microbial biotechnology. **Trends Biotechnology**, v.18, n. 1, p. 26-31, 2000.
- FAO/WHO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION/ WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for Evaluation of Probiotics in Food**. London, Ontario, Canada, 30 April and 01 May, 2002. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf>. Acesso em: 02/08/2017.
- HUGENHOLTZ, J.; SYBESMA, W.; GROOT, M. N.; WISSELINK, W.; LADERO, V.; BURGESS, K.; VAN SINDEREN, D.; PIARD5, J. C.; EGGINK, G.; SMID, E. J.; SAVOY, G.; SESMA, F.; JANSEN, T.; HOLS, P.; KLEEREBEZEM, M. Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the production of nutraceuticals. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 82, p. 217-235, 2002.
- LACHANCE, M. A.; STARMER, W. T.; ROSA, C. A.; BOWLES, J. M.; BARKER, J. S.; JANZEN, D. H. Biogeography of the yeast of ephemeral flowers and their insects. **FEMS Yeast Research**, v. 1, n. 1, p. 1-8, 2001.
- MARCHESE, J. R.; RAVEL, J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. **Microbiome**, v. 1, p. 1-3, 2015.
- MOSCOVICI, M. Present and future medical applications of microbial exopolysaccharides. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 2015. doi.org/10.3389/fmicb.2015.01012.
- RIGUEIRA, D. M. G.; DA ROCHA, P. L. B.; MARIANO-NETO, E. Forest cover, extinction thresholds and time lags in woody plants (myrtaceae) in the Brazilian Atlantic forest: Resources for conservation. **Biodiversity & Conservation**, 22, 3141–3163, 2013.
- SARAVANAN, C.; SHETTY, P. K. H. Isolation and characterization of exopolysaccharide from *Leuconostoc lactis* KC117496 isolated from idli batter. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 90, p. 100–106, 2016.

WANG, K.; LI, W.; RUI, X.; CHEN, X.; JIANG, M.; DONG, M. Characterization of a novel exopolysaccharide with antitumor activity from *Lactobacillus plantarum* 70810. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 63, p. 133– 139, 2014.

ZANNINI, E.; WATERS, D.; COFFEY, A.; ARENDY, E. K. Production, properties, and industrial food application of lactic acid bacteria-derived exopolysaccharides. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.100, p.1121–1135, 2016.

CAPÍTULO I

1. REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 JUÇARA

Juçara (*Euterpe edulis* Martius) (Figura 1) é uma palmeira pertencente à família Arecaceae e gênero *Euterpe*, nativa da Mata Atlântica, podendo ser encontrada da região sul do estado da Bahia até o norte do estado do Rio Grande do Sul (BICUDO; RIBANI; BETA, 2014). Produz um tipo nobre de palmito com alta qualidade sensorial, entretanto sua exploração extrativista tem proporcionado o esgotamento da espécie em suas reservas naturais (BORGES et al., 2011).

Figura 1. Palmeira juçara (*Euterpe edulis* Martius)



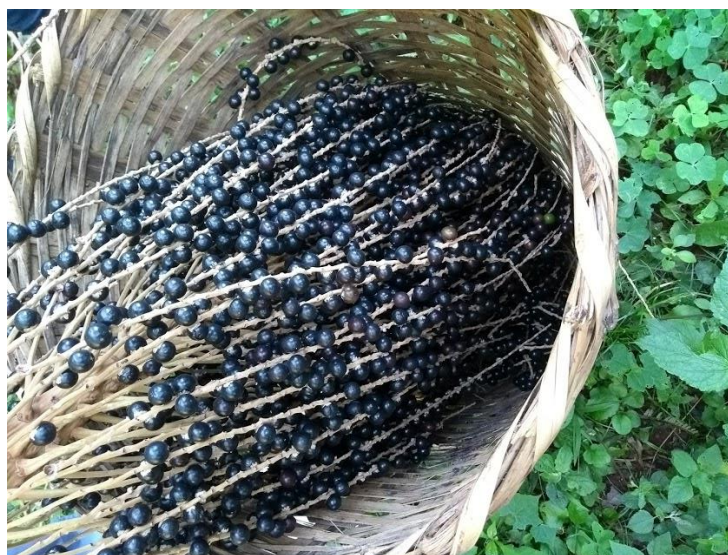
Fonte: O próprio autor.

A extração predatória do palmito juçara e seu crescimento lento, sem capacidade de rebrota, incluiu a *Euterpe edulis* Martius na lista oficial das espécies da flora brasileira que enfrentam um risco de extinção elevado na natureza de acordo com o Centro Nacional de Conservação da Flora (CNCFLORA, 2012). Ao contrário de outras espécies de palmeiras, a juçara não se regenera após o corte e sua extração inapropriada contribui para a degradação e diminuição da população nativa (REIS; MARIOT; MANTOVANI, 2008).

Uma alternativa sustentável para a preservação da juçara, é explorar seus frutos, já que o palmito demora de cinco a oito anos para chegar ao estágio de corte, enquanto a coleta de frutos pode ser feita ano após ano com a mesma planta (BRASIL, 2016). A utilização do fruto pode ser uma atividade mais lucrativa do que a própria extração do palmito, e suas sementes podem ser reutilizadas para o replantio, produção de artesanato e adubação orgânica (CHAIMSOHN; CHIQUETTO, 2013). Em algumas regiões, a extração do fruto é uma realidade alternativa de trabalho para famílias das regiões da Mata Atlântica, sendo os próprios trabalhadores atuantes na conservação da espécie (CHAIMSOHN; CHIQUETTO, 2013).

As bagas de juçara são geralmente utilizadas na forma de polpa ou suco, sendo o pericarpo macerado, misturado com água e separado das sementes, obtendo-se um líquido espesso, com intensa cor púrpura escura e sabor característico (BORGES et al., 2011). O fruto da juçara é não climatérico, esférico, com diâmetro de cerca de 1 a 1,5 cm, que se desenvolve em cachos (Figura 2). A semente constitui 85 % do fruto e o epicarpo evolui de verde para roxo escuro, durante o processo de amadurecimento, de forma semelhante ao açaí (*Euterpe oleracea* e *Euterpe precatoria*) (BICUDO; RIBANI; BETA, 2014).

Figura 2. Cacho de fruto da palmeira juçara



Fonte: O próprio autor.

Além da importância ecológica, os frutos apresentam significativo valor nutricional, devido à alta concentração de lipídios (18,45 - 44,08 %) principalmente, ácido oleico (44,17 - 55,61 %) e ácido linoleico (18,19 - 25,36 %), proteínas (5,13 - 8,21 %), cinzas (1,55 - 3,32 %) e vitamina C ($186 \pm 43,3$ mg / 100g). Apresentam também considerável teor de compostos

fenólicos totais ($2610,86 \pm 3,89$ mg GAE / 100 g), principalmente ácido protocatecuico ($2,43 \pm 0,19$ mg/100g), taxifolina ($2,29 \pm 0,10$ mg / 100g), quercetina ($1,48 \pm 0,03$ mg / 100g) aromadendrina ($2,88 \pm 0,10$ mg / 100g) e antocianinas ($1080,54 \pm 2,33$ mg de cian-3-glu / 100 g), que proporcionam ao fruto elevada atividade antioxidante ($6174,34 \pm 148,34$ μ M de Trolox / g) (RUFINO et al., 2010; BORGES et al., 2011; SCHULZ et al., 2015).

Os frutos são considerados fonte energética e com propriedades funcionais (CARDOSO et al., 2015), especialmente devido à sua alta capacidade antioxidante. Os antioxidantes são capazes de diminuir ou mesmo bloquear as reações de oxidação induzidas por radicais livres, exercendo funções benéficas à saúde e atuando na prevenção de doenças (OROIAN; ESCRICHE, 2015). Além disso, de acordo com Felzenszwalb et al. (2013) os frutos de juçara não têm efeitos adversos na saúde humana e, portanto, podem contribuir para o desenvolvimento de novos fármacos ou serem incorporados como ingredientes em muitos alimentos.

Visto isto, estudos com frutos juçara têm demonstrado potenciais benefícios à saúde, principalmente devido sua alta capacidade antioxidante e a incorporação da polpa em alimentos a fim de promover seu enriquecimento. Miranda et al. (2020) ao desenvolverem balas de gelatina sabor juçara e maracujá com *Bacillus coagulans* GBI-30 6086, obtiveram excelente aceitabilidade e sugeriram viabilidade industrial de substituição de corantes artificiais por polpa de juçara, sendo fonte de compostos bioativos e com potencial no mercado de balas.

Também, Cardoso et al. (2015) avaliaram os efeitos do consumo de suco de juçara em onze voluntários saudáveis. Amostras de sangue foram coletadas antes e 1, 2 e 4 h após a ingestão de suco ou água (controle), para medir a atividade antioxidante por redutor férrico, ácido úrico, glutathione reduzida, glutathione peroxidase, superóxido dismutase, catalase e hidroperóxidos lipídicos. Os resultados indicaram um efeito positivo do consumo de suco de juçara sobre o estado antioxidante e o dano oxidativo celular dos indivíduos, além da redução do conteúdo de hidroperóxidos lipídicos.

Guergoletto et al. (2016) investigaram o potencial de fermentação *in vitro* da polpa de juçara pela microbiota intestinal humana. Os testes mostraram que o fruto modulou a microbiota intestinal, promovendo mudanças nas populações microbianas e ácidos graxos de cadeia curta, levando a um aumento significativo no número de bifidobactérias, o que foi capaz de evidenciar o potencial prebiótico da juçara.

Oyama et al. (2016) avaliaram o efeito da administração de polpa de frutos juçara em camundongos alimentados com dieta rica em gordura e alto teor calórico. Os autores sugeriram que, com a administração de 0,5 % de polpa, os efeitos antioxidantes dos polifenóis superaram

os efeitos deletérios da composição de macronutrientes da polpa, o que melhorou a resposta glicêmica em animais que tiveram dietas em níveis normocalóricos, hipercalóricos e hiperlipídicos.

Contudo, há uma escassez de dados na literatura relacionados à diversidade microbiana em juçara. Estudos direcionados à redução de carga microbiana patogênica de polpa dos frutos após tratamento térmico, observaram que posteriormente ao processamento a 100 °C por 5 segundos, redução superior a 81 % de coliformes totais, e superior a 99% de bolores e leveduras, indicaram que houve controle microbiológico do extrato aquoso dos frutos de juçara, proporcionando um produto adequado para o consumo humano, conforme padrões legais vigentes (Castro et al. (2016). No mesmo sentido, Da Silva et al. (2011), verificaram que o tratamento por irradiação reduziu o valor de D_{10} calculado a partir da curva de sobreviventes de *Escherichia coli* em polpa de juçara.

Também foi relatado por De Castilho et al. (2020) que a diversidade de bactérias promotoras do crescimento das plantas, poderia colaborar para o cultivo de palmeiras juçara. Segundo os autores, as comunidades associadas à palmeira juçara incluem principalmente os gêneros *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Burkholderia*, *Rhizobium* e *Gluconobacter*. Do total de isolados bacterianos, 42,2 % foram solubilizantes de fosfato eficientes, sendo o gênero *Burkholderia* o mais comum e o gênero *Pseudomonas* o mais frequente entre os isolados produtores de sideróforos (14,6 %). Além disso, a *Burkholderia* e a *Pseudomonas* foram as mais capazes de produzir auxinas (80,2 %).

Embora a microbiota patogênica e da rizosfera de juçara tenham sido estudadas, até o momento, não foram encontrados relatos de estudos potenciais da aplicação tecnológica de microbiota nativa dos frutos. Neste sentido, o grupo de pesquisa Biopro (CNPq) orientado pela professora Sandra Garcia (Pós-graduação em Ciência de Alimentos, UEL), tem isolado microrganismos autóctones de frutos de juçara com propriedades industriais. Farinazzo et al. (2020) identificaram uma bactéria ácido láctica, *Leuconostoc pseudomesenteroides* JF17, isolada de frutos juçara, capaz de sintetizar uma dextrana com ligações α -(1→6). O exopolissacarídeo apresentou alta capacidade de retenção de água, estabilidade térmica e boa capacidade de sequestrar os radicais ABTS^{•+}, DPPH[•] e radicais hidroxila.

1.2 MICROBIOTA NATIVA DE FRUTOS

O avanço das plataformas analíticas de DNA/RNA, proteínas e metabólitos, combinado com o aumento das tecnologias de computação, transformou o campo da análise da comunidade

microbiana. Esta rápida evolução foi acompanhada pelo desenvolvimento de novas pesquisas de reconhecimento da identidade microbiológica de diferentes nichos (MARCHESI; RAVEL, 2015). Atualmente, o estudo de microrganismos autóctones de plantas está em ascensão, o que pode ser verificado a partir do crescente número de publicações sobre o assunto. Nesse sentido, os esforços têm se concentrado na caracterização de novas bactérias, principalmente bactérias ácido lácticas, cepas de vegetais e frutas com base em seus atributos tecnológicos e funcionais (TORRES et al., 2020).

São compreendidos como iniciadores autóctones aqueles microrganismos isolados de um vegetal cru ou alimento vegetal fermentado de origem geográfica particular, utilizados na fermentação de uma mesma matriz vegetal. As plantas não crescem como organismos isolados na natureza, mas hospedeiras de uma comunidade diversificada de microrganismos, denominada microbiota. Além disso, há uma crescente conscientização de que a microbiota da planta desempenha um papel no crescimento vegetal e pode protegê-lo de patógenos invasores (SCHLAEPI; BULGARELLI, 2015).

A microbiota é o conjunto dos microrganismos presentes em um ambiente definido. O termo microbiota foi definido pela primeira vez por Lederberg e McCray em 2001, que enfatizaram a importância dos microrganismos que habitam o corpo humano. Este levantamento microbiano foi estabelecido usando métodos moleculares que dependeram predominantemente da análise de genes de rRNA 16S e 18S ou outros genes marcadores e regiões genômicas, amplificados e sequenciados a partir de amostras biológicas (MARCHESI; RAVEL, 2015).

As frutas são importantes micro-habitat para uma variedade de espécies de microrganismos na natureza, devido à alta concentração de açúcares simples, baixo pH e intensa visitação por insetos vetores (LACHANCE et al., 2001). Esta microbiota pode ser composta por bactérias ácido lácticas como *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus* spp, *Pediococcus* spp, *Leuconostoc mesenteroides* e *Weissella* spp, responsáveis principalmente, pela fermentação natural de frutas e vegetais crus (BAJPAI et al., 2016; MICHALAK et al., 2018; MAIDANA et al., 2020); leveduras como *Saccharomyces cerevisiae*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Zygorhiza* spp e *Candida* spp (HONG et al., 2019; PORRU et al., 2018); fungos como *Rhizopus* spp (AOKI et al., 2003); entre outros.

Estudos têm demonstrado como vegetais ou produtos vegetais fermentados constituem uma fonte valiosa de microrganismos. Esse tipo de produto é explorado rotineiramente em busca de novos microrganismos autóctones com características tecnológicas e promotoras da

saúde que possam ser utilizados como probióticos ou starters em processos fermentativos controlados de alimentos vegetais funcionais (TORRES et al., 2020).

Benavides et al. (2016) estudaram as características probióticas e as propriedades antagonicas *in vitro* de algumas bactérias ácido lácticas de nichos nativos das florestas tropicais e subtropicais do Equador. As amostras consistiam em frutos (*Citrus sinensis*, *Rubus* sp., *Psidium guajava*, *Fragaria vesca*, *Bactris gasipaes*) e inflorescências de flores (*Heliconia* sp., *Fucsia* sp., *Bromelia* sp.). Os isolados sobreviveram em pH entre 2,5 a 4,5 na presença de 0,3 % de bile e cresceram sob condições de concentração de cloreto de sódio de até 6 %. Em pH 3,0 e 4,0, os isolados exibiram aumento da atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli* e *Salmonella* spp.

Filannino et al. (2013) observaram um aumento da atividade antioxidante, ácidos graxos livres e melhores atributos sensoriais em suco de romã fermentada com *L. plantarum* isolados previamente de cenoura e tomate. A fermentação aumentou a concentração de ácido elágico e a atividade antimicrobiana. Os sucos fermentados eliminaram as espécies reativas de oxigênio geradas por H₂O₂ e modularam a síntese de mediadores imunológicos a partir de células mononucleares do sangue periférico (PBMC). Além disso, inibiram o crescimento de células tumorais K562. Assim, a fermentação do suco de romã por culturas nativas de vegetais representaria uma nova opção de tecnologia, com recursos promotores da saúde.

Isolamento e caracterização probiótica de bactérias frutofílicas do ácido láctico de flores e frutas da China foi realizado por Sakandar, Kubowc e Sadiq (2019). *Fructobacillus fructosus*, *Lactobacillus kunkeei*, *F. pseudoficulneus* e *F. durionis*, foram caracterizados quanto ao metabolismo de carboidratos e potencial probiótico. As cepas de *L. kunkeei* mostraram alta capacidade de tolerar níveis de pH baixos (2,0, 2,5 e 3,0) e concentrações de sais biliares (0,2 e 0,4%), juntamente com efeitos na assimilação do colesterol, atividade antipatogênica e hidrofobicidade. As cepas frutofílicas preferiram D-frutose em vez de D-glicose e, portanto, segundo os autores estas cepas apresentaram-se potenciais para uso na fermentação de cereais.

1.3 SEQUENCIAMENTO DE GENOMAS

O sequenciamento de genomas é uma técnica que permite identificar a sequência de nucleotídeos de uma molécula de DNA ou RNA, com o objetivo de conhecer a informação genética contida na estrutura. Este sequenciamento é feito a partir de moléculas de DNA do DNA genômico, aquele que contém a maior parte da informação genética dos organismos, ou

de outras moléculas de DNA celular como: DNA mitocondrial, DNA cloroplastídico, DNA plasmidial, dentre outros (KOCH; ANDRADE, 2008).

O primeiro método popular de sequenciamento de DNA foi o de terminação de cadeia de Sanger, publicado em 1977, pelo cientista inglês Fred Sanger. Este método marcava os fragmentos de DNA sintetizados a partir da fita molde que só foi possível graças ao desenvolvimento da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – do inglês, *Polymerase chain reaction*), que consiste na síntese *in vitro* de uma fita de DNA complementar a um DNA molde, utilizando componentes básicos da replicação celular (FIETTO; MACIEL, 2015).

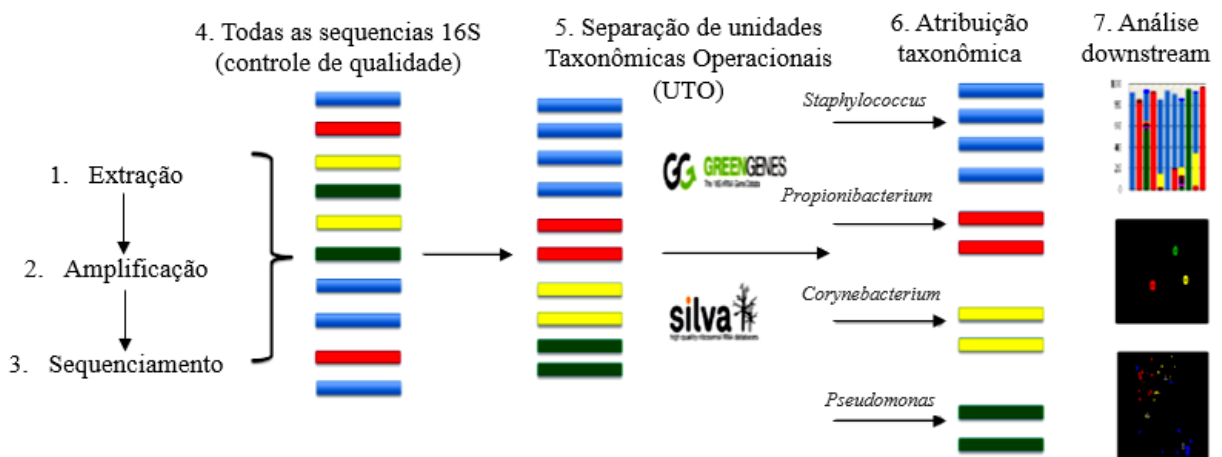
O método de Sanger foi o único de sequenciamento de ácidos nucleicos utilizado nas três décadas seguintes, servindo de base para a era genômica na biologia. Avanços recentes e acessibilidade de novos métodos de detecção, permitiram a identificação de organismos anteriormente não identificáveis e não cultiváveis. As novas tecnologias de sequenciamento começaram a ser comercializadas em 2005 e tem evoluído rapidamente ao longo de anos, sendo capazes de promover o sequenciamento de DNA em plataformas que geram informação sobre milhões de pares de bases em uma única corrida (FIETTO; MACIEL, 2015).

Dentre as novas plataformas de sequenciamento de DNA, o Sequenciamento de Nova Geração (NGS - do inglês, *Next Generation Sequencing*), forneceu abordagens moleculares não direcionadas, capazes de caracterizar a ecologia microbiana completa de determinados nichos (VARUZZA, 2013; FIETTO; MACIEL, 2015). O princípio da metodologia NGS é similar ao método proposto por Sanger, pois ambas usam a síntese de uma fita complementar ao DNA alvo, empregando DNA polimerase e nucleotídeos terminadores marcados com diferentes fluoróforos. Entretanto no NGS, os processos de sequenciamento de DNA objetivam acelerar e baixar o custo do processo de sequenciamento. Um sequenciador de eletroforese processa, no máximo 96 fragmentos por vez, os NGS podem ler até bilhões de fragmentos ao mesmo tempo (VARUZZA, 2013).

O sequenciamento de *amplicons* na tecnologia NGS utiliza *primers* universais visando o gene 16S do RNA ribossomal (rRNA), que é onipresente em todas as bactérias. A Figura 3 fornece uma visão geral das etapas usadas na sequência 16S, desde as amostras até análise dos dados. A comparação das sequências do gene 16S em amostras com bancos de dados contendo sequências 16S conhecidas, permite uma abordagem não-direcionada para a identificação das comunidades microbianas (BARDY; PSALTIS, 2016).

Figura 3. Descrição do sequenciamento do gene 16S rRNA. Etapa 1: O DNA é extraído de amostras; Etapa 2: Uma reação em cadeia de polimerase com primers universais amplifica as

cópias do gene 16S de todas as bactérias presentes na amostra, formando amplicons; Etapa 3: Os amplicons são sequenciados na plataforma de Sequenciamento de Nova Geração (NGS); Etapa 4: As sequências são submetidas ao controle de qualidade e; Etapa 5: Seguindo o controle de qualidade, as sequências são agrupadas em Unidades Taxonômicas Operacionais (UTO) com base em sua identidade de sequência (geralmente definida em > 97 % de similaridade); Etapa 6: A atribuição taxonômica de UTO fornece aos pesquisadores resultados informativos que podem ser usados em análises posteriores. Uma série de bancos de dados pré-curados de sequências 16S disponíveis que podem ser usados para atribuição taxonômica; Etapa 7: A abundância relativa e riqueza (número de unidades taxonômicas identificadas em uma amostra) então serão estabelecidas para posterior análise.



Fonte: adaptado de BARDY; PSALTIS, 2016

Desde 2006, a Illumina Inc. tornou disponível uma tecnologia capaz de gerar cerca de 100 milhões de segmentos de leitura por corrida. Inicialmente a metodologia produzia sequências com um comprimento de apenas 36 bases, mas em 2011 o trabalho conjunto de quatro companhias: Solexa, Lynx Therapeutics, Manteia Predictive Medicine e Illumina, resultou no desenvolvimento do sequenciador Illumina Genome Analyser, capaz de gerar até 600 Gb com segmentos de 76 pares de base em média. Equipamentos ainda mais recentes da tecnologia permitem leitura de segmentos de DNA de 100 bases em média (ILLUMINA, 2016).

A plataforma Illumina é a mais utilizada, produzindo leituras com comprimentos que variam de 25 a 600 bases em uma velocidade maior e custos mais baixos do que o sequenciamento de Sanger. Dado o comprimento reduzido de leituras obtidas, seu uso na montagem de genomas demanda a utilização de coberturas maiores. A superação dos desafios existentes na montagem de genomas complexos depende de avanços nas tecnologias de

sequenciamento no que diz respeito a melhorias no rendimento, custo, números de leituras e precisão, o que vem gerando novas tecnologias que têm sido desenvolvidas para suprir essas demandas (SCHATZ; WITKIWSKI; MCCOMBIE, 2012).

1.4 BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Bactérias ácido lácticas (BAL) consistem em um grupo filogenético diversificado com características morfológicas, metabólicas e fisiológicas comuns. São Gram-positivas, catalase-negativas, e crescem preferencialmente sob condições de microaerofilia ou anaerobiose facultativa. Apresentam-se na forma de cocos ou bacilos imóveis não esporulados, obtendo energia pela fermentação de carboidratos com produção de ácido láctico como principal produto da glicose (KLEIN et al., 2003). Estão amplamente distribuídas na natureza, presentes na microbiota de solo, plantas (BAKAR et al., 2017; MCFREDERICK; VUONG; ROTHMAN, 2018), trato intestinal de animais (AMIN et al., 2017) e humanos (WANG et al., 2020b), leite materno (REIS et al., 2016), alimentos fermentados (XU et al., 2020), entre outros.

A classificação taxonômica inclui o grupo BAL no reino Bacteria, filo *Firmicutes*, classe *Bacilli* e ordem *Lactobacillales* (QUINTO et al., 2014). Esta Ordem é por sua vez subdividida em 6 Famílias, *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae* e *Streptococcaceae*, compreendendo mais de 500 espécies e subespécies; e os gêneros *Abiotrophia*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Paralactobacillus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Canvivina*, *Fructobacillus*, *Weissella* (PATRICK, 2012; ZHENG et al., 2020).

A identificação de BAL é baseada nos critérios declarados por Orla-Jensen em 1919, que inclui morfologia, modo de fermentação de glicose, faixas de temperatura de crescimento, e posteriormente análise filogenética baseada nas sequências do gene 16S rRNA. Além disso, como algumas espécies de BAL compartilham grandes semelhanças de sequência dentro dos grupos, alguns genes de manutenção são usados como marcadores alternativos. Atualmente, o sequenciamento do genoma completo é uma ferramenta comum para a identificação de BAL (MORA-VILLALOBOS, 2020).

De acordo com a International Dairy Federation, diversas BAL têm sido usadas há séculos na preparação e preservação de alimentos e são geralmente reconhecidas como seguras (GRAS – do inglês, *Generally Recognized as Safe*). Dentre essas, encontram-se *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lactobacillus reuteri* e

Lactobacillus rhamnosus, os quais podem ser utilizados em produtos lácteos, cereais, frutas e legumes. As espécies *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, podem ser utilizadas como culturas iniciadoras em produtos lácteos, enquanto espécie *Leuconostoc mesenteroides*, pode ser aplicada em produtos lácteos e em legumes fermentados (MOGENSEN et al., 2002).

Assim, as BAL são amplamente usadas na indústria de alimentos por desempenharem papel importante na maturação, processamento e conservação dos alimentos. Estas bactérias podem ser utilizadas como culturas starters em fermentações e bebidas, pois multiplicam sob condições controladas e contribuem para a redução do teor de carboidratos dos alimentos e redução do pH devido a produção de ácidos orgânicos, principalmente ácido láctico. O pH pode ser tão baixo, como pH 4,0, e suficiente para inibir o crescimento da maioria dos outros microrganismos, incluindo os agentes patogênicos comuns, permitindo que estes alimentos tenham a vida útil prolongada (REDDY et al., 2008).

Industrialmente, além do ácido láctico as BAL podem produzir enzimas glicolíticas, lipolíticas e proteolíticas (LIMA et al., 2009), também produzem antimicrobianos, incluindo outros ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, bacteriocinas, reuterina, diacetil e acetaldeído (ZANG et al., 2020; FORSYTHE, 2002), que atuam favoravelmente nos produtos alimentares, e BAL formam parte dos microrganismos capazes de exercer efeitos benéficos ao hospedeiro (LIMA et al., 2009). Algumas BAL podem ainda ser usadas por secretarem polissacarídeos (FARINAZZO et al., 2020; PADMANABHAN; SHAH, 2020; BESROUR-AOUAM et al., 2021; SURBER et al., 2021) e terem a capacidade de sintetizarem algumas vitaminas (HATI et al., 2019). Além disso, as BAL têm uma ampla gama de aplicações como organismos probióticos por render benefícios para humanos e outros animais (VIDHYASAGAR; JEEVARATNAM, 2013; ABBASI et al., 2021; JITPAKDEE et al., 2021).

1.4.1 Probióticos

A palavra probiótico é derivada do grego e significa “em prol da vida” e a ela foram atribuídos diferentes significados através dos anos. A primeira observação da função positiva que algumas bactérias apresentavam foi atribuída a Elie Metchnikoff (1905). Em 1906, Henry Tissier sugeriu que estas bactérias poderiam ser administradas em pacientes com diarreia para ajudar a reestabelecer uma microbiota intestinal saudável (FAO/WHO, 2002). Entretanto, o termo probiótico foi proposto primeiramente apenas por Lilly e Stillwell em 1965, que descreveram que substâncias secretadas por um microrganismo estimulavam o crescimento de

outro. Portanto, significava exatamente o oposto de antibiótico e sua linhagem etimológica era irrepreensível. No entanto, seu uso nesta forma não persistiu e foi só em 1974 que Parker o usou a definição de “Organismos e substâncias que contribuíam para o equilíbrio microbiano intestinal”. Em uma tentativa de melhorar a definição, Fuller em 1989, redefiniu e popularizou o termo probiótico como “um suplemento de microrganismos vivos que afeta beneficemente o animal hospedeiro para melhorar o balanço microbiano intestinal” (FULLER, 1992). Em 2001, a Organização Conjunta para Alimentação e Agricultura das Nações Unidas (FAO) e a Organização Mundial da Saúde (WHO) definiram os probióticos como "microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício à saúde do hospedeiro" (FAO/WHO, 2002).

De acordo com as Diretrizes Mundiais da Organização Mundial de Gastroenterologia - WGO (2017), a dose de probióticos necessária varia em função da cepa e do produto. Embora muitos produtos de venda livre forneçam entre 10^9 - 10^{13} UFC/dose, alguns demonstraram ser eficazes em níveis mais baixos. Ainda segundo a organização, não é possível estabelecer uma dose geral necessária de probióticos, sendo que esta deve ser baseada em estudos com seres humanos que mostram benefícios para a saúde (WGO, 2017).

No Brasil, a RCD n° 241 de 2018 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), específica para os probióticos adicionados em alimentos, os requisitos de comprovação da segurança e dos benefícios à saúde. Os efeitos positivos devem ser comprovados por meio da alegação funcional ou de saúde aprovada para a linhagem adicionada no alimento, exceto quando houver disposição em contrário no regulamento técnico específico (BRASIL, 2018).

As bactérias probióticas mais amplamente utilizadas pertencem aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, mas outros microrganismos, como *Lactococcus* e *Enterococcus*, também são usados como componentes de preparações probióticas (MONTEAGUDO-MERA, et al., 2012). Nos últimos anos, o *Lactococcus lactis* ganhou importância não apenas por seu papel essencial na fabricação de laticínios, mas também por suas potenciais propriedades probióticas (ARCHACKA et al., 2019).

De acordo com a Anvisa a lista de microrganismos probióticos utilizados comercialmente no Brasil são *L. acidophilus*, *L. casei shirota*, *L. casei* variedade *rhamnosus*, *L. casei* variedade *defensis*, *L. paracasei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. animalis* (incluindo a subespécie *lactis*), *B. longum* e *Enterococcus faecium* (BRASIL, 2008b). Entretanto, pesquisas também têm sido conduzidas com os gêneros *Pediococcus*, *Leuconostoc*,

Propionibacterium e *Enterococcus* (DE PAULA et al.; 2015; HUANG et al., 2019; BHAGAT et al., 2020; TACHIBANA et al., 2020).

Embora os probióticos sejam, geralmente, considerados seguros (GRAS), a sua capacidade de produção de aminas biogênicas também deve ser levada em consideração (WANG; YANG; HUYCKE, 2020). De acordo com Colombo, Nero e Todorov (2020) ao analisarem isolados de BAL de indústria laticinista, *Lactobacillus* spp. (n = 11), *Pediococcus* spp. (n = 2), e *Weissella* spp. (n = 2), características e comportamento relativamente seguros foram encontrados. Nenhuma cepa apresentou produção fenotípica das características de virulência avaliadas e aminas biogênicas. Entretanto, a capacidade de descarboxilar aminoácidos foi observada em algumas cepas de BAL (LORENCOVÁ et al., 2012).

O gênero *Enterococcus*, pertencente à comunidade de BAL, que possui alguns membros do grupo considerados com propriedades probióticas, tem seu emprego ainda controverso, devido à possível presença de genes de virulência em algumas espécies. Por estas razões, há a necessidade de avaliação de toxicidade e determinantes patogênicos para os potenciais microrganismos empregados em alimentos (WANG; YANG; HUYCKE, 2020). Kim et al. (2020), verificaram potencial de virulência de *Enterococcus* em alimentos (n = 500) na Coréia do Sul. *E. faecalis* e *E. faecium* foram as espécies mais frequentemente identificadas em alimentos de origem animal. A presença de genes de virulência foi aparente em todas as espécies analisadas, exceto *E. durans*. Aproximadamente metade dos isolados (46,3%) apresentou mais de um determinante de virulência, principalmente *gelE* (gelatinase) (88,1%). No entanto, nenhum dos isolados de *Enterococcus* foi resistente à vancomicina.

Os principais critérios na seleção de cepas probióticas são tolerância ao ácido e aos sais biliares, resistência ao trato gastrointestinal, colonização temporária, atividade antagônica contra patógenos e boas propriedades tecnológicas (MAVROUDI, 2012). Outro critério importante da cultura probiótica é sua capacidade de aderir às células epiteliais intestinais para mediar os efeitos imunológicos benéficos. Devido às dificuldades na avaliação *in vivo* da adesão, as propriedades de adesão das bactérias são geralmente examinadas *in vitro*. Para tanto, são comumente utilizadas linhagens de células intestinais, muco intestinal imobilizado ou proteínas da matriz extracelular (TOPÇU; KAYA; KABAN, 2020).

Os mecanismos de ação dos probióticos variam para cada espécie, mas em geral, os benefícios estão relacionados ao fortalecimento do sistema imunológico, a redução da atividade enzimática fecal, a prevenção de doenças intestinais e de diarreias, tratamento e prevenção de infecções, de inflamações gastrointestinais e controle das infecções por *Helicobacter pylori* (DHILLON; GHOSH; GANGULI, 2007). Já foi também relatada potencial atividade

anticancerígena e o papel na redução do nível do colesterol (LEROY; DEVUYST, 2004), além de efeitos neurológicos e endocrinológicos (HILL et al., 2014).

1.5 BIOTECNOLOGIA MICROBIANA

A biotecnologia tem sido historicamente usada no processamento de alimentos, como na fabricação de pão, leite, vinho e cerveja. No entanto, com o advento da biotecnologia moderna, metabólitos microbianos e seus genes ou genomas têm potencial para serem explorados no setor de processamento de alimentos, especialmente nas áreas de fermentação de alimentos, enzimas e ingredientes alimentícios. A biotecnologia no setor de processamento de alimentos visa a seleção e o aprimoramento de microrganismos com o objetivo de melhorar o controle do processo, rendimento, eficiência e conseqüentemente a qualidade, segurança e consistência dos produtos processados (BHOWMIK; PATIL, 2018; MAURYA et al., 2021).

A partir destas tecnologias, os microrganismos puderam ser utilizados como fonte de agentes ativos, uma vez que produtos naturais tem um papel importante no desenvolvimento de fármacos para o tratamento de doenças. A tecnologia microbiana explora a riqueza microbiana para a produção de metabólitos e produtos microbianos como as enzimas, ácidos orgânicos, antibióticos, medicamentos e produtos farmacêuticos, em processos como proteína recombinante, fermentação, biorremediação e gestão de resíduos (RAJASEKARAN et al., 2008).

Os metabólitos são sintetizados durante o desenvolvimento dos microrganismos em suas distintas fases de crescimento. Nas células, após a incubação em meio de cultivo com nutrientes, o anabolismo está ativo e o conteúdo de RNA é aumentado. Ocorre um período sem crescimento celular aparente, que é conhecido como fase de latência. Durante esta fase, os metabólitos sintetizados são muito ativos e induzem prontamente a produção de enzimas. (FENG; CHEN; CHEN, 2018). Na fase de latência, por exemplo, 28 proteínas altamente expressas foram identificadas em *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ 157. Essas proteínas foram implicadas no metabolismo de nucleotídeos, resposta ao estresse, tradução, divisão celular, metabolismo de aminoácidos, glicólise e síntese de coenzimas (LARSEN et al. 2006).

Após a fase de adaptação a taxa de multiplicação celular é máxima, onde o crescimento é exponencial. Durante esta fase, o crescimento celular está equilibrado, sistemas enzimáticos e metabolismos ativos. Como a fase logarítmica do crescimento microbiano começa com sua demanda aumentada de nutrientes, mais enzimas extracelulares são produzidas e transportadas para degradar substratos em moléculas essenciais, conhecidos como metabólitos primários.

Estes metabólitos incluem: álcoois (etanol), aminoácidos (glutamato monossódico, lisina, treonina, fenilalanina, triptofano), nucleotídeos de sabor (ácido 5'-guanílico, ácido 5'-inosínico), ácidos orgânicos (acético, propiônico, succínico, fumárico, láctico), polióis (glicerol, manitol, eritritol, xilitol), polissacarídeos (xantana, gelana, dextrana), açúcares (frutose, ribose, sorbose) e vitaminas [riboflavina (B 2), cianocobalamina (B 12), biotina] (DEMAIN, 2000; FENG; CHEN; CHEN, 2018).

Devido à concentração limitada de nutrientes, as células entram na chamada fase estacionária de crescimento (HISS, 2001). Durante esta fase, a taxa de crescimento celular é zero; o número de células que se reproduzem é igual ao número de células que estão morrendo. Para evitar os efeitos adversos do acúmulo de certos produtos metabólicos, alguns microrganismos começam a usar um tipo de metabolismo que conduz à sobrevivência, sintetizando metabólitos secundários por meio de vias metabólicas secundárias (FENG; CHEN; CHEN, 2018). Alguns destes metabólitos apresentam atividade antimicrobiana, antibióticos, hormônios, pigmentos e toxinas, que são compostos orgânicos de baixa massa molecular, estruturalmente complexos e com diversas atividades biológicas (MARTÍN; CASQUEIRO; LIRAS 2005; BASTOS, 2010).

Finalmente, conforme a fermentação prossegue, a mudança nas concentrações do substrato e o acúmulo de metabólitos levam à inibição do crescimento microbiano. A morfologia celular começa a mudar; por exemplo, ocorre aumento ou são produzidas formas degenerativas irregulares. Algumas células começam a sofrer autólise. No final da fase de declínio, a população que consegue se adaptar ao novo ambiente torna-se gradativamente dominante e renova o metabolismo (FENG; CHEN; CHEN, 2018).

Os avanços nas tecnologias biológicas e na microbiologia tem colaborado, permitido que cepas microbianas de alto rendimento sejam identificadas e adequadas para a produção industrial de metabólitos microbianos (REVUELTA et al., 2016). Após a descoberta da bactéria produtora de ácido glutâmico, *Corynebacterium glutamicum*, por pesquisadores japoneses em 1956, a produção de aminoácidos, que são metabólitos primários, foi alcançada usando diversas células microbianas como hospedeiras (HIRASAWA; SHIMIZU, 2016). Assim como a evolução nas pesquisas de produção de aminoácidos, muitos estudos têm se concentrado na otimização de processos metabólicos e regulatórios em diferentes níveis celulares (XU; WEI; LIU, 2019).

Dentro estes estudos que têm buscado verificar processos regulatórios para síntese de metabólitos, tem-se a produção de polissacarídeos. Estes são amplamente produzidos por bactérias, incluindo espécies dos gêneros *Pseudomonas oleovorans* (FREITAS et al., 2009),

Xanthomonas sp (PALANIRAJ; JAYARAMAN, 2011), *Acetobacter* sp (CHAWLA et al., 2009), *Leuconostoc* sp, *Streptococcus* sp, *Lactobacillus* sp (PATEL; SHAH; PRAJAPATI, 2013); fungos incluindo membros dos gêneros *Aspergillus* sp (CHEN et al., 2011), *Diaporthe* sp (ORLANDELLI et al., 2017), *Schizophyllum commune* (ZHANG et al., 2013), e microalgas, como *Chlorella zofingiensis*, *Chlorella vulgaris* (ZHANG; LIU; CHEN, 2019), *Gracilaria gracilis* (BALTI et al., 2020) e *Porphyridium* sp (SOANEN et al., 2016).

1.5.1 Metabólitos produzidos por Bactérias Ácido Lácticas

Como já descrito anteriormente, as BAL são microrganismos de importância industrial por serem amplamente utilizadas em uma grande variedade de fermentações. A contribuição destas bactérias após processo de fermentação, consiste principalmente na formação de ácido láctico a partir de fontes de carbono disponíveis, resultando na acidificação rápida do produto, que é o componente essencial para sua característica (HUGENHOLTZ et al., 2002).

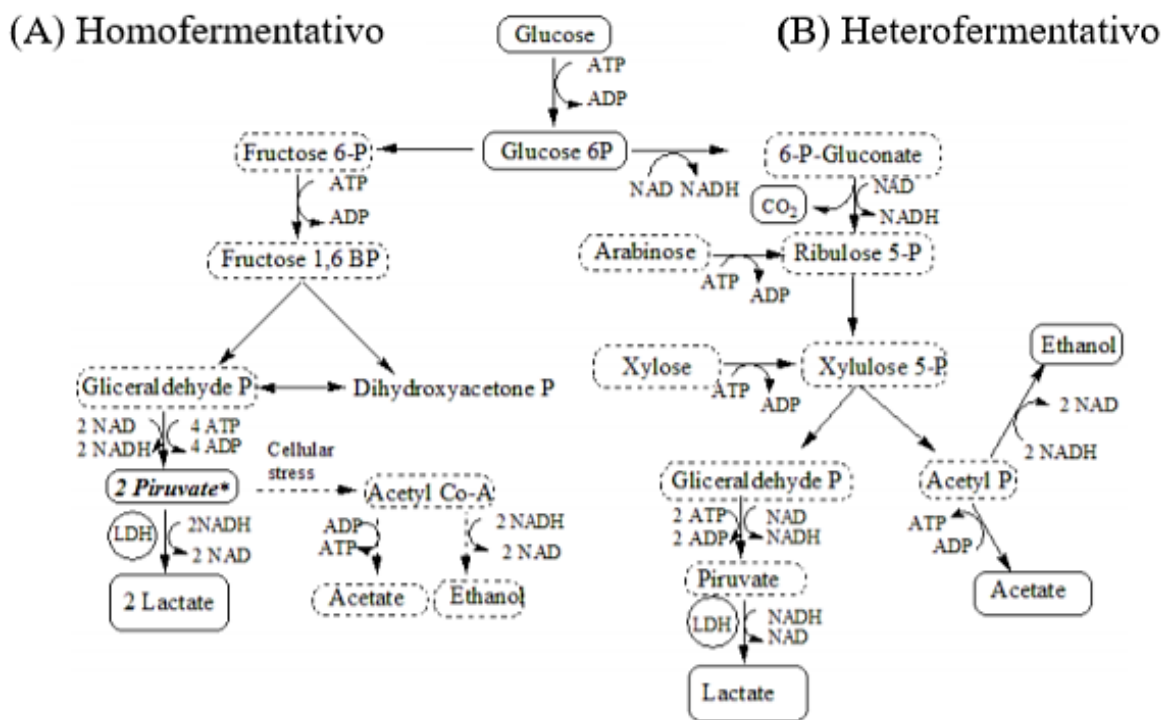
Considerando tais características essas bactérias são classificadas em dois principais grupos: homofermentativas e heterofermentativas. As bactérias homofermentativas metabolizam hexoses pela via Embden-Meyerhof (EMP), gerando duas moléculas de ácido láctico para cada molécula de glicose, mas não fermentam pentoses ou gluconato. Enquanto as heterofermentativas metabolizam hexoses, pentoses como a xilose, seguindo a via da fosfoctolase. A diferença com a rota homofermentativa é a conversão de dois dos seis carbonos da glicose em ácido acético, o que limita os rendimentos do ácido láctico. Os homofermentadores podem gerar ácidos mistos, mas isso só ocorre quando o microrganismo é submetido a condições adversas de cultivo (Figura 4) (GÄNZLE, 2015; ROMO-BUHELLEY; RODRÍGUEZ-TORRES; OROZCO-SÁNCHEZ; 2019).

Especificamente, durante via de metabolismo homofermentativo, ocorre a fosforilação da glucose e posteriormente da frutose-6-fosfato originando frutose-1-6-difosfato, que é clivada através da frutose-1,6-difosfato-aldolase em di-hidroxiacetona-fosfato e gliceraldeído-3-fosfato. Este último é oxidado a 1,3-difosfoglicerato que, por um conjunto de reações que envolvem quinases, mutase e enolase, origina o piruvato. O piruvato funciona como receptor final de elétrons gerados na oxidação do gliceraldeído-3-fosfato, reduzindo-se a lactato (Figura 4 A) (INÊS et al., 2008; GÄNZLE, 2015).

Na via de metabolismo heterofermentativo, a glucose fosforilada, é oxidada a 6-fosfogluconato que, por uma descarboxilação oxidativa, origina ribulose-5-fosfato. Por meio de uma epimerização a ribulose-5-fosfato é convertida em xilulose-5-fosfato, que é

posteriormente clivada em gliceraldeído-3-fosfato e acetil-fosfato, pela xilulose-5-fosfato-fosfocetolase. O gliceraldeído-3-fosfato é metabolizado via sequência glicolítica (EMP), referida para as bactérias homofermentativas, resultando 1 mol de lactato e 1 de ATP. Já o acetil-fosfato é reduzido a etanol via acetil-CoA e acetaldeído (Figura 4 B) (INÊS et al., 2008; GÄNZLE, 2015).

Figura 4. Metabolismo de Bactérias Ácido Lácticas. (A) Metabolismo homofermentativo; (B) Metabolismo heterofermentativo



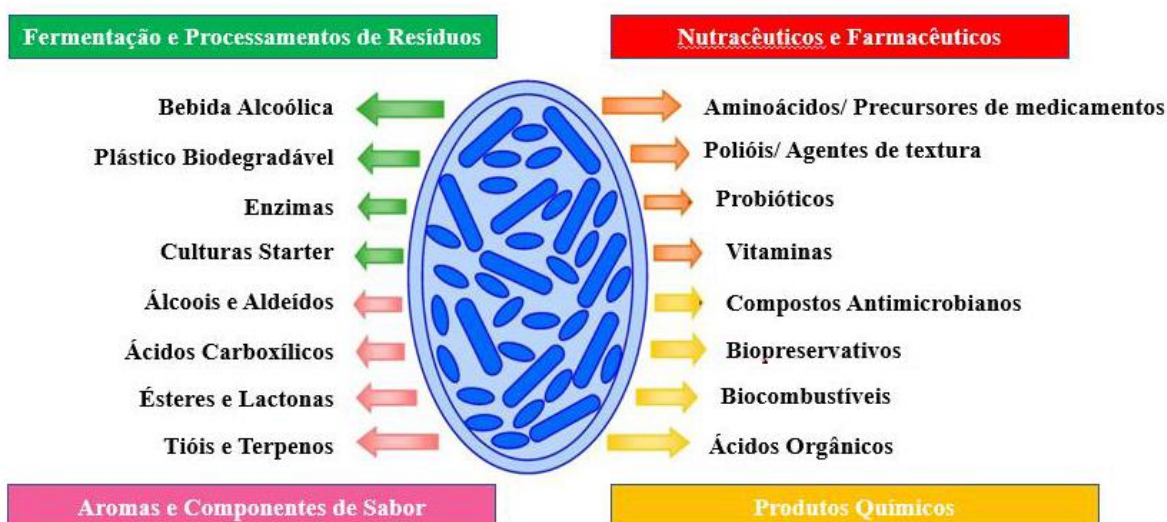
Fonte: ROMO-BUHELLY; RODRÍGUEZ-TORRES; OROZCO-SÁNCHEZ (2019).

Assim, estas BAL são sistemas ideais para o estudo dos mecanismos envolvidos no metabolismo celular, pois possuem capacidade biossintética e a versatilidade metabólica. São geralmente bastante ilimitadas e sua fisiologia é relativamente simples. Além disso, os processos de metabolismo energético e biossíntese são quase completamente separados,

permitindo que não ocorra a interferência, do catabolismo de açúcar na biossíntese de diversos produtos (KLEEREBEZEM; HUGENHOLTZ, 2003).

Além do ácido lático, as BAL também têm a capacidade de produzir metabólitos de valor industrial, tendo aplicações potenciais como nutracêuticos, farmacêuticos, produtos químicos, aromas, compostos de sabor em fermentação, e em indústrias de processamento de resíduos, conforme apresentados na Figura 5. Assim, a engenharia metabólica de BAL se concentrou em redirecionar o metabolismo do piruvato e outras vias biossintéticas complexas para síntese de produtos comercialmente importantes, como agentes antimicrobianos, compostos de aroma e sabor, exopolissacarídeos, polióis e adoçantes, nutracêuticos como vitaminas e outros metabólitos valiosos com benefícios a saúde (SHARMA et al., 2020).

Figura 5. Bactérias Ácido Láticas como fonte produtora de compostos industriais



Fonte: adaptado de SHARMA et al. (2020).

O sorbitol é um açúcar-álcool de baixa caloria amplamente utilizado como ingrediente na indústria alimentícia devido às suas propriedades promotoras da saúde. Uma cepa de *Lactobacillus casei*, geneticamente modificada pela integração de um gene que codifica D-sorbitol-6-fosfato desidrogenase (*gutF*) no operon da lactose cromossômica (*lac*) resultou na produção de 0,024 mol de sorbitol / mol de glicose. Observou-se que a regulação da expressão do gene *F* no *intestino* é a mesma dos genes *lac*, onde a glicose inibe sua produção por repressão catabólica, enquanto a lactose atua como indutora. Com mais exclusão de *ldh* no gene *L*, a produção de sorbitol foi aumentada para 0,043 mol por mol de glicose e os autores

sugeriram que esta estratégia de engenharia forneceu uma via alternativa para a regeneração de NAD⁺ (NISSEN; PEREZ-MARTINEZ; YEBRA, 2005).

As vitaminas são micronutrientes essenciais para o metabolismo de todos os organismos vivos. Muitas BAL industrialmente importantes, como *Lactococcus lactis* e *Streptococcus thermophilus*, foram relatadas como tendo a capacidade de sintetizar vitaminas como a riboflavina (vitamina B₂) e folato (vitamina B₁₁) (WU; HUANG; ZHOU, 2017). As BAL podem sintetizar ou utilizar a riboflavina durante a fermentação dos alimentos, portanto, uma seleção adequada de cepas é necessária para aumentar a concentração e a biodisponibilidade desta vitamina essencial em alimentos fermentados (ZAROOUR et al., 2017). Capozzi et al. (2011) isolaram duas cepas de *Lactobacillus plantarum* com superprodução de riboflavina de amostras de farinha de trigo usando roseoflavina. As duas cepas foram utilizadas para o preparo de massas, e um aumento de cerca de três e duas vezes no conteúdo de riboflavina foi obtido em pão e macarrão, respectivamente. Genes envolvidos na biossíntese de riboflavina pelas BAL foram identificados em várias espécies, e a análise comparativa do genoma sugeriu que o operon para a biossíntese de riboflavina era específico para espécies e / ou cepas em BAL (CAPOZZI et al., 2012).

O uso de compostos antimicrobianos produzidos por BAL como barreira contra patógenos e contra a deterioração de alimentos causada por bactérias também tem se mostrado eficaz. A bactéria do ácido láctico produz uma variedade de compostos, como ácidos orgânicos (ácido láctico e ácido acético), diacetil, peróxido de hidrogênio, bacteriocinas e proteínas bactericidas, todos com propriedades antibacterianas ou bacteriostáticas. Esses produtos metabólicos não apenas estendem a vida útil e inibem o crescimento de organismos patogênicos, mas também têm um efeito positivo no sabor, cheiro, cor e textura dos alimentos (ZAROOUR et al., 2017). Segundo Yi et al. (2020), a atividade antimicrobiana de bacteriocinas das 38 cepas foi testada contra vários patógenos de origem alimentar. A bacteriocina bruta produzida por *Lactobacillus pentosus* DZ35 apresentou resistência ao calor e ao pH, bem como resistência parcial a proteinases. Após todo o sequenciamento do genoma, duas novas bacteriocinas, pentocina DZ1 e pentocina DZ2 foram identificadas. Segundo os autores estas bacteriocinas podem ser atraentes, pois são obtidas de fontes naturais e contribuem para a segurança alimentar (YANG et al., 2014).

A produção de exopolissacarídeos em BAL pode melhorar a viscosidade e a textura de produtos fermentados e proporcionar potenciais benefícios à saúde (ZAROOUR et al., 2017). Algumas BAL são capazes de sintetizar polímeros glicosídicos e secretá-los para fora da célula (exopolissacarídeos) (KUMAR; MODY, K.; JHA, 2007). Diversas BAL pertencentes aos

gêneros *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Weissella* e *Bifidobacterium* têm sido identificadas como produtoras de EPS (INTURRI, et al., 2017; KANAMARLAPUDI; MUDDADA, 2017; BHAT; BAJAJ, 2018; YANG et al., 2018; ZHU et al., 2018; MIN et al., 2019; AYYASH et al., 2020; KUMAR et al., 2020).

É certo que muitas das vias metabólicas de BAL continuam a ser importantes para a preparação de produtos fermentados tradicionais, com os metabólitos de BAL contribuindo para a qualidade e segurança de alimentos e bebidas. Além disso, engenharia metabólica de BAL detectou e desenvolveu cepas que podem produzir metabólitos, como exopolissacarídeos, vitaminas e bacteriocinas, e esses são usados atualmente para gerar aditivos alimentares (ZAROOUR et al., 2017). A contribuição mais promissora dos metabólitos de BAL provavelmente será no campo do desenvolvimento de alimentos funcionais e a adaptação do metabolismo celular de BAL por meio da abordagem de engenharia metabólica deve levar a resultados, cada vez mais eficientes no desenvolvimento de bioprocessos, produtividades e especificidades catalíticas (SHARMA et al., 2020).

1.6 POLISSACARÍDEOS MICROBIANOS

Polissacarídeos são macromoléculas naturais compostas por monossacarídeos ligados entre si por ligações glicosídicas (PEREIRA et al., 2019). Aqueles com aplicações industriais podem ser extraídos de plantas, animais e fungos, ou obtidos via fermentação (CUNHA; DE PAULA; FEITOSA, 2009). Polissacarídeos sintetizados por microrganismos podem, de acordo com sua localização celular, apresentar-se como constituintes da parede celular (lipopolissacarídeos), associados covalentemente à superfície celular (polissacarídeos capsulares), ou secretados para o meio extracelular (exopolissacarídeos) (KUMAR; MODY; JHA, 2007).

Os exopolissacarídeos (EPS) são polímeros de carboidratos extracelulares produzidos e secretados por microrganismos, que se acumulam fora das células. Eles são capazes de ser liberados no ambiente circundante. Apesar de sua composição monomérica, semelhante a produtos vegetais ou animais bem conhecidos, os EPS de diferentes origens microbianas (bactérias, fungos e microalgas) apresentam uma grande variedade de combinações estruturais, que os fazem ter propriedades únicas (MOSCOVICI, 2015), o que determina suas aplicações na indústria alimentícia ou farmacêutica (KUMAR; MODY; JHA, 2007).

O primeiro polímero bacteriano foi descoberto por Pasteur em meados do século XIX como um produto microbiano no vinho, e a bactéria *Leuconostoc mesenteroides* foi identificada por Van Tieghem em 1878 como cepa produtora de dextrana (ATES, 2015). Mas foi apenas em 1953 que a dextrana foi aplicada, sendo usada como um expensor de volume plasmático para controlar o choque em feridas. Assim, a dextrana poderia ser considerada o primeiro exemplo notável de EPS microbiano usado em aplicações farmacêuticas (MOSCOVICI, 2015).

Outros EPS microbianos foram empregados em aplicações médicas como excipientes farmacêuticos, após serem aprovados como aditivos alimentares. Xantana e gelana, foram descobertas em 1950 e 1978, respectivamente (MOSCOVICI, 2015). A xantana, produzida por *Xanthomonas campestris*, na Europa foi aprovada como aditivo alimentar em 1982, com subsequente inclusão nas farmacopeias dos EUA e da UE (MOSCOVICI, 2015). A gelana, elaborada a partir da bactéria *Sphingomonas elodea*, anteriormente conhecida como *Pseudomonas elodea* (GAI et al., 2011) é aprovada pelo FDA (Food and Drug Administration) como um estabilizante e espessante em alimentos desde 1990 (MOSCOVICI, 2015).

Diversos estudos têm mostrado notável produção de polímeros por distintos microrganismos, como mostrado na Tabela 1.

Tabela 1. Diferentes exopolissacarídeos (EPS) produzidos por microrganismos

EPS	Microrganismo	Referência
Dextrana	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	(YE et al., 2019)
Galactana	<i>Weissella confusa</i>	(KAVITAKE et al., 2016)
Reuterana	<i>Lactobacillus reuteri</i>	(MÜNKEL; FISCHER; WEFERS, 2020)
Mutana	<i>Streptococcus mutans</i>	(BODDAPATI; RAI; GUMMADI, 2020)
Alternana	<i>Leuconostoc citreum</i>	(WANGPAIBOON et al., 2018)
Levana	<i>Bacillus licheniformis</i>	(GOJGIC-CVIJOVIC et al., 2019)
Alginato	<i>Pseudomonas mendocina</i> , <i>Azotobacter vinelandii</i>	(CLEMENTI et al., 1999; DOS SANTOS et al., 2012)
Celulose	<i>Acetobacter spp</i>	(ANUSUYA et al., 2020)
Succinoglucanas	<i>Rhizobium radiobacter</i>	(ANDHARE et al.; 2017)
Gelana	<i>Sphingomonas spp</i>	(RAGHUNANDAN et al. 2018)

Xantana	<i>Xanthomonas campestris</i>	(SAMPAIO et al., 2020)
Kefirana	<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i>	(ELSAYED et al., 2017)

Fonte: O próprio autor.

Geralmente, os polissacarídeos microbianos são moléculas lineares iônicas ou não iônicas que têm cadeias laterais regularmente ligadas a alguma estrutura com comprimento e complexidade diferente (MEYBODI; MOHAMMADIFAR, 2015). Sua síntese depende de enzimas específicas, próprias de determinadas espécies de microrganismos, e podem diferir na composição monomérica e ligações entre as unidades da cadeia, na conformação estereoquímica e na presença de cadeias laterais e grupos funcionais (DE VUYST; DEGEEST, 1999). Basicamente, a biossíntese de EPS pode ser categorizada em três etapas principais: primeiro o substrato de carbono é assimilado, depois os polissacarídeos são sintetizados na localização intracelular e, finalmente, exsudados para fora da célula (DONOT et al., 2012).

Estes EPS podem ser conhecidos como biopolímeros, por possuírem a capacidade de formar soluções viscosas e géis em meio aquoso, mesmo quando aplicados em baixas concentrações (BORGES et al., 2004). Estas propriedades os têm tornado objeto de diversos estudos, tendo em vista o seu potencial de aplicação em vários setores industriais.

Os polissacarídeos bacterianos têm algumas vantagens na indústria, já que a maioria mostra maior solubilidade em água em comparação com gomas de plantas, como goma de guar, goma de alfarroba, e apresentam melhores atividades de viscosificação, espessamento, estabilização, gelificação e emulsificação (HAN et al., 2015). Além disso, o EPS possui produção independente de condições climáticas, possibilidade de utilização de matérias-primas regionais, maior rapidez na obtenção do produto acabado e necessidade de espaço relativamente pequeno. Apresentam maior uniformidade em suas propriedades físico-químicas devido à especificidade do microrganismo utilizado e à possibilidade de um rígido controle dos parâmetros de fermentação (SOUZA; GARCIA-CRUZ, 2004).

1.6.1 Exopolissacarídeos produzidos por Bactérias Ácido Lácticas

Como já mencionado, as BAL são amplamente utilizadas na indústria de alimentos, uma vez que desempenham um papel crucial no processo de fermentação. Além disso, produzem ácido láctico, compostos aromatizantes e bacteriocinas, e várias cepas apresentam propriedade de secretar polissacarídeo extracelular (EPS) em ambiente favorável (BEHARE et al., 2009).

Devido às propriedades físicas, químicas e biológicas únicas, o EPS quando produzido por BAL, considerada GRAS, é uma importante fonte natural e alternativa a aditivos comerciais vegetais ou animais, uma vez que podem resultar em um produto final seguro, natural e saudável com textura e estabilidade e ter um impacto significativo no desenvolvimento do produto final (ISMAIL; NAMPOOTHIRI, 2010). As propriedades funcionais características dos EPS de BAL os tornam ideais como agentes estabilizantes, viscosificantes, emulsificantes e gelificantes (AHMED et al., 2013).

A natureza do EPS bacteriano depende principalmente das cepas, composição do meio e condições de cultura. Os diferentes EPS geralmente variam na composição e ligação de monossacarídeos, presença de cadeias laterais repetidas e substituições. De acordo com a composição química e os mecanismos de biossíntese, os EPS de BAL são classificados em dois grupos distintos: homopolissacarídeos (HOPS) e heteropolissacarídeos (HEPS) (CAGGIANIELLO; KLEEREBEZEM; SPANO, 2016).

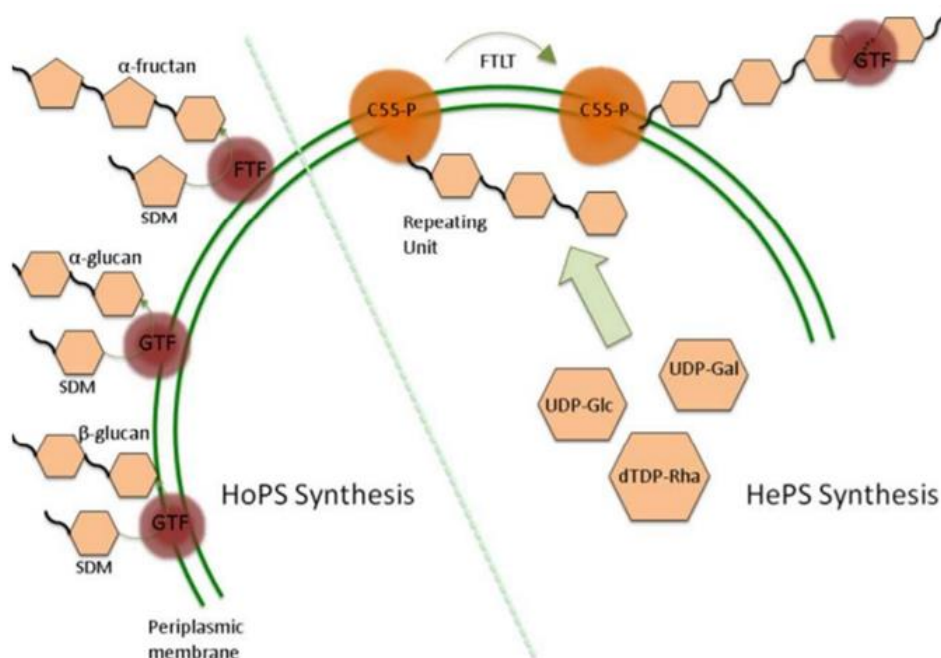
Os HOPS são formados apenas por um tipo de monossacarídeo, tal como D-glicose e D-frutose, com pesos moleculares aproximadamente $10^5 - 10^6$ Da (CAGGIANIELLO; KLEEREBEZEM; SPANO, 2016). São principalmente sintetizados extracelularmente a partir da molécula de sacarose, que atua como doadora do monossacarídeo correspondente por ação da enzima extracelular, denominada glicosiltransferase (GTF) e frutossiltransferase (FTF) (LEEMHUIS et al., 2013b) (Figura 6). Dependendo do tipo de ligação, posição do carbono e açúcar envolvido, os HOPS podem ser classificados em α -D glucanas (dextrana (α -1,6), mutanas (α -1,3), reuteranas (α -1,4) e alternanas (α -1,3 e (α -1,6)), e β -D glucanas, quando apresentam glicose em suas cadeias; ou frutanas (levanas (β -2,6 e β -2,1) e inulinas (β -1,2 e β -2,6)), quando contém frutose em suas cadeias; além de poligalactanos compostos por uma unidade de repetição de galactose (RUAS-MADIEDO; DE LOS REYES-GAVILÁN, 2005; SAADAT; KHOSROUSHAHI; GARGARI, 2019).

Em contrapartida, os HEPS são estruturas ramificadas ou não ramificadas, formados por três a oito subunidades repetidas de monossacarídeos (D- glicose, D- galactose e L- rhamnose), derivados de monossacarídeos, como N-acetilglicosamina, N-acetilgalactosamina, ácido glicurônico ou monossacarídeos substituídos (contendo fosfato, acetil e glicerol) (SAADAT; KHOSROUSHAHI; GARGARI, 2019). O peso molecular varia de 4×10^4 a 6×10^6 Da (RUAS-MADIEDO; DE LOS REYES-GAVILÁN, 2005), sendo a gelana, xantana e kefirana alguns exemplos.

O mecanismo de síntese de HEPS é mais complexo, comparado com o HOPS. Em uma primeira etapa da síntese, ocorre a formação intracelular das unidades de repetição para as quais

precursores de açúcar atuam como doadores de monossacarídeos nas reações catalisadas para GTF. Esses precursores de açúcar podem ser obtidos a partir de diferentes metabólitos, como glicose-1-fosfato e frutose-6-fosfato que também são intermediários no metabolismo central do açúcar. A glicose-1-fosfato serve como um ponto de ramificação para a formação dos nucleotídeos de açúcar UDP-glicose e dTDP-glicose por meio da ação da UDP-glicose pirofosforilase e dTDP-glicose pirofosforilase, respectivamente. Esses nucleotídeos de açúcar são usados para formar uma variedade de polissacarídeos na célula e, portanto, as enzimas associadas à sua formação são compartilhadas. A etapa subsequente da síntese de EPS em BAL, montagem da unidade de repetição de monossacarídeo, é alcançada por várias enzimas específicas de EPS. Esta unidade de repetição é montada em uma molécula C55-isoprenóide-lipídio carreadora, que está ligada à membrana citoplasmática da célula (Figura 6). Finalmente, a polimerização de EPS e exportação, envolve a ação de uma enzima tipo flippase para mover as unidades de repetição ligadas a lipídios da face citoplasmática da membrana para a face periplasmática (WELMAN; MADDOX, 2003; SANLIBABA e ÇAKMAK, 2016).

Figura 6. Biossíntese de homopolissacarídeos e heteropolissacarídeos em bactérias ácido lácticas



SDM: Monossacarídeo derivado de sacarose; GTF: Glicosiltransferase; FTF: frutosiltransferase; C55-P: C55- poliprenil fosfato; FTLT: Transportador de lipídios transmembrana de tipo Flippase. Fonte: RYAN et al., 2013.

Para que se tenha uma produção de EPS eficiente deve-se considerar desde a escolha adequada do microrganismo até a determinação dos parâmetros de cultivo, onde se destaca o meio de cultura e sua influência na síntese, no rendimento e na composição dos EPS (VETTORI; FRANCHETTI; CONTIERO, 2012). O rendimento total de EPS produzido por BAL depende da composição do meio, da linhagem da BAL e das condições de crescimento, como temperatura, pH, tensão de oxigênio e período de incubação. A metodologia de superfície de resposta (RSM - do inglês, *response surface methodology*) com base no projeto estatístico pode ser usada para melhorar a produção de EPS (DU et al., 2017).

Diversos estudos têm sugerido a otimização para melhorar o rendimento de EPS. As influências dos componentes do meio e das condições de cultura foram investigadas e as condições ótimas de produção de EPS de *Lactobacillus plantarum* KX041 foram obtidas com sucesso por RSM. A produção máxima foi de 599,52 mg / mL (cerca de 3 vezes do que a produção original), obtida em condições ideais de peptona de soja (20 g / L), temperatura de fermentação (35 °C) e pH inicial (6,38) (WANG et al., 2017). As condições de fermentação para EPS de *Leuconostoc citreum* B-2 também foram otimizadas por RSM e mostraram as condições ideais de fermentação, sacarose, extrato de levedura e pH de 99,80 g / L, 5,94 g / L e 6,12, respectivamente, com um rendimento de EPS pela cepa B-2 de $59,33 \pm 1,34$ g / L, que foi 5,93 vezes maior do que das condições iniciais não otimizadas (WANG et al., 2020a).

Além da busca por maior rendimento em produção de EPS, a indústria de alimentos tem buscado compreender melhor os efeitos dos polissacarídeos microbianos nos produtos existentes e a pesquisar novas cepas produtoras com distintas propriedades. O isolamento de novas cepas de BAL de diferentes ambientes naturais torna necessário o uso de métodos específicos para detectar o fenótipo desejado. Muitas pesquisas e diversos trabalhos têm sido desenvolvidos na busca de novas BAL produtoras de EPS (RUAS-MADIEDO; DE LOS REYES-GAVILÁN, 2005; BACHTARZI, 2020) (Tabela 2).

Considerando que grande parte dos EPS apresenta características físico-químicas que permitem suas aplicações nas indústrias de alimentos, cosmética e farmacêutica, a partir do *item 1.6.3* desta revisão, serão apresentados métodos para caracterizar e verificar algumas propriedades tecnológicas dessas moléculas, principalmente de exopolissacarídeos bacterianos, enfoque deste trabalho.

Tabela 2. Diferentes exopolissacarídeos (EPS) produzidos por bactérias ácido lácticas a partir de diversas fontes alimentares

Alimento	Bactéria ácido láctica	Unidades de repetição*	Referência
Homopolissacarídeo			
Vinho caseiro	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> XG5	α -D-Glc - (1→6)	(ZHOU et al., 2018)
Fermento natural de pão chinês	<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> Ls-1001	α -D-Glc - (1→6)	(ZHANG et al., 2019)
Massa idli (fermentado tradicional da Índia)	<i>Weissella confusa</i> KR780676	β -D-Gal (1→6)	(KAVITAKE et al., 2016)
Heteropolissacarídeo			
Coalhada	<i>Lactobacillus plantarum</i> MTCC 9510	→3)- α -D-Glc-(1→3)- α -D-Man-(1→3)- α -D-Glc-(1→	(ISMAIL; NAMPOOTHIRI, 2010)
Leite fermentado	<i>L. fermentum</i> TDS030603	→3)- β -D-Glc-(1→3)-[α -D-Glc-(1→6)- α -D-Gal-(1→2)]- α -D-Glc-(1→	(LEO et al., 2007; GERWIG et al., 2013)
Leite desnatado	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> OLL1073R-1	→2)- α -D-Glc-(1→3)- β -D-Glc-(1→3)-[β -D-Gal-(1→4)]- β -D-Gal-(1→4)- α -D-Gal(1→	(CALSTEREN et al., 2015)

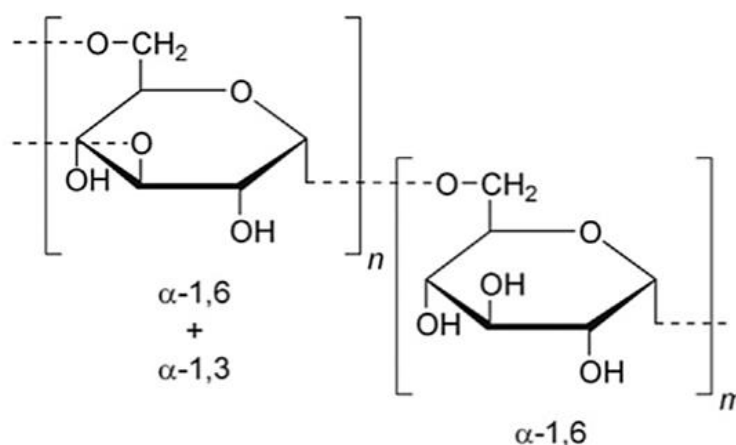
*Glc: glicose; Gal: galactose; Man: manose.

Fonte: o próprio autor.

1.6.2 Dextrana

A dextrana pertence a uma classe de homopolissacarídeos bacterianos extracelulares de elevada massa molecular, podendo chegar a $10^7 - 10^8$ Da, com estrutura linear de unidades de repetição D-glicopiranosil ligadas. Mais especificadamente, este EPS é constituído de unidade de α -D-glicopiranosil polimerizada, sendo um polímero de moléculas de glicose unidas por ligação α -(1 \rightarrow 6) na cadeia principal e quantidades variáveis de α -(1 \rightarrow 2), α -(1 \rightarrow 3) ou α -(1 \rightarrow 4), nas ramificadas (Figura 7). A produção de dextrana tem sido extensivamente estudada em BAL de gênero *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Weissella* e *Pediococcus* (KOTHARI et al., 2014).

Figura 7. Estrutura química da dextrana.



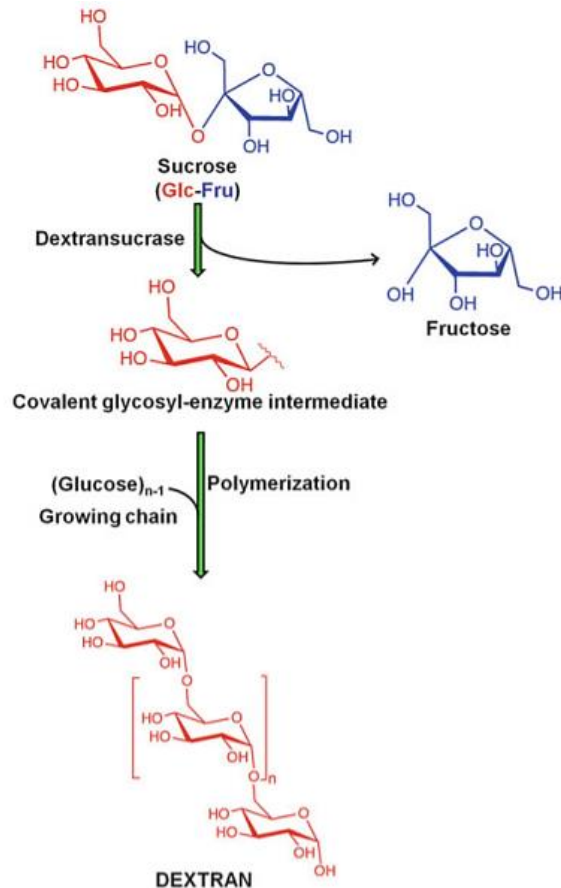
Fonte: ZARRINTAJ et al., 2020.

Dextranas geralmente variam em seu peso molecular, arranjo espacial, tipo e grau de ramificação, e comprimento das cadeias ramificadas, dependendo das cepas e das condições de cultivo. Estudo realizado por Jeanes et al. (1954) relataram que dextranas de 96 cepas bacterianas individuais (principalmente *Leuconostoc mesenteroides*) demonstraram apresentar uma variação na quantidade de ligações α -(1 \rightarrow 6) de 50 % a 97 % das ligações glicosídicas totais.

Hehre (1941) relatou a primeira síntese de dextrana livre de células usando sacarose como substrato da enzima dextrana-sacarase. Esta enzima sintetiza dextrana a partir da sacarose com liberação concomitante de frutose por mecanismo de duplo deslocamento. Assim, no primeiro estágio da reação de duplo deslocamento, a ligação glicosídica α -(1 \rightarrow 2) é clivada com a liberação de frutose e um intermediário glicosil-enzima é formado, no qual a unidade de glicosil

é covalentemente ligada ao nucleófilo catalítico por meio de uma ligação β -glicosídica. Já no segundo estágio da reação, a porção de glicosil ligada é transferida para a extremidade não redutora de açúcar de uma cadeia de glucana em crescimento (Figura 8) (LEEMHUIS et al., 2013a).

Figura 8. Mecanismo de produção da dextrana.



Fonte: KOTHARI et al., 2014.

A dextrana tem sido estudada como ingrediente alimentar desde a década de 1950. A FDA lista atualmente a dextrana como aditivo GRAS para alimentos. Em geral, a dextrana pode ser usada como agente gelificante, viscosificante, texturizante e emulsificante, em vários produtos alimentares (LEEMHUIS et al., 2013a). Devido à heterogeneidade da dextrana produzida por várias BAL, a aplicação pode depender de propriedades químicas e físico-químicas bem definidas.

De acordo com Wilham et al. (1955) três tipos de heterogeneidade parecem ocorrer nas produções de dextrana. A heterogeneidade da cultura, devido à presença de polissacarídeos insolúveis no meio de cultura; heterogeneidade de tamanho, devido à ampla distribuição de

pesos moleculares; e heterogeneidade estrutural, devido à presença de diferentes tipos e proporções de ligações glicosídicas. Segundo os autores, os requisitos para qualquer uso específico podem ser fornecidos de forma mais adequada por uma dextrana específica do que por outra. Portanto, a utilização comercial de dextranas deve ser baseada nas propriedades químicas e físicas inerentes de dextranas individuais.

Diversos estudos têm demonstrado notáveis propriedades tecnológicas em dextranas produzidas a partir de diferentes cepas. Zhou et al. (2018), sugeriram que *Leuconostoc pseudomesenteroides* XG5 pode ser amplamente utilizado na produção de dextrana linear que tem potencial para servir como agente natural aplicado em alimentos. O biopolímero apresentou maior viscosidade em baixa temperatura ou em pH ácido, excelente estabilidade térmica com uma temperatura de degradação de 313,80 °C e ponto de fusão de 274,14 °C. Além disso, alto índice de solubilidade em água (90,2 %) e capacidade de retenção de água (412 %).

Majumder e Goyal (2009), observaram que a dextrana produzida pela cepa *Leuconostoc dextranicum* NRRL B-1146 exibiu um comportamento pseudoplástico não-Newtoniano típico, indicando a natureza ramificada da glucana. A morfologia da superfície estudada revelou uma estrutura porosa e que o EPS poderia ser usado como agente espessante ou gelificante em alimentos ou como massa fermentada em aplicações de panificação.

Alguns estudos também têm avaliado potenciais propriedades biológicas e prebióticas das dextranas. Patel et al. (2010) verificaram que a dextrana produzida por um isolado natural de *Pediococcus pentosaceus*, apresentou-se atóxica e biocompatível, nos testes de citotoxicidade em linhagem de células de câncer cervical humano (HeLa). Considerada assim segura como um biomaterial para várias outras aplicações biomédicas.

Os efeitos da modificação não química na estrutura e fermentabilidade de dextrana de *Leuconostoc citreum* SK24.002 foram investigados por Miao et al. (2016). Os autores verificaram que durante a fermentação fecal *in vitro*, a α -D-glucana modificada enzimaticamente foi bem utilizada pela microbiota humana, além da população bacteriana e o volume de gás terem aumentado com o tempo de incubação. A partir dos resultados puderam prever que esta dextrana possuiu potencial prebiótico fisiologicamente ativo para a homeostase da microbiota do intestino grosso e saúde do hospedeiro.

1.6.3 Caracterização de Exopolissacarídeos

Como já relatado, os EPS são formados por unidades repetidas de monossacarídeos, que podem estar ligadas a proteínas (glicoproteínas), lipídios (glicolipídios), ácidos (por exemplo, ácido glucurônico, ácido galacturônico ou ácido manurônico) e / ou DNA extracelular

(MISHRA; JHA, 2013). Assim, dada a diversidade de possíveis componentes dos açúcares, a especificidade das ligações e a possibilidade de grupos carregados, juntamente com o potencial para estruturas lineares ou ramificadas, e de muitas conformações moleculares possíveis, a caracterização de EPS torna-se necessária (LYNCH et al., 2018).

A principal unidade constitutiva dos polímeros extracelulares são os açúcares que geralmente são analisados após a hidrólise ácida. A cromatografia líquida de alta performance (HPLC - do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) é usada para a determinação qualitativa e quantitativa de vários monossacarídeos, oligossacarídeos e ácidos urônicos presentes no EPS microbiano. Além disso, os grupos funcionais e ligações presentes no EPS são analisados por espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR – do inglês, *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) e ressonância magnética nuclear (NMR – do inglês, *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*) (MISHRA; JHA, 2013).

A espectrometria de infravermelho fornece evidências da presença de vários grupos funcionais na estrutura orgânica devido à interação das moléculas ou átomos com a radiação eletromagnética em um processo de vibração molecular. A radiação no infravermelho faz com que átomos e grupos de átomos de compostos orgânicos vibrem com amplitude aumentada ao redor das ligações covalentes que os ligam. O processo é quantizado, porém o espectro vibracional costuma aparecer como uma série de bandas que podem ser apresentadas em número de ondas, utilizando a unidade centímetro inverso ($400-400\text{cm}^{-1}$) (HARRIS, 2010). A espectroscopia de NMR é uma ferramenta poderosa para estudar a estrutura, função e dinâmica de macromoléculas biológicas, utilizada para determinar a estrutura química e mudanças conformacionais. A estrutura química do EPS em geral é determinada usando experimentos de espectroscopia de NMR de ^1H e ^{13}C (URAI et al., 2007).

Zhang et al. (2019) verificaram por análise de HPLC que EPS puro isolado de *Lactobacillus sanfranciscensis* Ls-1001 continha apenas monômeros de glicose, indicando que era um tipo de homopolissacarídeo. A espectroscopia FTIR revelou a presença de grupos hidroxila e carbonila. A análise de NMR confirmou que o EPS continha ligação α -glicosídica e resíduo de piranose.

A análise de HPLC e a espectroscopia FTIR revelaram que o EPS sintetizado por *Lactobacillus plantarum* RJF4 era composto de glicose e manose (Dilna et al., 2015), e para um EPS produzido por *Streptococcus thermophilus* AR333, composto de galactose, glicose e galactosamina (ZHANG et al., 2018). A estrutura do EPS AR333 consistia em β -(1 \rightarrow 3) Galp, β -(1 \rightarrow 3,6) -Glc, α -(1 \rightarrow 3) -2-GalpNAc e α -(1 \rightarrow 4) -Glc. A cadeia ramificada foi terminada na

posição O-6 de β - (1 \rightarrow 3,6) -Glc p por α -T-Galp, de acordo com a espectroscopia de NMR 1D e 2D (ZHANG et al., 2018).

1.6.4 Avaliação Tecnológica de Exopolissacarídeos

Os EPS têm características estruturais distintas, como peso molecular, composição de monômero e não carboidrato e disposição de cadeias, o que implica em propriedades que definem as aplicações tecnológicas, como agentes gelificantes, emulsificantes, estabilizantes e agentes de melhoramento de textura, entre outros (DE OLIVEIRA; AMARAL; BURKERT, 2019). Além disso, o papel tecno-funcional de EPS em alimentos está geralmente relacionado à sua capacidade de atuar como hidrocolóide, e capacidade de retenção de água e óleo no produto. Tais propriedades são função das características moleculares do polissacarídeo, como composição, massa molecular, conformação da cadeia e presença e densidade de ramificação (LYNCH et al., 2018).

O polímero produzido por *Streptococcus thermophilus* CRL1190 apresentou propriedades tecnológicas úteis, como boa capacidade emulsificante e floculante em baixas concentrações, alta solubilidade aquosa (9,1 mg / mL), capacidade de retenção de água e óleo (528,5% e 126%, respectivamente), bem como estabilidade térmica. As curvas termogravimétricas, análise térmica diferencial e calorimetria de varredura diferencial mostraram que o biopolímero era termicamente estável até 216 °C com deformação cristalina em um processo endotérmico ($\Delta H = 284,46$ J) a uma temperatura de fusão de 74,08 °C. Além disso, foi observada temperatura de degradação de 295,4 °C (LOBO et al., 2019).

Miao et al. (2015), verificaram que a dextrana de *Lactobacillus reuteri* SK24.003 apresentou uma degradação acima de 200 °C, o ponto de fusão de 147,7 °C com o valor de entalpia de 78,4 J / g. Também, Kavitate et al. (2016) descreveram que a galactana produzida por *Weissella confusa* KR780676, apresentou entalpia endotérmica de 74,337 J / g a ponto de fusão de 274,65 °C. As diferenças no comportamento térmico podem ser devido à configuração molecular do polímero (MIAO et al., 2015).

1.6.4.1 Propriedade reológica

A avaliação reológica de EPS destaca-se por fornecer informações a respeito das suas possíveis aplicações biotecnológicas (KACI et al., 2005), como também, permite a caracterização de polímeros em soluções e géis, fornecendo dados importantes para o

desenvolvimento de processos tecnológicos, controle de qualidade das matérias-primas e produtos.

A reologia é a ciência que estuda a deformação e o fluxo dos materiais sob influência de tensões, e considera a matéria no estado líquido, sólido ou gasoso. Os sólidos elásticos deformam-se elasticamente, ou seja, um material com forma definida quando deformado por uma força externa, dentro de certos limites, retornará à sua forma e dimensões originais, após a remoção dessa força. Já em fluidos viscosos (líquidos ou gases) a deformação é irreversível, eles escoam e, neste caso, a energia requerida para a deformação é dissipada dentro do fluido na forma de calor e não pode ser recuperada simplesmente pela remoção das tensões (BRETAS; D'ÁVILA, 2005).

Isaac Newton foi o primeiro a descrever o comportamento de escoamento de um líquido ao relacionar a taxa de cisalhamento sendo diretamente proporcional a tensão de cisalhamento aplicada. A proporcionalidade dada por uma constante intrinsecamente depende da natureza do fluido (SCHRAMM, 2006). Assim, os fluidos podem ser newtonianos e não-newtonianos. O fluido newtoniano caracteriza-se pela viscosidade constante, independentemente da velocidade que se aplica no cisalhamento ($n = 1$). Fluidos newtonianos são líquidos puros, soluções verdadeiras diluídas, como água, óleo mineral (SCHRAMM, 2006).

Já o fluido não-Newtoniano apresenta uma mudança na viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento (GEORGE; QURESHI, 2013). Estes líquidos, sob certas condições de tensão e taxa de deformação, independentemente do tempo, podem ter comportamento pseudoplástico, dilatante ou plástico. Os fluidos que não necessitam de tensão de cisalhamento inicial para escoar são representados pelo modelo mais comum que é descrito pela lei de potência ou equação de Ostwald-de-Waele, classificando-se em pseudoplásticos ($n > 1$) e dilatantes ($n < 1$) (VAJRVELU et al., 2014).

Na maioria dos casos, as aplicações dos hidrocoloides na indústria estão associadas à capacidade de alterarem suas propriedades físicas, podendo resultar soluções de alta viscosidade ou criando redes intermoleculares coesivas. Portanto, o estudo do comportamento reológico destas soluções é fundamental, na avaliação dos processos (MARCOTTE; HOSHAHILI; RAMASWAMY, 2001).

De acordo com Miao et al. (2015) o EPS de *Lactobacillus reuteri* SK24.003 teve um aumento de viscosidade com o aumento da concentração na faixa de 3,0 % - 20 % (m / v). A solução também exibiu comportamento pseudoplástico não-newtoniano com taxa de cisalhamento crescente de 0,01 a 100 1 / s. Os autores ainda concluíram que a glucana tinha

uma alta viscosidade em solução e isso poderia torná-la adequada para uso como substituto de goma em alguns processamentos de alimentos.

1.6.4.2 Propriedade de emulsão

Emulsões são dispersões formadas pela adição de dois ou mais líquidos imiscíveis, como óleo (apolar) e água (polar). Se o óleo é a fase dispersa, a emulsão é denominada do tipo óleo em água; se o meio aquoso é a fase dispersa tem-se uma emulsão tipo água em óleo (MCCLEMENTS, 2016).

Para que uma emulsão seja formada, além de óleo e água, energia será requerida. A energia terá o propósito de reduzir o tamanho das gotículas de óleo a uma dimensão suficientemente pequena a fim de proporcionar maior estabilidade e maior vida de prateleira ao produto (STANG; SCHUCHMANN; SCHUBERT, 2001). A manutenção do tamanho das gotículas e estabilização da emulsão após o rompimento das gotículas de óleo, impedindo a coalescência, pode ser mantida devido a presença de agentes emulsificantes (STANG; SCHUCHMANN; SCHUBERT, 2001).

Os emulsificantes são moléculas tensoativas que reduzem a tensão superficial, se adsorvem na interface óleo-água, evitando que as gotículas de floclulação se formem. Dentre os emulsificantes mais utilizados na indústria de alimentos normalmente estão os biopolímeros, proteínas ou polissacarídeos, e estes conferem a estabilidade da emulsão em longo prazo (MCCLEMENTS, 2016). A principal ação de estabilização dos polissacarídeos é através da modificação de viscosidade aquosa (DICKINSON, 2003).

A atividade de superfície dos polímeros que contribui para a estabilidade da emulsão pode ser atribuída à sua característica anfifílica. A porção hidrofóbica adsorve fortemente na superfície das gotículas de óleo, enquanto a porção hidrofílica limita a agregação e coalescência das gotículas por forças eletrostáticas e / ou repulsivas (DESPLANQUES et al., 2012).

Maalej et al. (2015) verificaram que o EPS produzido por *Pseudomonas stutzeri* AS22, foi capaz de emulsionar vários óleos alimentares e outros compostos hidrofóbicos, especialmente azeite e hexano, com índices de emulsificação de 100 % a uma concentração de 0,6%. Também, Han et al. (2014) observaram que o EPS de *Cyanobacterium Nostoc flagelliforme* produziu emulsões mais estáveis com hidrocarbonetos e óleos testados do que a goma xantana, e os índices de emulsificação com n-hexadecano, parafina líquida e óleo de amendoim foram superiores a 50 %, indicando forte capacidade estabilizadora de emulsão.

Prasanna et al. (2012), estudaram a estabilidade de emulsão de EPS de *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* CCUG 52486 e *Bifidobacterium infantis* NCIMB 702205, na concentração de 1 mg / mL, comparando-os com a goma guar e a goma xantana. Os autores verificaram que os EPS analisados produziram emulsões mais estáveis com óleo de laranja, óleo de semente de girassol, óleo de coco e xileno, quando comparado com a goma guar e goma xantana.

1.6.5 Exopolissacarídeos - Potenciais Benefícios à Saúde

Há evidências crescentes de que EPS de BAL têm potencial para influenciar a saúde do hospedeiro humano e que o consumo alimentar de tais polímeros pode, por exemplo, modular a função imunológica (MATSUZAKI et al., 2014) ou os níveis de bactérias benéficas no trato gastrointestinal (LI et al., 2014). Também apresentar atividade antitumoral (WANG et al., 2014), efeito contra diabetes (DILNA et al., 2015), atividade antioxidante (WANG et al., 2015) e antimicrobiana (GHALEM, 2018). Além disso, certos EPS, como β -glucanas, podem ter um efeito de redução do colesterol e, portanto, ser benéficos para a saúde cardiovascular (RYAN et al., 2015). Em geral, os HEPS podem ser considerados principalmente como agentes efetivos na função do hospedeiro (imunológico, antioxidante), enquanto os HOPS estão mais associados à modulação microbiana (prebióticos). É claro que a composição (tipo de ligação, presença de grupos de carga) e estrutura (massa molecular, ramificações) deste grupo diverso de polímeros são fatores importantes na determinação de seus efeitos na saúde do hospedeiro (LYNCH et al., 2018).

A capacidade de desempenhar alta atividade antioxidante é amplamente difundida em EPS derivado de BAL podendo ser avaliados por ensaio *in vitro* e *in vivo*. EPS-Ca6 de *Lactobacillus* sp. Ca6 exibiu atividade antioxidante, dependente da concentração de EPS no ensaio de DPPH[•], oxidação de β -caroteno/ácido linoléico e atividades quelantes de metais (TRABELSI et al., 2017). EPS de *Lactobacillus gasseri* FR4 e *L. plantarum* C88 também mostraram boa atividade de eliminação de DPPH, superóxido e eliminação de radicais hidroxila (RANI; ANANDHARAJ; RAVINDRAN, 2018; ZHANG et al., 2013). Além disso, mutana de *Streptococcus mutans* MTCC 497 apresentou uma eliminação de radicais antioxidantes *in vitro* de 52 % e 47 % de inibição de DPPH[•] e ABTS^{•+}, respectivamente (BODDAPATI; RAI; GUMMADI, 2020).

Wang et al. (2015) ao avaliarem o potencial biológico do EPS produzido por *Lactobacillus plantarum* YW32, constataram que uma concentração de 5 mg/mL do EPS teve

alta capacidade de eliminação dos radicais hidroxila (77,5 %) e superóxido (66,5 %). O EPS exibiu efeito inibitório dependente da concentração na formação de biofilmes por várias bactérias patogênicas, incluindo *Escherichia coli* O157, *Shigella flexneri* CMCC (B), *Staphylococcus aureus* AC1 e *Salmonella typhimurium* S50333. Os autores ainda relataram em um ensaio antitumoral *in vitro* que o EPS demonstrou boa atividade inibidora contra as células HT-29 de câncer de cólon.

Estudos mostraram que EPS produzidos por BAL também podem apresentar efeito prebiótico (DAL BELLO et al., 2001; O'CONNOR et al., 2005). Para Das, Baruah e Goyal (2014) um aumento do crescimento de bactérias probióticas foi desencadeado por uma α -D-glucana sintetizada por *L. plantarum*, que mostrou baixa digestibilidade em suco gástrico artificial e atividades prebióticas *in vitro*, confirmadas pelo fraco crescimento de bactérias patogênicas. Também Hongpattarakere et al. (2012), relataram que os exopolissacarídeos de *Weissella cibaria*, *Weissella confusa*, *L. plantarum* e *Pediococcus pentosaceus*, eram potencialmente prebióticos, pois exibiram alta resistência aos sucos gástricos e intestinais e aumento seletivo de bactérias intestinais benéficas, em particular de bifidobactérias.

REFERÊNCIAS

- ABBASI, A.; AGHEBATI-MALEKI, A.; YOUSEFI, M.; AGHEBATI-MALEKI, L. Probiotic intervention as a potential therapeutic for managing gestational disorders and improving pregnancy outcomes. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 143, 103244, 2021. doi.org/10.1016/j.jri.2020.103244.
- AHMED, Z.; WANG, Y.; ANJUM, N.; AHMAD, A.; KHAN, S.T. Characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir - Part II. **Food Hydrocolloid**, v. 30, p. 343–350, 2013.
- AMIN, M.; ADAMS, M.; BOLCH, C. J. S.; BURKE, C. M. *In vitro* screening of lactic acid bacteria isolated from gastrointestinal tract of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) as probiont candidates. **Aquaculture International**, v. 25, n. 1, p. 485-498, 2017.
- ANDHARE, P.; DELATTRE, C.; PIERRE, G.; MICHAUD, P.; PATHAK, H. Characterization and rheological behaviour analysis of the succinoglycan produced by *Rhizobium radiobacter* strain CAS from curd sample. **Food Hydrocolloids**, v. 64, p. 1-8, 2017.
- ANUSUYA, R. S.; ANANDHAM, R.; KUMUTHA, K.; GAYATHRY, G.; MAGESHWARAN, V.; UTHANDI, S. Characterization and optimization of bacterial cellulose produced by *Acetobacter spp.* **Journal of Environmental Biology**, v. 41, p. 207-215, 2020.
- AOKI, H.; UDA, I.; TAGAMI, K.; FURUYA, Y.; ENDO, Y.; FUJIMOTO, K. The production of a new *tempeh*-like fermented soybean containing a high level of γ -aminobutyric acid by anaerobic incubation with *Rhizopus*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 67, n. 5, p. 1018-1023, 2003
- ARCHACKA, M.; BIAŁAS, W.; DEMBCZYŃSKI, R.; OLEJNIK, A.; SIP, A.; SZYMANOWSKA, D.; CELIŃSKA, E.; JANKOWSKI, T.; OLEJNIK, A.; ROGODZIŃSKA, M. Method of preservation and type of protective agent strongly influence probiotic properties of *Lactococcus lactis*: A complete process of probiotic preparation manufacture and use. **Food Chemistry**, v. 274, p. 733–742, 2019.
- ATES, O. Systems Biology of Microbial Exopolysaccharides Production. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 3, 2015. doi: 10.3389/fbioe.2015.00200.
- AYYASH, M.; ABU-JDAYIL, B.; ITSARANUWAT, P.; ALMAZROUEI, N.; GALIWANGO, E.; ESPOSITO, G.; HUNASHAL, Y.; HAMED, F.; NAJJAR, Z. Exopolysaccharide produced by the potential probiotic *Lactococcus garvieae* C47: Structural characteristics, rheological properties, bioactivities and impact on fermented camel milk. **Food Chemistry**, v. 333, 2020.
- BACHTARZI, N.; SPECIALE, I.; KHARROUB, K.; DE CASTRO, C.; RUIZ, L.; RUAS-MADIEDO, P. Selection of Exopolysaccharide-Producing *Lactobacillus plantarum* (*Lactiplantibacillus plantarum*) Isolated from Algerian Fermented Foods for the Manufacture of Skim-Milk Fermented Products. **Microorganisms**, v. 8, n. 8, 2020.

BAJPAI, V. K.; RATHER, I. A.; MAJUMDER, R.; ALSHAMMARI, F. H.; NAM, G-J.; PARK, Y-H. Characterization and antibacterial mode of action of lactic acid bacterium *Leuconostoc mesenteroides* HJ69 from kimchi. **Journal of Food Biochemistry**, v. 41, p. 1-11, 2016.

BALTIA, R.; MANSOURC, M. B.; ZAYOUDA, N.; LE BALC'H, R.; BRODUB, N.; ARHALIASSB, A.; MASSÉ, A. Active exopolysaccharides based edible coatings enriched with red seaweed (*Gracilaria gracilis*) extract to improve shrimp preservation during refrigerated storage. **Food Bioscience**, v. 34, 2020.

BAKAR, N. A. A.; RAHMAN, M. H. A.; SHAKRI, N. A. Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from fruit tree rhizosphere in MARDI, Malaysia. **Malaysian Journal of Microbiology**, v. 13, n. 1, 2017.

BARDY, J. J.; PSALTIS, A. J. Next Generation Sequencing and the Microbiome of Chronic Rhinosinusitis: A Primer for Clinicians and Review of Current Research, its Limitations, and Future Directions. **Annals of Otolaryngology & Laryngology**, v. 125, n. 8, p. 613-21, 2016.

BASTOS, R. G. **Tecnologia das fermentações: fundamentos de bioprocessos**, 2010. São Carlos: EdUFSCar, 2010, p 22 – 27.

BEHARE, P. V.; SINGH, R.; KUMAR, M.; PRAJAPATI, J. B.; SINGH, R. P. Exopolysaccharides of lactic acid bacteria: A review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 46, n. 1, p. 1–11, 2009.

BENAVIDES, A. B.; ULCUANGO, M.; YÉPEZ, L.; TENEA, G. N. Assessment of the *in vitro* bioactive properties of lactic acid bacteria isolated from native ecological niches of Ecuador. **Revista Argentina de Microbiología**; v. 48, n. 3, p. 236-244, 2016.

BESROUR-AOUAM, N.; FHOULA, I.; HERNANDEZ-ALCANTARA, A. M.; MOHEDANO, L.; NAJJARI, A.; PRIETO, A.; RUAS-MADIEDO, P.; LÓPEZ, P.; OUZARI, H. I. The role of dextran production in the metabolic context of *Leuconostoc* and *Weissella* Tunisian strains. **Carbohydrate Polymers**, v. 253, 117254, 2021. doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117254.

BHAGAT, D.; RAINA, N.; KUMAR, A.; KATOCH, M.; KHAJURIA, Y.; SLATHIA, P. S.; Sharma, P. Probiotic properties of a phytase producing *Pediococcus acidilactici* strain SMVDUDB2 isolated from traditional fermented cheese product, Kalarei. **Scientific Reports**, v. 10, 1926, 2020.

BHAT, B.; BAJAJ, B. K. Hypocholesterolemic and bioactive potential of exopolysaccharide from a probiotic *Enterococcus faecium* K1 isolated from kalarei. **Bioresource Technology**, v. 254, p. 264-267, 2018.

BHOWMIK, S. N.; PATIL, R. T. **Application of Microbial Biotechnology in Food Processing**. In: Fedor, J. New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering. Crop Improvement through Microbial Biotechnology, Elsevier, 2018, p. 73-106.

BICUDO, M. O. P.; RIBANI, R. H.; BETA, T. Anthocyanins, Phenolic Acids and Antioxidant Properties of Juçara Fruits (*Euterpe edulis* M.) Along the On-tree Ripening Process. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 69, p. 142–147, 2014.

BODDAPATI, S.; RAI, R.; GUMMADI, S. N. Structural analysis and antioxidative properties of mutan (water-insoluble glucan) and carboxymethyl mutan from *Streptococcus mutans*. **Process Biochemistry**, v. 97, p. 130-139, 2020.

BORGES, C. D.; MOREIRA, A. N.; MOREIRA, A. S.; DEL PINO, F. A. B.; VENDRUSCOLO, C. T. Caracterização de biopolímeros produzidos por beijeirinkia sp. 7070 em diferentes tempos de cultivo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 3, p.327-332, 2004.

BORGES, G. S. C., VIEIRA, F. G. K., COPETTI, C., GONZAGA, L. V., ZAMBIAZI, R. C., FILHO, J. M., FETT, R. Chemical characterization, bioactive compounds, and antioxidant capacity of Jussara (*Euterpe edulis*) fruit from the Atlantic Forest in southern Brazil. **Food Research International**, v. 44, p. 2128–2133, 2011.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC Nº 241, DE 26 DE JULHO DE 2018. Dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos Julho, 2018. <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em 20/10/2020.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Conjuntura Mensal – Fruto Juçara, Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), 2016. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_05_10_17_42_06_jucara__abril_2016.pdf. Acesso em: 05/05/2017.

BRETAS, R. E. S.; D'ÁVILA, M. A. **Reologia de polímeros fundidos**. 2. ed. São Carlos: EdUFSCar, 2005.

CAGGIANIELLO, G.; KLEEREBEZEM, M.; SPANO, G. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: from health-promoting benefits to stress tolerance mechanisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, DOI 10.1007/s00253-016-7471-2. 2016.

CALSTEREN, M. R. V.; GAGNON, F.; NISHIMURA, J.; MAKINO, S. Structure determination of the neutral exopolysaccharide produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL1073R-1. **Carbohydrate Research**, 413, 115-122, 2015.

CAPOZZI, C. M.; MENGA, V.; DIGESU, A. M.; DE VITA, P.; VAN SINDEREN, D.; CATTIVELLI, L.; FARES, C.; SPANO, G. Biotechnological production of vitamin B2-enriched bread and pasta. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 8013-8020.

CAPOZZI, V.; RUSSO, P.; DUENAS, M. T.; LOPES, P.; SPANO, G. Lactic acid bacteria producing B-group vitamins: a great potential for functional cereals products. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, p. 1383-1394, 2012.

CARDOSO, A. L., DI PIETRO, P. F.; VIEIRA, F. G. K.; BOAVENTURA, B. C. B.; LIZ, S.; BORGES, G. S. C.; FETT, R.; ANDRADE, D. F.; SILVA, E. L. Acute consumption of juçara

juice (*Euterpe edulis*) and antioxidant activity in healthy individuals. **Journal of Functional Foods**, v. 17, p. 152–162, 2015.

CASTRO, R. W.; DA SILVA, G.; BORGES, C.; GONZAGA, L. V.; RIBEIRO, D. H. B. Quality of the beverage preparation produced from juçara pulp subjected to heat treatment. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 19, 2016.

CHAIMSOHN, F. P.; CHIQUETTO, N. C. Construção do marco legal para a produção de açaí de juçara: contribuições da “oficina interestadual sobre legislação, comercialização e marketing para exploração de frutos da palmeira juçara. **Revista Conexão UEPG**, Ponta Grossa, v. 9, n. 2, jul./dez. 2013.

CHAWLA, P. R.; BAJAJ, I. B.; SURVASE, S. A.; SINGHAL, R. S. Microbial Cellulose: Fermentative Production and Applications. *Food Technology and Biotechnology*, v. 47, n. 2, p. 107–124, 2009.

CHEN, Y.; MAO, W.; TAO, H.; ZHU, W.; QI, X.; CHEN, Y.; LI, H.; ZHAO, C.; YANG, Y.; HOU, Y.; WANG, C.; LI, N. Structural characterization and antioxidant properties of an exopolysaccharide produced by the mangrove endophytic fungus *Aspergillus* sp. Y16. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 8179-8184, 2011.

CLEMENTI, F.; CRUDELE, M. A.; PARENTE, E.; MANCINI, M.; MORES, M. Production and characterisation of alginate from *Azotobacter vinelandii*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, n. 4, p. 602-610, 1999.

CNCFlora. *Euterpe edulis* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2 Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em <[http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Euterpe edulis](http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Euterpe%20edulis)>. Acesso em 15 dezembro 2020.

COLOMBO, M.; NERO, L. A.; TODOROV, S. D. Safety profiles of beneficial lactic acid bacteria isolated from dairy systems. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 51, p. 787–795, 2020.

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

DA SILVA, P. P. M.; ORTIZ, V. D. G.; DO CARMO, L. F.; SILVA, G. M.; WALDER, J. M. M.; SPOTO, M. H. F. Determinação do valor D₁₀ para *Escherichia coli* em polpa de juçara irradiada. **Brazilian Journal of Food & Nutrition**, v. 22, n. 2, p 279-282, 2011.

DAL BELLO, F. D.; WALTER, J.; HERTEL C.; HAMMES, W. P. *In vitro* study of probiotic properties of levan-type exopolysaccharides from lactobacilli and nondigestible carbohydrates using denaturing gradient gel electrophoresis. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 24, p. 232-237, 2001.

DAS, D.; BARUAH, R.; GOYAL, A. A food additive with prebiotic properties of an α -d-glucan from *Lactobacillus plantarum* DM5. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 69, p. 20–26, 2014.

DE CASTILHO, C. L.; LONGONI, L.; SAMPAIO, J.; LISBOA, B. B.; VARGAS, L. K.; BENEDUZI, A. The rhizosphere microbiome and growth-promoting rhizobacteria of the Brazilian juçara palm. **Rhizosphere**, v. 15, 2020.

DE OLIVEIRA, J. M.; AMARAL, S. A.; BURKERT, C. A. V. Rheological, textural and emulsifying properties of an exopolysaccharide produced by *Mesorhizobium loti* grown on a crude glycerol-based medium. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 2180-2187, 2018.

DE PAULA, A. T.; JERONYMO-CENEVIVA, A. B.; SILVA, L. F.; TODOROV, S. D.; FRANCO, B. D. G. M.; PENNA, A. L. B. *Leuconostoc mesenteroides* SJRP55: a potential probiotic strain isolated from Brazilian water buffalo mozzarella cheese. **Annals of Microbiology**, v. 65, p. 899–910, 2015.

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

DEMAIN, A. L. Microbial biotechnology. **Trends Biotechnology**, v.18, n. 1, p. 26-31, 2000.

DESPLANQUES, S.; RENO, F.; GRISEL, M.; MALHIAC, C. Impact of chemical composition of xanthan and acacia gums on the emulsification and stability of oil-in-water emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 27, p. 401-410, 2012.

DHILLON, S.; GHOSH, M.; GANGULI, A. Probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* Ch1 isolates from Indian green sausage. **International Journal of Probiotics and Prebiotics**, v. 2, p.105-110, 2007.

DICKINSON, E., Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. **Food Hydrocolloids**, v. 17, p. 25-39, 2003.

DILNA, S.V.; SURYA, H.; ASWATHY, R.G.; VARSHA, K.K.; SAKTHIKUMAR, D.N.; PANDEY, A.; NAMPOOTHIRI, K.M. Characterization of an exopolysaccharide with potential health-benefit properties from a probiotic *Lactobacillus plantarum* RJF4. **LWT – Food Science and Technology**, v. 64, p. 1179–1186, 2015.

DONOT F.; FONTANA A.; BACCOU J.; SCHORR-GALINDO S. Microbial exopolysaccharides: main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 951-962, 2012.

DOS SANTOS, R. L.; BIRGIDO, R. V.; PIRES, A. T. N.; MÜLLER, J. M. Caracterização do alginato produzido por *Pseudomonas mendocina*. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 30, n. 2, p. 169-176, 2012.

DU, R.; XING, H.; ZHOU, Z.; HAN, Y. Isolation, characterisation and fermentation optimisation of glucansucrase-producing *Leuconostoc mesenteroides* DRP105 from sauerkraut with improved preservation stability. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 52, p. 2522–2530, 2017.

ELSAYED, E. A.; FAROOQ, M.; DAILIN, D.; EL-ENSHASY, H. A.; OTHMAN, N. Z.; MALEK, R.; DANIAL, E.; WADAAN, M. *In vitro* and *in vivo* biological screening of kefiran

polysaccharide produced by *Lactobacillus kefirianofaciens*. **Biomedical Research**, v. 28, n. 2, 2017.

FAO/WHO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION/ WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for Evaluation of Probiotics in Food**. London, Ontario, Canada, 30 April and 01 May, 2002. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf>. Acesso em: 02/08/2017.

FARINAZZO, F. S.; VALENTE, L. J.; ALMEIDA, M. B.; SIMIONATO, A. S.; FERNANDES, M. T. C.; MAURO, C. S. I.; TOMAL, A. A. B.; GARCIA, S. Characterization and antioxidant activity of an exopolysaccharide produced by *Leuconostoc pseudomesenteroides* JF17 from juçara fruits (*Euterpe edulis* Martius). **Process Biochemistry**, v. 91, p. 141–148, 2020.

FELZENSZWALB, I.; DA MARQUES, M. R. C.; MAZZEI, J. L.; AIUB, C. A. F. Toxicological evaluation of *Euterpe edulis*: A potential superfruit to be considered. **Food and Chemical Toxicology**, v. 58, p. 536–544, 2013.

FENG, R.; CHEN, L.; CHEN, K. Fermentation trip: amazing microbes, amazing metabolisms. **Annals of Microbiology**, v. 68, p. 717–729, 2018.

FIETTO, J. L. R.; MACIEL, T. E. F. Sequenciando Genomas. In: MOREIRA, L. M. **Ciência genômica – Fundamentos e Aplicações**. Sociedade Brasileira de Genética, 2015, p. 27 – 63,

FILANNINO P.; AZZI, L.; CAVOSKI, I.; VINCENTINI, O.; RIZZELLO, C. G.; GOBBETTI, M.; DI CAGNO, R. Exploitation of the health-promoting and sensory properties of organic pomegranate (*Punica granatum* L.) juice through lactic acid fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 163, p. 184- 192, 2013.

FILOMENA FREITAS, F.; ALVES, V. D.; CARVALHEIRA, M.; COSTA, C.; OLIVEIRA, R.; REIS, M. A. M. Emulsifying behaviour and rheological properties of the extracellular polysaccharide produced by *Pseudomonas oleovorans* grown on glycerol byproduct. **Carbohydrate Polymers**, v. 78, p. 549–556, 2009.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002, 424p.

FULLER R. **History and development of probiotics**. In: Probiotics. Springer, Dordrecht. 1992, p1-8. https://doi.org/10.1007/978-94-011-2364-8_1

GAI, Z.; WANG, X.; ZHANG, X.; SU, F.; WANG, X.; TANG, H.; TAI, C.; TAO, F.; MA, C.; XU, P. Genome Sequence of *Sphingomonas elodea* ATCC 31461, a Highly Productive Industrial Strain of Gellan Gum. **Journal Bacteriology**, v. 193, n. 24, p. 7015–7016, 2011.

GÄNZLE, M. G.; VERMEULENB, N.; VOGEL, R. F. Carbohydrate, peptide and lipid metabolism of lactic acid bacteria in sourdough. **Food Microbiology**, v. 24, p. 128–138, 2007.

GÄNZLE, M. G. Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. **Current Opinion in Food Science**, v. 2, p. 106-117, 2015.

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, n. 35, p. 84-90. 2013.

GEORGE, H. F.; QURESHI, F. **Newton's Law of Viscosity, Newtonian and Non-Newtonian Fluids**. In: Wang Q. J.; Chung Y. W. (eds) Encyclopedia of Tribology. Springer, Boston, MA, 2013, doi.org/10.1007/978-0-387-92897-5_143.

GHALEM, B. R. Antioxidant and Antimicrobial Activities of Exopolysaccharides from Yoghurt Starter. **Advances in Biochemistry**, v. 5, n. 5, p. 97-101, 2017.

GOJGIC-CVIJOVIC, G. D.; JAKOVLJEVIC, D. M.; LONCAREVIC, B. D.; TODOROVIC, N. M.; PERGAL, M. V.; CIRIC, J.; LOOS, K.; BESKOSKI, V. P.; VRVIC, M. M. Production of levan by *Bacillus licheniformis* NS032 in sugar beet molasses-based medium. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 121, p. 142-151, 2019.

GUERGOLETTA, K. B.; COSTABILE, A.; FLORES, G.; GARCIA, S.; GIBSON, G. R. In vitro fermentation of juçara pulp (*Euterpe edulis*) by human colonic microbiota. **Food Chemistry**, v.196, p. 251–258, 2016.

HAN, P. P.; SUN, Y.; WU, X. Y.; YUAN, Y. J.; DAI, Y. J.; JIA, S. R. Emulsifying, Flocculating, and Physicochemical Properties of Exopolysaccharide Produced by *Cyanobacterium Nostoc flagelliforme*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.172, p. 36–49, 2014.

HAN, Y.; LIU, E.; LIU, L.; ZHANG, B.; WANG, Y.; GUI, M.; WU, R.; LI, P. Rheological, emulsifying and thermostability properties of two exopolysaccharides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* LPL061. **Carbohydrate Polymers**, v. 115, p. 230–237, 2015.

HARRIS, D. C. **Quantitative Chemical Analysis**. 8. ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2010.

HATI, S.; PATEL, M.; MISHRA, B. K.; DAS, S. Short-chain fatty acid and vitamin production potentials of *Lactobacillus* isolated from fermented foods of Khasi Tribes, Meghalaya, India. **Annals of Microbiology**, v. 69, p. 1191–1199, 2019.

HEHRE, E. J. Production from sucrose of a serologically reactive polysaccharide by a sterile bacterial extract. **Science**, v. 93, p. 237–238, 1941.

HILL, C.; GUAMER, F.; REID, G.; GIBSON, G. R.; MERENSTEIN, D. J.; POT, B.; MORELLI, L.; CANANI, R. B.; FLINT, H. J.; SALMINEN, S.; CALDER, P. C.; SANDERS, M. E. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, publicação on-line em 10 julho de 2014. Disponível em: <www.nature.com/nrgastro>. Acesso em: 02/08/2017.

HIRASAWA, T.; SHIMIZU, H. Recent advances in amino acid production by microbial cells. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 42, p. 133-146, 2016.

HISS, H. Biorreatores e Processos Fermentativos. 2001. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Edgard Blücher, 1. ed. 2001. v. 2.; p.103–109.

HONG, J. Y.; SON, S. H.; HONG, S. P.; YI, S. H.; KANG, S. H.; LEE, N. K.; PAIK, H. D. Production of β -glucan, glutathione, and glutathione derivatives by probiotic *Saccharomyces cerevisiae* isolated from cucumber *jangajji*. **LWT-Food Science and Technology**, v. 100, p. 114–118, 2019.

HONGPATTARAKERE, T.; CHERNTONG, N.; WICHIENTHOT, S.; KOLIDA, S.; RASTALL, R. A. *In vitro* prebiotic evaluation of exopolysaccharides produced by marine isolated lactic acid bacteria. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 846-852, 2012.

HUANG, S.; RABAH, H.; FERRET-BERNARD, S.; LE NORMAND, L.; GAUCHER, F.; GUERIN, S.; NOGRET, I.; LE LOIR, Y.; CHEN, X. D.; JAN, G.; BOUDRY, G.; JEANTET, R. Propionic fermentation by the probiotic *Propionibacterium freudenreichii* to functionalize whey. **Journal of Functional Foods**, v. 52, p. 620-628, 2019.

HUGENHOLTZ, J.; SYBESMA, W.; GROOT, M. N.; WISSELINK, W.; LADERO, V.; BURGESS, K.; VAN SINDEREN, D.; PIARD, J. C.; EGGINK, G.; SMID, E. J.; SAVOY, G.; SESMA, F.; JANSEN, T.; HOLS, P.; KLEEREBEZEM, M. Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the production of nutraceuticals. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 82, p. 217-235, 2002.

ILLUMINA Inc. 2016. An Introduction to Next-Generation Sequencing Technology. 16 p. Disponível em: www.illumina.com/technology/next-generation-sequencing.html. Acesso em 28/07/2017.

INÊS, A.; TENREIRO, T.; TENREIRO, R.; FAIA, M. As Bactérias do Ácido Lático do Vinho – Parte 1. **Ciência Técnica Vitivinícola**, v. 23, n. 2, p. 81-96. 2008.

INTURRI, R.; MOLINARO, A.; DI LORENZO, F.; BLANDINO, G.; TOMASELLO, B.; HIDALGO-CANTABRANA, C.; DE CASTRO, C.; RUAS-MADIEDO, P. Chemical and biological properties of the novel exopolysaccharide produced by a probiotic strain of *Bifidobacterium longum*. **Carbohydrate Polymers**, v. 174, p. 1172-1180, 2017.

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. 1049–57, 2010.

JEANES, A.; HAYNES, W. C.; WILHAM, C. A.; RANKIN, J. C.; MELVIN, E. H.; AUSTIN, M. J.; CLUSKEY, J. E.; FISHER, B. E.; TSUCHIYA, H. M.; RIST, C. E. Characterization and classification of dextrans from ninety-six strains of bacteria. **Journal of the American Chemical Society**, v. 76, p. 5041–5052, 1954.

JITPAKDEE, J.; KANTACHOTE, D.; KANZAKI, H.; NITODA, T. Selected probiotic lactic acid bacteria isolated from fermented foods for functional milk production: Lower cholesterol with more beneficial compounds. **LWT-Food Science and Technology**, v. 135, 110061, 2021. doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110061.

KACI, Y.; HEYRAUD, A.; BARAKAT, M.; HEULIN, T. Isolation and identification of an EPS-producing *Rhizobium* strain from arid soil (Algeria): characterization of its EPS and the effect of inoculation on wheat rhizosphere soil structure. **Research in Microbiology**, v.156, n. 4, p. 522-531, 2005.

KANAMARLAPUDI, S. L. R. K.; MUDDADA, S. Characterization of Exopolysaccharide Produced by *Streptococcus thermophilus* CC30. **BioMed Research International**, v. 2017, 2017. doi.org/10.1155/2017/4201809.

KAVITAKE, D.; DEVI, P. B.; SINGH, S. P.; SHETTY, P. H. Characterization of a novel galactan produced by *Weissella confusa* KR780676 from an acidic fermented food. **International Journal of Biological Macromolecules**, 86, 681-689, 2016.

KIM, N. H.; KIM, H. W.; PARK, S. M.; SEO, G. H.; CHO, T. J.; YU, H. R.; KIM, S. H.; HWANG, J. H.; CHOI, C.; RHEE, M. S. Virulence patterns and prevalence of seven *Enterococcus* species isolated from meats and leafy vegetables in South Korea. **Food Control**, v. 108, 2020.

KLEIN, G. Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, p. 123–131, 2003.

KLEEREBEZEM, M.; HUGENHOLTZ, J. Metabolic pathway engineering in lactic acid bacteria. **Current Opinion in Biotechnology**, v.14, n. 2, p. 232-7, 2003.

KOCH, A.; ANDRADE, F. M. A utilização de técnicas de biologia molecular na genética forense: uma revisão. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 40, n.1, p. 17-23. 2008.

KOTHARI, D.; DAS, D.; PATEL, S.; GOYAL, A. Dextran and Food Application. **Polysaccharides**, p. 1-16, 2014.

KUMAR, A. S.; MODY, K.; JHA, B. Review article: Bacterial exopolysaccharides – a perception. **Journal of Basic Microbiology**, v.47, p. 103-107, 2007.

KUMAR, R.; BANSAL, P.; SINGH, J.; DHANDA, S. Purification, partial structural characterization and health benefits of exopolysaccharides from potential probiotic *Pediococcus acidilactici* NCDC 252. **Process Biochemistry**, v. 99, p. 79-86, 2020.

LACHANCE, M. A.; STARMER, W. T.; ROSA, C. A.; BOWLES, J. M.; BARKER, J. S.; JANZEN, D. H. Biogeography of the yeast of ephemeral flowers and their insects. **FEMS Yeast Research**, v. 1, n. 1, p. 1-8, 2001.

LARSEN, N.; BOYE, M.; SIEGUMFELDT, H.; JAKOBSEN, M. A expressão diferencial de proteínas e genes na fase de latência de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* cultivado em meio sintético e leite desnatado reconstituído. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 2, p.1173, 2006.

LEEMHUIS, H.; DIJKMAN, W.P.; DOBRUCHOWSKA, J.M.; PIJNING, T.; GRIJPSTRA, P.; KRALJ, S.; KAMERLING, J. P.; DIJKHUIZEN, L. 4,6- α -Glucanotransferase activity occurs more widespread in *Lactobacillus* strains and constitutes a separate GH70 subfamily. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p.181–93, 2013a.

LEEMHUIS, H.; PIJNING, T.; DOBRUCHOWSKA, J. M.; VAN LEEUWEN, S.S.; KRALJ, S.; DIJKSTRA, B. W.; DIJKHUIZEN, L. Glucansucrases: threedimensional structures, reactions, mechanism, α -glucan analysis and their implications in biotechnology and food applications. **Journal of Biotechnology**, v. 163, p. 250–272, 2013b.

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* TDS030603. **Journal of Applied Glycoscience**, v. 54, p. 223-229, 2007.

LEROY, F.; De VUYST, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, n. 2, p. 67–78, 2004.

LI, S.; CHEN, T.; XU, F.; DONG, S.; XU, H.; WEI, H. The beneficial effect of the exopolysaccharides from *Bifidobacterium bifidum* WBIN03 on the microbial diversity in the mice intestine. **Journal of the Science and Food Agriculture**, v. 94, p. 256–264, 2014.

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

LOBO, R. E.; GÓMEZ, M. I.; VALDEZ, G. F.; TORINO, M. I. Physicochemical and antioxidant properties of a gastroprotective exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* CRL1190. **Food Hydrocolloids**, v. 96, p. 625-633, 2019.

LORENCOVÁ, E.; BUŇKOVÁ, L.; MATOULKOVÁ, D.; DRÁB, V.; PLEVA, P.; KUBÁŇ, V.; BUŇKA, F. Production of biogenic amines by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from dairy products and beer. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, n. 10, 2012.

LYNCH, K. M.; ZANNINI, E.; COFFEY, A.; ARENDT, E. K. Lactic Acid Bacteria Exopolysaccharides in Foods and Beverages: Isolation, Properties, Characterization, and Health Benefits. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 9, p. 155-176, 2018.

MAALEJ, H.; HMIDET, N.; BOISSET, C.; BAYMA, E.; HEYRAUD, A.; NASRI, M. Rheological and emulsifying properties of a gel-like exopolysaccharide produced by *Pseudomonas stutzeri* AS22. **Food Hydrocolloid**, v. 52, p. 634- 647, 2016.

MAIDANA, D. S.; FICOSECO, C. A.; BASSI, D.; COCCONCELLI, P. S.; PUGLISI, E.; SAVOY, G.; VIGNOLO, G.; FONTANA, C. Biodiversity and technological-functional potential of lactic acid bacteria isolated from spontaneously fermented chia sourdough. **International Journal of Food Microbiology**, v. 316, 2020.

MAJUMDER, A.; GOYAL, A. Rheological and gelling properties of a novel glucan from *Leuconostoc dextranicum* NRRL B-1146. **Food Research International**, v. 42, p. 525–528, 2009.

MARCHESI, J. R.; RAVEL, J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. **Microbiome**, v. 1, p. 1-3, 2015.

MARCOTTE, M.; HOSHAHILI, A. R. T.; RAMASWAMY, H. S. Rheological properties of selected hydrocolloids as a function of concentration and temperature. **Food Research International**, v. 34, n. 8, p. 695-703, 2001.

MARTÍN, J. F.; CASQUEIRO, J.; LIRAS, P. Secretion systems for secondary metabolites: how producer cells send out messages of intercellular communication. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, p. 282–293, 2005.

MATSUZAKI, C.; KAMISHIMA, K.; MATSUMOTO, K.; KOGA, H.; KATAYAMA, T.; YAMAMOTO, K.; HISA, K. Immunomodulating activity of exopolysaccharide - producing *Leuconostoc mesenteroides* strain NTM048 from green peas. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, p. 980–989, 2014.

MAURYA, D. K.; KUMAR, A.; CHAURASIYA, U.; HUSSAIN, T.; SINGH, S. K. **Modern era of microbial biotechnology: opportunities and future prospects**. In: Cockle, C. Microbiomes and Plant Health. Panoply and their applications, Academic Press, 2021, p. 317-343.

MAVROUDI, A. Probiotics in Pediatrics – Properties, Mechanisms of Action, and Indications. In: RIGOBELLO, E. C. **Probiotics**. 1. ed. Rijeka, Croácia: InTech, 2012. p. 310–324.

MCCLEMENTS, D. J. **Food Emulsions. Principles, Practices, and Techniques**. 3 ed. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, 2016.

MCFREDERICK, Q. S.; VUONG, H. Q.; ROTHMAN, J. A. *Lactobacillus micheneri* sp. nov., *Lactobacillus timberlakei* sp. nov. and *Lactobacillus quenuiae* sp. nov., lactic acid bacteria isolated from wild bees and flowers. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 68, p. 1879–1884, 2018.

MEYBODI, N. M.; MOHAMMADIFAR, M. A. Microbial Exopolysaccharides: A Review of Their Function and Application in Food Sciences. **Journal of Food Quality and Hazards Control**, v. 2, p. 112-117, 2015.

MIAO, M.; MA, Y.; HUANG, C.; JIANG, B.; CUI, S. W.; ZHANG, T. Physicochemical properties of a water soluble extracellular homopolysaccharide from *Lactobacillus reuteri* SK24.003, **Carbohydrate Polymers**, v. 131, p. 377-383, 2015.

MIAO, M.; JIA, X.; HAMAKER, B. R.; CUI, S. W.; JIANG, B.; HUANG, C. Structure-prebiotic properties relationship for α -D-glucan from *Leuconostoc citreum* SK24.002. **Food Hydrocolloids**, v. 57, p. 246-252, 2016.

MICHALAK, M.; GUSTAW, K.; WAŚKO, A.; POLAK-BERECKA, M. Composition of lactic acid bacteria during spontaneous curly kale (*Brassica oleracea* var. *sabellica*) fermentation. **Microbiological Research**, v. 206, p. 121-130, 2018.

MIN, W. H.; FANG, X. B.; WU, T.; FANG, L.; LIU, C. L.; WANG, J. Characterization and antioxidant activity of an acidic exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* JLAU103. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 127, n. 6, p. 758-766, 2019.

MIRANDA, J. S.; COSTA, B. V.; DE OLIVEIRA, I. V.; DE LIMA, D. C. N.; MARTINS, E. M. F.; LEITE JÚNIOR, B. R. C.; BENEVENUTO, W. C. A. N.; DE QUEIROZ, I. C.; DA SILVA, R. R.; MARTINS, M. L. Probiotic jelly candies enriched with native Atlantic Forest fruits and *Bacillus coagulans* GBI-30 6086. **LWT - Food Science and Technology**, v 126, p. 109275, 2020.

MISHRA, A.; JHA, B. Microbial Exopolysaccharides. In: Rosenberg E; DeLong E. F.; Thompson, F.; Lory, S.; Stackebrandt, E. **The Prokaryotes**. Applied Bacteriology and Biotechnology, 2013, doi:10.1007/978-3-642-31331-8_25.

MOGENSEN, G.; SALMINEN, S.; O'BRIEN, J.; OUWEHAND, A.; HOLZAPFEL, W.; SHORTT, C.; FONDEN, R.; MILLER, G.D.; DONOHUE, D.; PLAYNE, M.; CRITTENDEN, R.; BIANCHI SALVADORI, B.; ZINK, R. Inventory of microorganisms with a documented history of use in food. **Bulletin - International Dairy Federation**, n. 377, p. 10-19, 2002.

MONTEAGUDO-MERA, A.; RODRÍGUEZ-APARICIO, L.; RÚA, J.; MARTÍNEZ-BLANCO, H.; NAVASA, N.; GARCÍA-ARMESTO, M. R.; FERRERO, M. A. *In vitro* evaluation of physiological probiotic properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin. **Journal of Functional Foods**, v. 4, n. 2, p. 531-541, 2012.

MORA-VILLALOBOS, J. A.; MONTERO-ZAMORA, J.; BARBOZA, N.; ROJAS-GARBANZO, C.; USAGA, J.; REDONDO-SOLANO, M.; SCHROEDTER, L.; OLSZEWSKA-WIDDRAT, A.; LÓPEZ-GÓMEZ, J. P. Multi-Product Lactic Acid Bacteria Fermentations: A Review. **Fermentation**, v. 6, n. 23, 2020.

MOSCOVICI, M. Present and future medical applications of microbial exopolysaccharides. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 2015. doi.org/10.3389/fmicb.2015.01012.

MÜNKEL, F.; FISCHER, A.; WEFERS, D. Structural characterization of mixed-linkage α -glucans produced by mutants of *Lactobacillus reuteri* TMW 1.106 dextransucrase. **Carbohydrate Polymers**, v. 231, 115697, 2020.

NISSEN, L.; PEREZ-MARTINEZ, G.; YEBRA, M. J. Sorbitol synthesis by an engineered *Lactobacillus casei* strain expressing a sorbitol-6-phosphate dehydrogenase gene within the lactose operon. **FEMS Microbiology Letters**, v. 249, pp. 177-183, 2005.

O'CONNOR, E. B.; BARRETT, E.; FITZGERALD, G; HILL, C.; STANTON, C.; ROSS R. P. Production of vitamins, exopolysaccharides and bacteriocins by probiotic bacteria. In: Tamime A. Y, editors. **Probiotic Dairy Products**. p. 167-194, 2005.

ORLANDELLI, R. C.; DA SILVA, M. L. C.; VASCONCELOS, A. F. D.; ALMEIDA, I. V.; VICENTINI, V. E. P.; PRIETOC, A.; HERNANDEZC, M. D. D.; AZEVEDO, J. L.; PAMPHILEA, J. A. β -(1 \rightarrow 3,1 \rightarrow 6)-D-glucans produced by *Diaporthe* sp. endophytes: Purification, chemical characterization and antiproliferative activity against MCF-7 and HepG2-C3A cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 94, p. 431-437, 2017.

OROIAN, M.; ESCRICHE, I. Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. **Food Research International**, v. 74, p. 10–36, 2015.

OYAMA, L. M.; SILVA, F. P.; CARNIER, J.; DE MIRANDA, D. A.; SANTAMARINA, A. B.; RIBEIRO, E. B. Juçara pulp supplementation improves glucose tolerance in mice. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, 1–8, 2016.

PADMANABHAN, A.; SHAH, N. P. Structural characterization of exopolysaccharide from *Streptococcus thermophilus* ASCC 1275. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 8, p. 6830–6842, 2020.

PALANIRAJ, A.; JAYARAMAN, J. Production, recovery and applications of xanthan gum by *Xanthomonas campestris*. **Journal of Food Engineering**, v. 106, p. 1–12, 2011.

PATEL, S.; KASOJU, N.; BORA, U.; GOYAL, A. Structural analysis and biomedical applications of dextran produced by a new isolate *Pediococcus pentosaceus* screened from biodiversity hot spot Assam. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 6852–6855, 2010.

PATEL, S.; MAJUMDER, A.; GOYAL, A. Potentials of exopolysaccharides from lactic acid bacteria. **Indian Journal Microbiology**, v. 52, p. 3–12, 2012.

PATEL, A.; SHAH, N.; PRAJAPATI, J. B. Biosynthesis of vitamins and enzymes in fermented foods by lactic acid bacteria and related genera - A promising approach. **Croatian Journal of Food Science and Technology**, v. 5, n. 2, p. 85–91, 2013.

PATRICK, O. M. Lactic acid bacteria in health and disease. **Rwanda Journal of Health Sciences**, v.1, n.1, p.39–50, 2012.

PEREIRA, G. V. M.; KARP, S. G.; LETTI, L. A. J.; PAGNONCELLI, M. G. B.; FINCO, A. M.; MACHADO, M.; SOCCOL, C. R. Bioactive Polysaccharides Produced by Microorganisms: Production and Applications. *In*: SARAN, S.; BABU, V.; CHAUBEY, A. **High Value Fermentation Products**. 2. ed. Curitiba: Scrivener Publishing Llc, 2019. p. 231–252.

PORRU, C.; RODRÍGUEZ-GÓMEZ, F.; BENÍTEZ-CABELLO, A.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R.; ZARA, G.; BUDRONI, M.; MANNAZZU, I.; ARROYO-LÓPEZ, F. N. Genotyping, identification and multifunctional features of yeasts associated to Bosana naturally black table olive fermentations. **Microbiologia Alimentar**, v. 69, p. 33–42, 2018.

PRASANNA, P. H. P.; BELL, A.; GRANDISONA, A. S.; CHARALAMPOPOULOSA, D. Emulsifying, rheological and physicochemical properties of exopolysaccharide produced by *Bifidobacterium longum subsp. infantis* CCUG 52486 and *Bifidobacterium infantis* NCIMB 702205. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, p. 533–540, 2012.

QUINTO, E. J.; JIMÉNEZ, P.; CARO, I.; TEJERO, J.; MATEO, J.; GIRBÉS, T. Probiotic Lactic Acid Bacteria: A Review. **Food and Nutrition Sciences**, v. 5, p. 1765–1775, 2014.

RAGHUNANDAN, K.; KUMAR, A.; KUMAR, S.; PERMAUL, K.; SINGH, S. Production of gellan gum, an exopolysaccharide, from biodiesel-derived waste glycerol by *Sphingomonas spp.* **3 Biotech**, v. 8, p. 2-13, 2018. doi.org/10.1007/s13205-018-1096-3.

RAJASEKARAN, R.; CHANDRASEKARAN, R.; MUTHUSELVAM, M. Microbial Biotechnology: Rapid Advances in an area of massive impact. **Advanced Biotech**, p. 19-25, 2008.

RANI, R. P.; ANANDHARAJ, M.; RAVINDRAN, A. D. Characterization of a novel exopolysaccharide produced by *Lactobacillus gasserii* FR4 and demonstration of its *in vitro* biological properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 109, p. 772-783, 2018.

REIS, M. S.; MARIOT, A.; MANTOVANI, A. Palmito. In: BARBIERI, R.L.; STUMPF, E.R.T. **Origem e evolução de plantas cultivadas**. Brasília: Embrapa. Informação Tecnológica, 2008, p. 651-676.

REIS, N. A.; SARAIVA, M. A. F.; DUARTE, E. A. A.; DE CARVALHO, E. A.; VIEIRA, B. B.; EVANGELISTA-BARRETO, N. S. Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from human milk. **Journal of Applied Microbiology**, v. 121, p. 811-820, 2016.

REVUELTA, J. L.; BUEY, R. M.; LEDESMA-AMARO, R.; VANDAMME, E. J. Microbial biotechnology for the synthesis of (pro) vitamins, biopigments and antioxidants: challenges and opportunities. **Microbial biotechnology for food supplements**, v. 9, n. 5, p. 564-567, 2016.

ROMO-BUHELLEY, J.; RODRÍGUEZ-TORRES, M.; OROZCO-SÁNCHEZ, F. Biotechnological valorization of agro industrial and household wastes for lactic acid production. **Revista Colombiana de Biotecnología**, v. 21, n. 1, 2019.

RUAS-MADIEDO, P.; DE LOS REYES-GAVILÁN, 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.

RUFINO, M. D. S. M.; ALVES, R. E.; DE BRITO, E. S.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURACALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, n. 4, p. 996–1002, 2010.

RYAN, P.; ROSS, R.; FITZGERALD, G.; CAPLICE, N.; STANTON, C. Sugar-coated: exopolysaccharide producing lactic acid bacteria for food and human health applications. **Food Functional**, v. 6, p. 679–693, 2015.

SAADAT, Y. R.; KHOSROUSHAHI, A. Y.; GARGARI, B. P. A comprehensive review of anticancer, immunomodulatory and health beneficial effects of the lactic acid bacteria exopolysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 217, p. 79-89, 2019.

SAKANDAR, H. A.; KUBOW, S.; SADIQ, F. A. Isolation and *in-vitro* probiotic characterization of fructophilic lactic acid bacteria from Chinese fruits and flowers. **LWT-Food Science and Technology**, v. 104, p. 70-75, 2019.

SAMPAIO, I. C. F.; CRUGEIRA, P. J. L.; SOARES, L. G. P.; DOS SANTOS, J. N.; DE ALMEIDA, P. F.; PINHEIRO, A. L. B.; SILVEIRA JUNIOR, L. Composition of Xanthan gum produced by *Xanthomonas campestris* using produced water from a carbonated oil field through Raman spectroscopy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 213, 112052, 2020.

SANLIBABA, P.; ÇAKMAK, G. A. Exopolysaccharides Production by Lactic Acid Bacteria. **Applied Microbiology Open Access**, v. 2, n. 2, p. 2-5, 2016.

SCHATZ, M. C.; WITKIWSKI J.; MCCOMBIE, W.R. Current challenges in de novo plant genome sequencing and assembly. **Genome biology**, v. 13, n. 4, p. 1-7, 2012.

SCHLAEPPI, K.; BULGARELLI, D. The plant microbiome at work. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v. 28, n. 3, p. 212-7, 2015.

SCHRAMM, G. **Reologia e Reometria: fundamentos teóricos e práticos**. São Paulo: Artliber, 2006.

SCHULZ, M.; BORGES, G. S. C.; GONZAGA, L. V.; SERAGLIO, S. K. T.; OLIVO, I. S.; AZEVEDO, M. S.; NEHRING, P.; GOIS, J. S.; ALMEIDA, T. S.; VITALI, L.; SPUDEIT, D. A.; MICKE, G. A.; BORGES, D. L. G.; FETT, R. Chemical composition, bioactive compounds and antioxidant capacity of juçara fruit (*Euterpe edulis Martius*) during ripening. **Food Research International**, v. 77, p.125–131, 2015.

SHARMA, A.; GUPTA, G.; AHMAD, T.; KAUR, B.; HAKEEM, K. R. Tailoring cellular metabolism in lactic acid bacteria through metabolic engineering. **Journal of Microbiological Methods**, v. 170, 2020.

SOANEN, N.; DA SILVA, E.; GARDARIN, C.; MICHAUD, P.; LAROCHE, C. Improvement of exopolysaccharide production by *Porphyridium marinum*. **Bioresource Technology**, v. 213, p. 231-238, 2016.

SOUZA, D. M.; GARCIA-CRUZ, C. H. Produção fermentativa de polissacarídeos extracelulares por bactérias. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 25, p. 331-340, 2004.

STANG, M. SCHUCHMANN, H.; SCHUBERT, H. Emulsification in High-Pressure Homogenizers. **Engineering in Life Sciences**, v. 1, p. 151-157, 2001.

SURBER, G.; SCHÄPER, C.; WEFERS, D.; ROHM, H.; JAROS, D. Exopolysaccharides from *Lactococcus lactis* affect manufacture, texture and sensory properties of concentrated acid milk gel suspensions (fresh cheese). **International Dairy Journal**, v. 112, 104854, 2021. doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104854.

TACHIBANA, L.; TELLI, G. S.; DIAS, D. C.; GONÇALVES, G. S.; ISHIKAWA, C. M.; CAVALCANTE, R. B.; NATORI, M. M.; HAMED, S. B.; RANZANI-PAIVA, M. J. T. Effect of feeding strategy of probiotic *Enterococcus faecium* on growth performance, hematologic, biochemical parameters and non-specific immune response of Nile tilapia. **Aquaculture Reports**, v. 16, 2020.

TOPÇU, K. C.; KAYA, M.; KABAN, G. Probiotic properties of lactic acid bacteria strains isolated from pastirma. **LWT- Food Science and Technology**, v. 134, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110216>

TORRES, S.; VERÓN, H.; CONTRERAS, L.; ISLA, M. I. An overview of plant-autochthonous microorganisms and fermented vegetable foods. **Food Science and Human Wellness**, v. 9, n. 2, p. 112-123, 2020.

TRABELSI, I.; KTARI, N.; SLIMA, S. B.; TRIKI, M.; BARDAA, S.; MNIF, H.; SALAH, R. B. Evaluation of dermal wound healing activity and in vitro antibacterial and antioxidant activities of a new exopolysaccharide produced by *Lactobacillus* sp.Ca6. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 103, p. 194-201, 2017.

URAI M, YOSHIZAKI H, ANZAI H, OGIHARA J, IWABUCHI N, HARAYAMA S, SUNAIRI M, NAKAJIMA M. Structural analysis of mucoid, an acidic extracellular polysaccharide produced by a pristane-assimilating marine bacterium, *Rhodococcus erythropolis* PR4. **Carbohydrate Research**, v. 342, p. 927–932, 2007.

VAJRAVELU, K.; PRASAD, K. V.; DATTI, P. S. RAJU, B. T. MHD flow and heat transfer of an Ostwald–de Waele fluid over an unsteady stretching surface. **Ain Shams Engineering Journal**, v. 5, n. 1, p. 157-167, 2014.

VARUZZA, L. Introdução à análise de dados de sequenciadores de nova geração Versão 2.0.1. 2013. Disponível em: http://lvaruzza.com/files/apostila_bioinfo_2.0.1.pdf. Acesso em 28/07/2017.

VETTORI, M. H. P. B.; FRANCHETTI, S. M. M.; CONTIERO, J. Structural characterization of a new dextran with a low degree of branching produced by *Leuconostoc mesenteroides* FT045B dextranase. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, p. 1440– 1444, 2012.

VIDHYASAGAR, V.; JEEVARATNAM, K. Evaluation of *Pediococcus pentosaceus* strains isolated from Idly batter for probiotic properties *in vitro*. **Journal of Functional foods**, v. 5, p. 235-243, 2013.

WANG, J.; ZHAO, X.; TIAN, Z.; YANG, Y.; YANG, Z. Characterization of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW11 isolated from Tibet Kefir. **Carbohydrate Polymers**, v.25, p.16–25, 2015.

WANG, K.; LI, W.; RUI, X.; CHEN, X.; JIANG, M.; DONG, M. Characterization of a novel exopolysaccharide with antitumor activity from *Lactobacillus plantarum* 70810. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 63, p. 133– 139, 2014.

WANG, X.; YANG, Y.; HUYCKE, M. M. Risks associated with enterococci as probiotics. **Food Research International**, v. 129, 108788, 2020.

WANG, Y.; DU, R.; QIAO, X.; ZHAO, B.; ZHOU, Z.; HAN, Y. Optimization and characterization of exopolysaccharides with a highly branched structure extracted from *Leuconostoc citreum* B-2. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 142, p. 73-84, 2020a.

WANG, X.; SHAO, C.; LIU, L.; GUO, X.; XU, Y.; LÜ, X. Optimization, partial characterization and antioxidant activity of an exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* KX041. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 103, p. 1173-1184, 2017.

WANG, X.; WANG, W.; LV H.; ZHANG, H.; LIU, Y.; ZHANG, M.; WANG, Y.; TAN, Z. Probiotic Potential and Wide-spectrum Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria Isolated from Infant Feces. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, 2020b. doi.org/10.1007/s12602-020-09658-3.

WANGPAIBOON, K.; PADUNGROS, P.; NAKAPONG, S.; CHAROENWONGPAIBOON, T.; REJZEK, M.; FIELD, R. A.; PICHYANGKURA, R. An α -1,6-and α -1,3-linked glucan produced by *Leuconostoc citreum* ABK-1 alternansucrase with nanoparticle and film-forming properties. **Scientific Reports**, v. 8, 8340, 2018. doi:10.1038/s41598-018-26721-w.

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

WILHAM, C. A.; ALEXANDER, B. H.; JEANES, A. Heterogeneity in dextran preparations. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 59, p. 61-75, 1955.

WU, C.; HUANG, J.; ZHOU, R. Genomics of lactic acid bacteria: Current status and potential applications. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 393-404, 2017.

XU, N.; WEI, L.; LIU, J. Recent advances in the applications of promoter engineering for the optimization of metabolite biosynthesis. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 35, 2019.

XU, Y.; ZHOU, T.; TANG, H.; LI, X.; CHEN, Y.; ZHANG, L.; ZHANG, J. Probiotic potential and amyolytic properties of lactic acid bacteria isolated from Chinese fermented cereal foods. **Food Control**, v. 111, 2020. doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.107057.

YANG, S. C.; LIN, C. H.; SUNG, C. T.; FANG, J. Y. Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 1-10, 2014.

YANG, Y.; FENG, F.; ZHOU, Q.; ZHAO, F.; DU, R.; ZHOU, Z.; HAN, Y. Isolation, purification and characterization of exopolysaccharide produced by *Leuconostoc pseudomesenteroides* YF32 from soybean paste. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 114, p. 529-535, 2018.

YE, G.; LI, G.; WANG, C.; LING, B.; YANG, R.; HUANG, S. Extraction and characterization of dextran from *Leuconostoc pseudomesenteroides* YB-2 isolated from mango juice. **Carbohydrate Polymers**, v. 207, p. 218-223, 2019.

YI, L.; QIA, T.; HONGA, Y.; DENG, L.; ZENGA, K. Screening of bacteriocin-producing lactic acid bacteria in Chinese homemade pickle and dry-cured meat, and bacteriocin identification by genome sequencing. **LWT - Food Science and Technology**, v. 125, 2020.

ZAROOR, K.; VIECO, N.; PÉREZ-RAMOS, A.; NÁCHER-VÁZQUEZ, M.; MOHEDANO, L.; LÓPEZ, P. **Food Ingredients Synthesized by Lactic Acid Bacteria**. In. Wolff A. G.

Microbial Production of Food Ingredients and Additives. Handbook of Food Bioengineering, Academic Press, 2017, p. 89-124.

ZARRINTAJ, P.; SAEB, M. R.; JAFARI, S. H.; MOZAFARI, M. Application of compatibilized polymer blends in biomedical fields. In. AJITHA, A. R.; SABU, T. **Compatibilization of Polymer Blends Micro and Nano Scale Phase Morphologies, Interphase Characterization and Properties**. Elsevier, 2020, p. 511-537.

ZHANG, G. Q.; CHEN, Q. J.; SUN, J.; WANG, H. X.; HAN, C. H. Purification and characterization of a novel acid phosphatase from the split gill mushroom *Schizophyllum commune*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 53, p. 868–875, 2013.

ZHANG, G.; TAN, Y.; YU, T.; WANG, S.; LIU, L.; LI, C. Synergistic antibacterial effects of reuterin and catechin against *Streptococcus mutans*. **LWT - Food Science and Technology**, 110527, 2021. doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110527.

ZHANG, G.; ZHANG, W.; SUN, L.; SADIQ, F. A.; YANG, Y.; GAO, J.; SANG, Y. Preparation screening, production optimization and characterization of exopolysaccharides produced by *Lactobacillus sanfranciscensis* Ls-1001 isolated from Chinese traditional sourdough. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 139, p. 1295–1303, 2019.

ZHANG, H.; REN, W.; GUO, Q.; XIONG, Z.; WANG, G.; XIA, Y.; LAI, P.; YIN, B.; AI, L. Characterization of a yogurt-quality improving exopolysaccharide from *Streptococcus thermophilus* AR333. **Food Hydrocolloids**, v. 81, p. 220-228, 2018.

ZHANG, J.; LIU, L.; CHEN, F. Production and characterization of exopolysaccharides from *Chlorella zofingiensis* and *Chlorella vulgaris* with anti-colorectal cancer activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 134, p. 976-983, 2019.

ZHANG, L.; LIU, C.; DA LI, ZHAO, Y.; ZHANG, X.; ZENG, X.; YANG, Z.; LI, S. Antioxidant activity of an exopolysaccharide isolated from *Lactobacillus plantarum* C88. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 54, p. 270– 275, 2013.

ZHENG, J.; WITTOUCK, S.; SALVETTI, E.; FRANZ, C. M. A. P.; HARRIS, H. M. B.; MATTARELLI, P.; O'TOOLE, P. W.; POT, B.; VANDAMME, P.; WALTER, J.; WATANABE, K.; WUYTS, S.; FELIS, G. E.; GÄNZLE, M. G.; LEBEER, S. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, p. 2782–2858, 2020.

ZHOU, Q.; FENG, F.; YANG, Y.; ZHAO, Y.; DU, R.; ZHOU, Z.; HAN, Y. Characterization of a dextran produced by *Leuconostoc pseudomesenteroides* XG5 from homemade wine. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, p. 2234–2241, 2018.

ZHU, Y.; WANG, C.; JIA, S.; WANG, B.; ZHOU, K.; CHEN, S.; YANG, Y.; LIU, S. Purification, characterization and antioxidant activity of the exopolysaccharide from *Weissella cibaria* SJ14 isolated from Sichuan paocai. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 115, p. 820-828, 2018.

CAPÍTULO II ¹

¹ Artigo a ser submetido na Revista **Food Technology and Biotechnology (FTB)**

Fernanda Silva Farinazzo*, Maria Thereza Carlos Fernandes, Carolina Saori Ishii Mauro and Sandra Garcia

*State University of Londrina (UEL), Agricultural Science Center, Department of Food Science and Technology, Celso Garcia Cid Highway, PR Route 445, Km 380, Londrina, Paraná, Brazil

*Corresponding author. E-mail address: fsfarinazzo@gmail.com (F. S. Farinazzo).

Evaluation of lactic acid bacteria strains isolated from native Atlantic Forest juçara fruit for probiotic properties *in vitro*.

SUMMARY

Research background. Lactic acid bacteria are the most common microorganisms applied as probiotics. The probiotic benefits are dependent on strains so there is always a need to investigate new cultures with probiotic properties. Fruits such as juçara, a palm from the Atlantic Forest, threatened with extinction, are niches rich in microorganisms, including LAB. Thus, in this study, the probiotic properties of *Lactococcus lactis* J7 and *Leuconostoc pseudomesenteroides* JF17 strains, isolated from juçara fruits (*Euterpe edulis* Martius), native to the Atlantic Forest, were investigated.

Experimental approach. Probiotic characteristics, such as tolerance to gastrointestinal simulated fluids or juices, hydrophobicity, autoaggregation and coaggregation properties, inhibition of pathogenic microorganisms and technological properties were evaluated.

Results and conclusions. The survival rate of *L. lactis* J7 and *L. pseudomesenteroides* JF17 decreased after simulated gastrointestinal conditions, however, *L. lactis* J7 was more resistant, maintaining a viability at the end of the enteric phase of 6.07 ± 0.16 log CFU / mL. The J7 strain also showed the highest value in terms of hydrophobicity ($12.55 \pm 0.52\%$), autoaggregation ($25.63 \pm 0.75\%$), and coaggregation capacity with *E. coli* ATCC 25922 ($21.52 \pm 0.98\%$) and *S. enteritidis* ATCC 13076 ($22.68 \pm 1.01\%$). However, both J7 and JF17 had antimicrobial activity proven by multilayer agar plate system. In addition, the growth of the strains was influenced by temperature, and they were able to grow in high concentrations of sodium chloride (6%). Thus, *L. lactis* J7 is a promising probiotic candidate for the development of functional products.

Novelty and scientific contribution. Novel strains should be studied to expand the use of probiotic microorganisms in the development of food and drug products. In addition, fruits are niches rich in bacteria with potential health benefits, not yet studied.

Key words: *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Euterpe edulis* Martius, Aggregation activity, simulated gastrointestinal.

INTRODUCTION

Lactic acid bacteria (LAB), widespread in nature, are among the most important microorganisms, known mainly to produce fermented foods (1). Furthermore, LAB are the most common microorganisms applied as probiotics. They are a desirable member of the gastrointestinal tract microbiota and have the GRAS (Generally Recognised As Safe) status (2). According to FAO/WHO (3) probiotics are living microorganisms that provide beneficial effects to consumers when administered in adequate amounts. Several studies carried out with probiotics indicated that the spectrum of LAB having probiotic characteristics is expanding. The beneficial effects of probiotics are specific to each strain, pointing to the need to use several natural sources to identify new probiotic candidates (4).

Most of the probiotic microorganisms used in commercial products belong to members of the genera *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*, but not exclusively (5). A large number of LAB isolated from different food sources, have been studied for their probiotic potential (6, 7, 8, 9). To evaluate probiotic properties of microorganisms, *in vitro* assays are routinely used as an alternative to more complex biological experiments and costly *in vivo* experiments (10).

In vitro tests have been developed and applied as selection criteria to identify potential probiotics. A probiotic strain must be able to survive through the intestinal tract and stomach, with a drastically low pH in the unfavorable environment, as well as be able to tolerate the damaging effect of gastrointestinal enzymes (11). In addition, potential probiotics must be able to adhere and colonize the intestinal cell wall to trigger any direct interaction between the probiotic and host cells, leading to competitive exclusion of pathogens and modulation of host responses (12).

Thus, *in vitro* models of gastrointestinal digestion, adhesion and autoaggregation assays are of crucial importance in testing the applicability of probiotic strains. However, maintaining the high viability of free probiotic bacteria in human and animal organisms is a challenge due to adverse conditions in the gastrointestinal tract, caused by the presence of acid, bile and digestive enzymes (10).

Fruits and vegetable are providing an outstanding autochthonous microbiota, including LAB strains with undiscovered probiotic properties that could be exploited to generate novel health promoting fermented foods (13). Brazil has a great diversity of biomes and the Atlantic Forest stands out for its variety of fruits. Due to its rich biodiversity, there are fruits that stand out for their nutritional value, such as the juçara palm (*Euterpe edulis* Martius) (14). Known mainly for the extraction of its heart of palm, which placed it on the list of species threatened with extinction, the exploitation of its fruits is a sustainable use, which has collaborated with its preservation (15).

To our knowledge, no research has evaluated the use of autochthonous LAB from juçara palm fruits. Novel strains should be studied to expand the use of probiotic microorganisms in

food. Therefore, the objective of this study is to identify new probiotic candidates from LAB isolated from juçara fruits, as well as to investigate the potential probiotic properties of the cultures.

MATERIAL AND METHODS

Isolation of LAB from juçara fruit

The LAB strains were isolated from samples of the juçara fruit, harvested in May of the years 2017 and 2018, from Bimini Farm (23°14' 0.48'S; 51° 4' 0.43' W), in the region of Rolandia, Brazil. Juçara fruit was protected by genetic heritage with the A701C5B registration. The fruits (1kg) were processed immediately after collection, washed, and pulped (1: 1 / fruits: sterile water) in a planetary mixer (Arno, 408002194 BPA, Brazil) previously sanitized. The pulp obtained was fractionated in erlenmeyer flasks (n = 5) and incubated at 25 °C for 48 h (Incubator Novatecnica®, Brazil). After this period, serial dilutions of fermented juçara pulp were prepared in 0.1% (w / v) peptoned water followed by plating these dilutions in MRS (Merck®, Germany) agar plates. These plates were incubated at 30 °C for 48 h for the isolation of LAB species. Following the cultivation of LAB, colonies were randomly selected from corresponding agar plates and tested for cell morphology, Gram stain and catalase reaction (16). In total, 198 isolates were subsequently selected for their morphological and molecular characterization of the 16S rRNA.

Identification of LAB through 16s rRNA sequencing

Seven identical colonies with circular and smooth structure, cocci or rod morphology, Gram positive, catalase negative, and that ferment glucose with gas production, were subjected to molecular characterization to sequencing of the 16S rRNA molecular marker. For the identification of LAB by 16S rRNA sequencing, the MiSeq Sequencing System (Illumina Inc., USA) and Next Generation Sequencing (NGS) (Neopropecta Microbiome Technologies, Florianopolis, Brazil) were used. The amplicon sequencing library preparation was performed for bacteria using the VS - V4 16S rRNA gene primers 341 F (CCTACGGGRSGCAGCAG; 5' - 3' (17) and 806 R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT; 5' - 3' (18). PCR reactions were performed in triplicate using Platinum Taq (Invitrogen, USA): PCR 1: 95 °C for 5 min, 25 cycles of 95 °C for 45 s, 55 °C for 30 s and 72 °C for 45 s and a final extension of 72 °C for 2 min. PCR 2: 95 °C for 5 min, 10 cycles of 95 °C for 45 s, 66 °C for 30 s, 72 °C for 45 s and a final extension of 72 °C for 2 min. The final PCR was cleared using AMPureXP (Beckman Coulter, Brea, CA) and samples were pooled in the sequencing libraries for quantification. The DNA

concentration of the pool amplicon was estimated with Picogreen ds DNA assays (Invitrogen, USA), and then the pooled libraries were diluted for accurate quantification of qPCR using KAPA Library Quantification Kit for Illumina platforms (KAPA Biosystems, Woburn, MA). The library pool was adjusted and sequenced in a MiSeq system, using standard Illumina primers (Illumina, San Diego, CA). The identified LAB was registered with GenBank and were stored in MRS broth supplemented with 20% (w/v) glycerol at – 80 °C. Microorganisms were also protected by Brazilian genetic heritage with the A02124C and A38EECB registers to *L. pseudomesenteroides* and *L. lactis*, respectively.

Potential probiotic characteristics in vitro

Tolerance to simulated gastrointestinal (GIT) conditions

The tolerance to simulated GIT conditions test was performed by successively exposing the strains to gastric and enteric simulated juices as described by Bedani et al. (19). *L. lactis* J7 and *L. pseudomesenteroides* JF17 were grown for 24 h at 30 °C in MRS broth (~ 9 log CFU / mL). Ten milliliters from each triplicate dilution of culture of strains J7 and JF17 in 0.85 g / 100 mL NaCl (Synth, Brazil) solution were transferred to 3 sterile flasks, with a total of 9 flasks containing the samples, and pH was adjusted to 2.0 - 2.5 with HCl 1 N (Synth, Brazil). In addition, pepsin (from porcine gastric mucosa, Sigma-Aldrich) and lipase (from *Rhizopus oryzae*, Sigma-Aldrich) were added to samples reaching a final concentration of 3 g / L and 0.9 mg / L, respectively. Flasks were incubated at 37 °C for 2 h in a shaker with agitation of 150 rpm (NT233, Novatecnica, Brazil), leading to the simulated gastric phase. Then, the pH of samples was adjusted to 4.5 – 5.5 using a pH 12 buffer solution (Hexis®). Bile (bovine bile, Sigma-Aldrich) and pancreatin (pancreatin from porcine pancreas, Sigma-Aldrich) were added to a final concentration of 10 g / L and of 1 g / L, respectively. After, samples were incubated again at 37 °C for 2 h under agitation to simulate enteric phase I. Finally, the pH was adjusted to 6.5 – 7.5 using the same buffer solution (pH 12), containing bile and pancreatin adjusted to maintain the concentration of 10 g / L and 1 g / L, respectively, and the samples were incubated again at 37 °C for 2 h under agitation to simulate enteric phase 2 and reaching 6 h of assay.

Viable counts of strains were determined by plate method using MRS agar after serial dilution in maximum recovery. MRS agar plates were incubated anaerobically at 37 °C for 48 h and the colony forming units estimated. Survival rate was calculated according to the following equation Eq. (1):

$$\text{Survival rate (\%)} = \log \text{CFU } N_1 / \log \text{CFU } N_0 \times 100 \quad / 1 /$$

N_1 , the total viable count of probiotic strains after exposure to *in vitro* GTI conditions (6 h); N_0 , the total viable count of probiotic strains before exposure to *in vitro* GTI conditions (0 h).

Autoaggregation assays

Autoaggregation assays were carried out according to Collado et al. (20) using the autoaggregation percentage. J7 and JF17 strains were grown at 30 °C for 20 h in MRS broth. The bacteria cells were harvested by centrifugation at 10,000 × g for 10 min at 4 °C and washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.2, and then resuspended in the PBS. Absorbance at a wavelength of 600 nm ($A_{600 \text{ nm}}$) was adjusted to 0.25 ± 0.05 to standardize the number of bacteria (7 – 8 log CFU / mL). Then, the bacterial suspensions were incubated in 1 mL aliquots at 37 °C and monitored at different time intervals (0, 2, 4, 6, 10 and 20 h). The absorbance was recorded and the percentage of autoaggregation (AA%) was calculated according to the formula Eq. (2):

$$AA (\%) = [1 - A_t / A_0] \times 100 \quad / 2 /$$

where A_0 represents the absorbance ($A_{600 \text{ nm}}$) at 0 h and A_t represents the absorbance ($A_{600 \text{ nm}}$) at different time intervals (2, 4, 6, 10 and 20 h).

Coaggregation assays

Bacterial suspensions were prepared as described for autoaggregation analysis. Equal volumes of cells (1 mL) of the different probiotic and pathogen strains (*Escherichia coli* ATCC 25922 and *Salmonella enteritidis* ATCC 13076) were mixed and incubated at 37 °C without agitation. The $A_{600 \text{ nm}}$ of the mixtures described above was monitored at different times (0, 2, 4, 6, 10 and 20 h). Absorbance was determined for the mixture and for the bacterial suspensions alone (20). Coaggregation was calculated as follows Eq. (3):

$$AC = \{ [(A_{\text{pat}} + A_{\text{probio}}) / 2 - A_{\text{mix}}] / (A_{\text{pat}} + A_{\text{probio}}) / 2 \} \times 100 \quad / 3 /$$

where A_{pat} and A_{probio} represent $A_{600 \text{ nm}}$ of the separate bacterial suspensions (pathogen and probiotic strains respectively) in control tubes and A_{mix} represents the absorbance of the mixed bacterial suspension at different time intervals (2, 4, 6, 10 and 20 h).

Cell surface hydrophobicity

According to Tallapragada et al. (21), 24 h old bacterial suspensions were prepared as described for autoaggregation analysis and the pellet was washed with sterile saline solution (pH 6) and re-suspended into same solution and OD was measured at 580 nm. The suspension (1.5 mL) was mixed with n-hexadecane in 1: 1 (v / v) ratio and vortexed for 2 min. Two phases separated after 30 min of incubation and OD was measured at 580 nm. The percentage of hydrophobicity was measured according to Eq. (4).

$$\text{Hydrophobicity (\%)} = [(OD_0 - OD_{30}) / OD_0] \times 100 \quad / 4 /$$

where OD_0 and OD_{30} refer to the initial OD and OD measured after 30 min, respectively.

Inhibition of pathogens by multilayer agar plate system

The method of inhibition by the multilayer agar plate system was described by Diep et al. (22), with some modifications. The following layers of agar were added to each plate for testing, 7 ml of MRS agar (1.4% agar) without microorganisms; 7 mL of MRS agar (0.7% agar) plus 0.5 mL of the activated culture of *L. lactis* J7 or *L. pseudomesenteroides* JF17, previously diluted in 0.1% peptone water, to approximately 3 log CFU / mL; 7 mL of BHI agar (Merck®) (0.7% agar) without microorganisms. After incubation at 37 °C for 72 h, for growth of lactic acid bacteria, the last layer was added, containing 7 mL of BHI agar added with 50 µL of a 24 h culture of the indicator pathogen (*E. coli* ATCC 25922 or *S. enteritidis* ATCC 13076), previously diluted in 0.1% peptone water, up to approximately 5 log CFU / mL. The plates were incubated at 37 °C for another 24 h. In case of inhibition, there were halos of non-development of the indicator pathogenic microorganism around the potentially probiotic colonies.

Technological properties of the probiotic strains

Optimum temperature and growth tolerance in the presence of sodium chloride was tested as described by Benavides et al. (1). *L. lactis* J7 or *L. pseudomesenteroides* JF17 (7 log CFU / mL) was inoculated in tubes containing MRS and incubated at 15 °C and 45 °C for 24 h. To evaluate the tolerance in the presence of sodium chloride, the strains evaluated were inoculated in MRS containing 2, 4, and 6% NaCl for 24 h and incubation at 15 °C and 45 °C. The viability was monitored for each treatment and the effect of sodium chloride on cell survival was determined using the plate agar method. *Lactobacillus acidophilus* LA-5 was used as a probiotic control strain in this experiment. Not modified MRS was used as control and the experiment was run in triplicate starting from individual batches of bacterial culture.

Statistical analysis

The means were calculated from repeated measurements performed three times. The statistical analysis was carried out by one-way analysis of variance (ANOVA), and the Tukey's post hoc test was used to determine significant differences between the means. The statistical significance considered was $p < 0.05$ (Statistica software 10.0).

RESULTS AND DISCUSSION

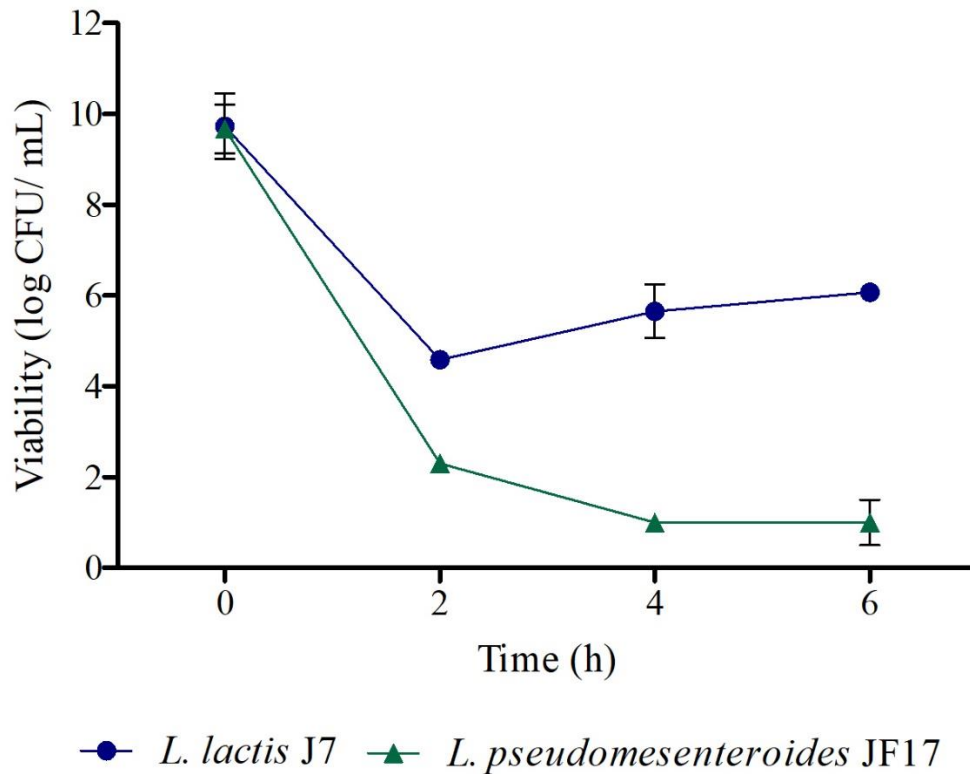
Isolation of lactic acid bacteria

From the samples, seven predominant types of colonies were isolated. Morphologically the colonies were circular or oval, slightly raised, smooth structure, with an entire margin and creamy. Microscopically the strains were identified as Gram-positive, spherical-shaped. Biochemically strains showed catalase-negative reaction and positive for glucose fermentation. Two predominant colonies were identified by 16S rRNA sequencing method. The cultures were 100% like *Lactococcus lactis* and *Leuconostoc pseudomesenteroides*. Thus, the strains were named *L. lactis* J7 (Genbank-MW132602) and *L. pseudomesenteroides* JF17 (GenBank-MN756802).

Tolerance to simulated GIT conditions

The ability of *L. lactis* J7 and *L. pseudomesenteroides* JF17 strains, isolated from juçara fruits, to survive the simulated gastrointestinal conditions was evaluated. Fig. 1 shows the results obtained. Thus, three relevant factors were considered, the influence of acid pH values with pepsin (gastric stress) and the additional action of bile salts and pancreatin (intestinal stress), simulating the successive gastric distribution of bacteria to the intestine during digestion.

Fig. 1. Survival of the isolates *L. lactis* J7 and *L. pseudomesenteroides* JF17 (log CFU/mL), before (0 h) and during exposure to *in vitro* simulated gastric (2 h) and enteric (4 and 6 h) conditions (n = 3, $\bar{x} \pm SD$).



The simulated gastric passage (after 2 h of the *in vitro* test) was a critical step, which significantly decreased viability ($p < 0.05$) in approximately 5 and 7 logarithmic units, for J7 and JF17, respectively. After the complete simulation (6 h of incubation in enteric phase), the viability results were 6.07 ± 0.16 log CFU / mL for J7 and 1.05 ± 0.05 log CFU / mL for JF17. Thus, among the two strains studied, *L. lactis* J7 was the most resistant to simulated gastric and intestinal fluids, while *L. pseudomesenteroides* JF17 was sensitive to this treatment, showing a decrease in viability of almost 8 log CFU / mL (Fig. 1).

Probiotics cannot affect the intestinal environment when ingested unless the population in the intestine reaches a minimum level of 6 to 8 log CFU / g of feces (23), therefore, *L. lactis* J7 could positively influence the intestine of the host. According to Benavides et al. (1) after incubation of the LAB strains analyzed under acidic conditions (pH 2.5) and biliary conditions (0.3%), all isolates, including *L. lactis* subsp. *lactis* UTNFa40, UTNFa38 and UTNFa41, were highly tolerant to acidic conditions (3 h of incubation) and resistant to bile (90% resistance), and after 4 h of incubation, there was a significant increase in viability ($\sim 9 - 9.5$ log CFU / mL), as well as that observed in this work (Fig. 1).

Studies have reported that LAB can survive at low pH levels or simulated gastric juice (24, 25). However, gastric transit tolerance can be considered a variable between strains (26). Although a log-scale reduction of viability may occur, the exposure to acid does not mean that the potential health benefits are lost. However, cells injured may recover in the host's

gastrointestinal tract, ensuring beneficial effects on health. The benefit also may be mediated, for example, through the components of the cell wall of the probiotics which will then be available in both dead and living cells (27).

It is important to note that *in vitro* tests involving pH and bile salts cannot predict patterns of behavior in the human body. This is because most of the methodologies used to analyze potential probiotic strains under stressful conditions are static models, which cannot predict gradual changes in pH values and bile salts in the GIT (28). Since bile salts disorganize the structure of the cell membrane, it is toxic for living cells. Therefore, bile tolerance is considered an important characteristic of the potential probiotic that enables it to survive, grow, and exert its action in gastrointestinal transit (29).

Autoaggregation and Coaggregation activity

The results of autoaggregation assays are shown in Table 1. The highest autoaggregation was observed in *L. lactis* J7, whose autoaggregation percentage increased ($p < 0.05$) from $3.17 \pm 0.05\%$ to $25.63 \pm 0.75\%$ during 2 - 20 h. The studied strain of *L. pseudomesenteroides* JF17 also showed the ability to autoaggregation over time, however, its autoaggregation was approximately 2.3 times less than that presented by the J7 strain, at 20 h. This result may indicate that *L. lactis* J7 has a high potential to adhere to epithelial cells and mucous surfaces, and *L. pseudomesenteroides* JF17 has a lower capacity in this adhesion process (Table 1). Strains with less than 10% are considered to have weak autoaggregation (30).

Compared with other LAB strains, autoaggregation ability of the isolates are within what has already been reported. The percentage of autoaggregation of *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* BB12 and *Lactobacillus casei* Shirota presented 36.7% and 17.9%, respectively (31). *L. lactis* LMG 7930 presented a percentage of 24.12% (32) and *L. lactis* KC24, 36.15% (33). There are not many reports describing molecules involved in the aggregation of *Leuconostoc* strains, however, Zhang et al. (34) reported a 23.29% autoaggregation for *Leuconostoc lactis* isolated from intestine of black porgy fish.

The ability to adhere to epithelial cells and mucosal surfaces has been suggested to be an important property for probiotics. Cell adhesion is a multistep process involving contact of the bacterial cell membrane and interacting surfaces (29). The autoaggregation property of the probiotic candidates is important since it is related to the type and the amount of surface layer protein that contributes to the bacterial adhesion onto the intestinal cell wall. A prerequisite attribute in providing beneficial health effects to the host (24, 35).

Bacterial aggregation between microorganisms of the same strain, autoaggregation, or between genetically different strains, coaggregation, is of considerable importance in several

ecological niches, especially in the human gut. Therefore, the strains J7 and JF17 were not only examined for their autoaggregation ability, but also tested to determine the coaggregation with pathogenic bacteria.

Both strains, J7 and JF17, showed some coaggregation properties with *E. coli* ATCC 25922 and *S. enteritidis* ATCC 13076 (Table 2). However, the coaggregation percentages depended on the specific strain (and strains of the pathogen) and on the incubation time. The *L. lactis* J7 strain showed the highest ($p < 0.05$) coaggregation capacity ($22.68 \pm 1.01\%$) with *S. enteritidis* ATCC 13076, followed by $21.52 \pm 0.98\%$ with *E. coli* ATCC 25922. The percentage of *L. pseudomesenteroides* JF17 coaggregation was approximately 2.0 times lower for both pathogens, as also reported for autoaggregation.

Coaggregation may play an important role in eliminating pathogens from the gastrointestinal tract. Coaggregation with a potential pathogen allows the probiotic strain to produce antimicrobial substances near them, which may inhibit the growth of pathogenic strains in the gastrointestinal tract (35). Thus, the highest value for coaggregation and autoaggregation skills for *L. lactis* J7 suggests that this strain may help prevent colonization of the intestinal system by pathogens (20).

Table 1. Autoaggregation percentage of *L. lactis* J7 and *L. pseudomesenteroides* JF17.

Strains	Time				
	2 h	4 h	6 h	10h	20 h
<i>L. lactis</i> J7	3.17 ^a ± 0.05	3.30 ^a ± 0.31	6.70 ^a ± 0.28	11.21 ^a ± 1.44	25.63 ^a ± 0.75
<i>L. pseudomesenteroides</i> JF17	2.94 ^b ± 0.11	3.19 ^a ± 0.16	5.22 ^b ± 0.95	7.06 ^b ± 0.73	11.16 ^b ± 1.01

The values shown are averages of triplicate determinations (n = 3, x ± SD). Same lowercase letters in the same column, are significantly equals (p < 0.05).

Table 2. Coaggregation percentage with the *L. lactis* J7 and *L. pseudomesenteroides* JF17 strains against pathogens, *E. coli* ATCC 25922 and *S. enteritidis* ATCC 13076.

Time	<i>E. coli</i> ATCC 25922		<i>S. enteritidis</i> ATCC 13076	
	<i>L. lactis</i> J7	<i>L. pseudomesenteroides</i> JF17	<i>L. lactis</i> J7	<i>L. pseudomesenteroides</i> JF17
2 h	2.90 ^a ± 0.36	2.97 ^a ± 0.15	3.08 ^a ± 0.55	3.12 ^a ± 0.48
4 h	4.06 ^a ± 0.24	3.98 ^b ± 0.45	3.35 ^a ± 0.65	6.15 ^b ± 0.55
6 h	5.33 ^a ± 0.58	5.15 ^a ± 0.58	6.64 ^a ± 0.22	8.52 ^b ± 0.89
10 h	10.25 ^a ± 0.99	6.89 ^b ± 0.22	12.58 ^a ± 0.88	9.31 ^b ± 0.88
20 h	21.52 ^a ± 0.98	9.46 ^b ± 0.84	22.68 ^a ± 1.01	12.87 ^b ± 1.02

The values shown are averages of triplicate determinations (n = 3, x ± SD). Same lowercase letters in the same line for the same pathogenic microorganism, are significantly equals (p < 0.05).

Cell surface hydrophobicity

For the hydrophobicity of the bacterial cell surface, *L. lactis* J7 was more adherent ($12.55 \pm 0.52\%$) to n-hexadecane than *L. pseudomesenteroides* JF17 ($4.87 \pm 0.15\%$). The percentages of adherence of these strains tested seem to be lower than the *Lactobacillus* strains previously reported by Tuo et al. (35), which varied between 26.71% (*L. plantarum* 130) and 89.97% (*L. casei* 137). However, they seem to be close to that reported by Tallapragada et al. (21) for *Lactobacillus* sp. G3_4_1TO2 and *Lactobacillus fermentum*, which had hydrophobicity between 10 - 15%.

LAB strains with more than 40% affinity for polar solvents are generally more hydrophobic (36). Thus, in this study, none of the strains can be considered highly hydrophobic, but J7 strain, was the one with the greatest adhesion capacity. As reported by Kimoto-Nira et al. (37), the type of carbohydrate in the broth can affect the hydrophobicity of *Lactococcus lactis* G50 strain. According to the authors, hydrophobicity was 0.70% for fructose, 2.80% for sucrose, 4.20% for glucose, 11.7% for galactose, 14.1% for xylose and 46.8% for lactose. That hydrophobic *Lactobacillus* adhered better to intestinal epithelial cells than did hydrophilic strains (38). Other reports refer to the presence of the hydrophobicity property, the bacterial cells strongly adhere to the mucous cells of the host's intestine and exercise physiological functions (39).

Inhibition of pathogens

It was found that the indicator strains, *E. coli* ATCC 25922 and *S. enteritidis* ATCC 13076, showed sensitivity to the inhibition zone of *L. lactis* J7 and *L. pseudomesenteroides* JF17 when tested by multilayer agar plate system. Both *E. coli* and *Salmonella* are Gram-negative bacteria with a thinner layer of peptidoglycan in cell wall. The relative efficacy of lactic acid against Gram-negative bacteria is not unexpected because this small water-soluble molecule gains access to the periplasm through the water-filled porin proteins of the outer membrane (40). The antimicrobial effect of organic acids lies in the reduction of pH, as well as the undissociated form of the molecules. It has been proposed that the low external pH causes acidification of the cell cytoplasm, while the undissociated acid, can diffuse across the membrane (41). Hwanhlem et al. (6), found that all indicator strains showed sensitivity to the inhibition zone of *L. lactis* subsp. *lactis* KT2W2L when tested by the agar stain test. Wang et al. (42) showed that *Lactobacillus johnsonii* LY1 had high antibacterial efficacy against *E. coli* and *S. enteritidis*, while *L. pseudomesenteroides* P1 had the most powerful capacity against *S. aureus*. Chioda et al. (43) also observed antagonistic action of some LAB against *Salmonella* spp. and *E. coli*

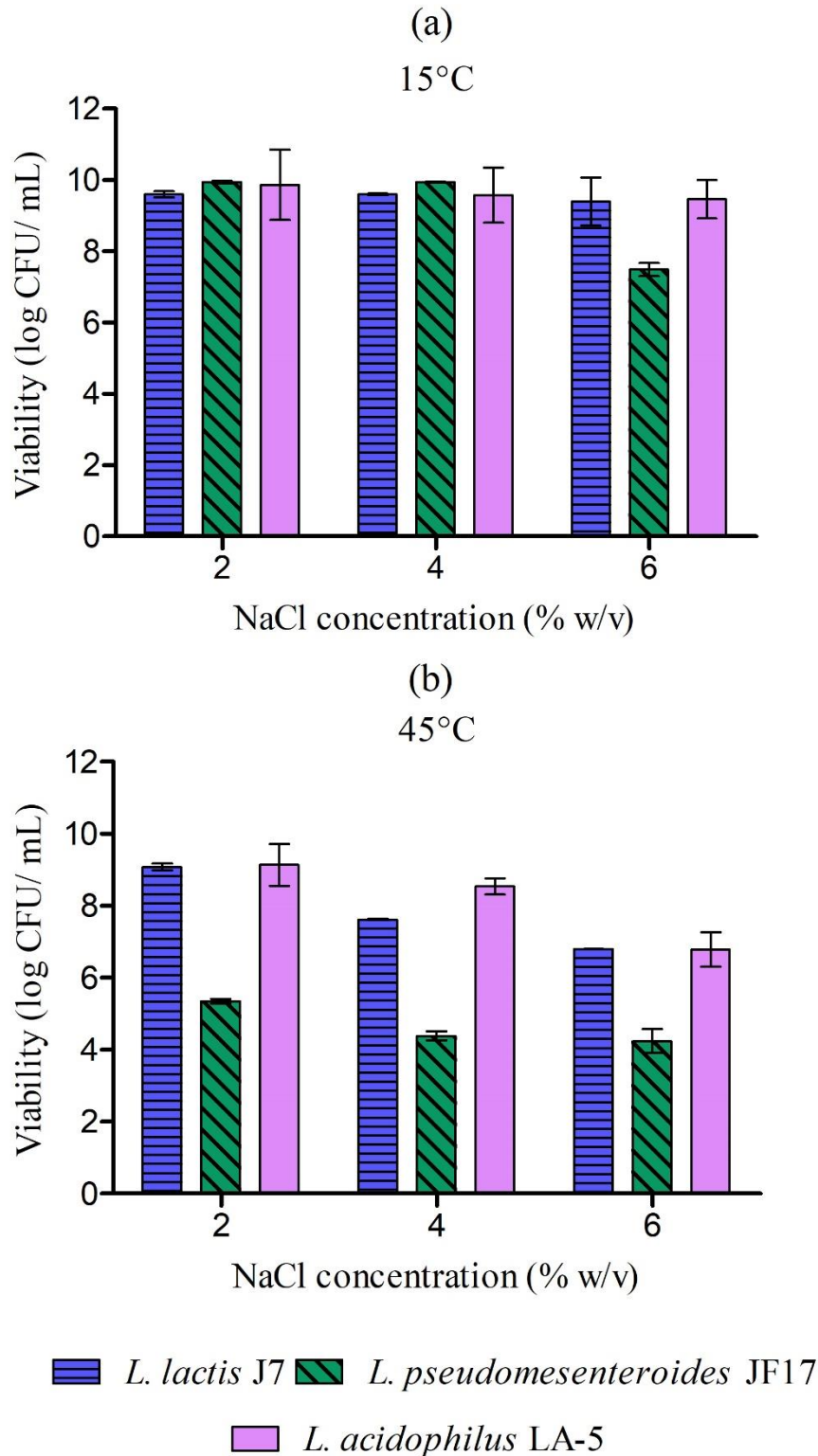
O157: H7, *S. aureus*, *Listeria innocua* and *Pseudomonas fragi*. Many of these authors also attribute the inhibitory effect to the production of organic acids, as well as the synthesis of other compounds, such as hydrogen peroxide or bacteriocins, substances characteristic of the metabolism of these microorganisms (44).

Technological properties of the probiotic strains - Ideal growth temperature and sodium chloride tolerance

The LAB isolated from juçara fruits, *L. lactis* J7 and *L. pseudomesenteroides* JF17 grew at temperatures of 15 °C and 45 °C, in addition to exhibiting tolerance to sodium chloride (Fig. 2). At 15 °C and treatment with 2%, 4% and 6% NaCl, no significant difference was recorded for *L. lactis* J7. *L. pseudomesenteroides* JF17, showed stability at 2% and 4%, but not at 6%, when a decrease ($p < 0.05$) in viability was observed (7.49 ± 0.18 log CFU / mL). The control probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* LA-5 remained viable unchanged at the tested NaCl concentrations, to 15 °C. (Fig. 2a). The rapid change in the osmolarity, by adding NaCl, of the environment might compromise their essential functions before the bacteria can adapt to the new environment (45).

Decreased viability was detected with 6% NaCl at both temperatures tested, although this drop was statistically significant and evident at 45 °C for both strains and the control ($p < 0.05$). At 45 °C a decrease in viability for J7 (9.08 ± 0.10 to 6.79 ± 0.05 log CFU / mL) and JF17 (5.35 ± 0.10 to 4.23 ± 0.34 log CFU / mL) when the NaCl concentration was increased from 2% to 6%, was observed (Fig. 2b). The results also suggested that the growth of the strains was influenced by temperature, instead of by the concentration of NaCl added to the medium. The strains had the ability to grow in high concentrations of sodium chloride (6%), but at a low temperature of 15 °C. The same did not happen for 45 °C. In Fig. 2b it was also observed that the strain *L. pseudomesenteroides* JF17 did not have the ability to grow at a temperature of 45 °C, even when the NaCl concentration was low (2%), and its preference for low temperatures (15 °C) was evident (Fig. 2a). The heat tolerance of LAB indicates their potential applications in some food manufacturing processes and formulation technologies under industrial conditions (46).

Fig. 2. The effect of temperature and NaCl on the growth of *L. lactis* J7 and *L. pseudomesenteroides* JF17. (a) Viability at 15 °C and 2%, 4% and 6% NaCl. (b) Viability at 45 °C and 2%, 4% and 6% NaCl. Bars are means \pm standard error of the mean. Control: *Lactobacillus acidophilus* LA-5®.



According to Ng et al. (24) isolates that grow to a concentration of 4% NaCl can be considered as having the main characteristics of a starter culture strain, without support higher levels of sodium chloride. Thus, the data reported for J7 and JF17, agree with previous studies that show that tolerance to sodium chloride may be dependent on the strain (1). Smith et al. (47) while studying the molecular mechanisms of stress resistance in *Lactococcus lactis* stated that at salt concentrations of 3 to 5% w/v NaCl, the culture produces more lactic acid but its growth is inhibited at 6% w/v NaCl. In many products the addition of salt is necessary, as a preservative, to give a pleasant taste or even as a proteolysis enhancer, as dairy products fermented, especially cheeses (48). Thus, tolerance to the harsh conditions during food production very often constitutes a critical point for the inclusion of LAB into food products. Selection of salt tolerant strains can open a new array of opportunities for the development of novel products with LAB strain and probiotic potential.

CONCLUSION

To date this is the first report that describes the presence of LAB with potential probiotic property, native to juçara palm fruits, important for the Atlantic Forest ecosystem. The results of the *in vitro* study indicated that the new LAB isolate, *L. lactis* J7 is a promising probiotic candidate for the development of functional foods with distinct advantages over *L. pseudomesenteroides* JF17. *L. lactis* J7 exhibited desirable characteristics demonstrated by its ability to tolerate simulated gastrointestinal condition, tolerance to sodium chloride, antimicrobial activity against foodborne pathogens and could better adapt to survival and colonization in the intestinal tract according to its aggregation. However, further study should be carried out to investigate the adherence properties of these probiotic bacteria using epithelium cell lines and animal models.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the Londrina State University which provided the infrastructure and facilities. Neoprospecta Microbiome Technologies (Brazil), for sequencing the bacteria.

FUNDING

This study was supported by a scholarship from the National Council of Technological and Scientific Development (CNPq) and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflicts of interest.

AUTHORS' CONTRIBUTION

Fernanda Silva Farinazzo: Investigation, data curation and writing this original draft preparation. Maria Thereza Carlos Fernandes: critical review and editing, visualization. Carolina Saori Ishii Mauro: critical review and editing, visualization. Sandra Garcia: Conceptualization, supervision, and final approval of the version to be published.

ORCID ID

FS Farinazzo: <https://orcid.org/-0000-0003-0615-8434>

MTC Fernandes: <https://orcid.org/-0000-0003-3285-2526>

CSI Mauro: <https://orcid.org/-0000-0001-7561-9893>

S Garcia: <https://orcid.org/-000-0003-3704-9222>

REFERENCES

1. Benavides AB, Ulcuango M, Yépez L, Tenea GN. Assessment of the *in vitro* bioactive properties of lactic acid bacteria isolated from native ecological niches of Ecuador. *Rev Argent Microbiol.* 2016; 48 (3): 236-244.
<https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.05.003>
2. Linares DM, Gómez C, Renes E, Fresno JM, Tornadijo ME, Ross RP, Stanton C. Lactic acid bacteria and bifidobacteria with potential to design natural biofunctional health-promoting dairy foods. *Front Microbiol.* 2017; 8: 846.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00846>
3. FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food London, Ontario, Canada; April 30 and May 1, 2002.
4. Uroić K, Nikolić M, Kos B, Pavunc AL, Beganović J, Lukić J, Jovčić B, Filipić B, Miljković M, Golić N, Topisirović, L, Čadež, N, Raspor P, Šušković J. Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated from Croatian Fresh Soft Cheese and Serbian White Pickled Cheese. *Food Technol Biotechnol.* 2014; 52 (2): 232–241.
5. Prado FC, Parada JL, Pandey A, Soccol CR. Trends in non-dairy probiotic beverages. *Food Res Int.* 2008; 41; 111–123.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.10.010>

6. Hwanhlem N, Ivanova T, Haertle T, Jaffres E, Dousset X. Inhibition of food-spoilage and foodborne pathogenic bacteria by a nisin Z-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KT2W2L. *LWT - Food Sci Technol.* 2017; 82 (1): 170-175.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.04.052>
7. Nami Y, Bakhshayesh RV, Jalaly HM, Lotfi H, Eslami S, Hejazi MA. Probiotic Properties of *Enterococcus* Isolated from Artisanal Dairy Products. *Front. Microbiol.* 2019; 10.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00300>
8. Topçu KC, Kaya M, Kaban G. Probiotic properties of lactic acid bacteria strains isolated from pastırma. *LWT- Food Sci Technol.* 2020; 134: 110216.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110216>
9. Xu T, Zhou T, Tang H, Li X, Chen Y, Zhang L, Zhang J. Probiotic potential and amylolytic properties of lactic acid bacteria isolated from Chinese fermented cereal foods. *Food Control.* 2020; 111: 107057.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.107057>
10. Huang S, Vignolles ML, Chen XD, Le Loir Y, Jan G, Schuck P, Jeantet, R. Spray drying of probiotics and other food-grade bacteria: A review. *Trends Food Sci Technol.* 2017; 63: 1–17.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.02.007>
11. Makinen K, Berger B, Bel-Rhliid R, Ananta E. Science and technology for the mastership of probiotic applications in food products. *J Biotechnol.* 2012; 162: 356–365.
[doi:10.1016/j.jbiotec.2012.07.006](https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.07.006)
12. Ouwehand AC, Tuomola EM, Tölkö S, Salminen S. Assessment of adhesion properties of novel probiotic strains to human intestinal mucus. *Int J Food Microbiol.* 2001; 64(1): 119–126.
[https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00440-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00440-2)
13. Sakandar HA, Kubow S, Sadiq FA. Isolation and *in-vitro* probiotic characterization of fructophilic lactic acid bacteria from Chinese fruits and flowers. *LWT- Food Sci Technol.* 2019; 104: 70-75.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.01.038>
14. Miranda JS, Costa BV, De Oliveira IV, De Lima DCN, Martins EMF, Leite Júnior BRC, Benevenuto WCAN, De Queiroz IC, Da Silva RR, Martins ML. Probiotic jelly candies enriched with native Atlantic Forest fruits and *Bacillus coagulans* GBI-30 6086. *LWT - Food Sci Technol.* 2020; 126: 109275.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109275>
15. Chaimsohn FP, Chiquetto NC. Construção do marco legal para a produção de açaí de juçara: contribuições da “oficina interestadual sobre legislação, comercialização e

- marketing para exploração de frutos da palmeira juçara. Rev Conexão UEPG. 2013; 9 (2): 244-253.
16. Öz E, Kaban G, Barış Ö, Kaya M. Isolation and identification of lactic acid bacteria from pastirma. Food Control. 2017; 77: 158-162.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.02.017>
 17. Wang Y, Quian, PY. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. PloS one. 2009; 4 (10): 1-9.
[doi:10.1371/journal.pone.0007401](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007401)
 18. Caporaso J, Lauber C, Walters W, Berg-Lyons D, Lozupone, C, Turnbaugh, P, Fierer, N, Knight R. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. Proc Natl Acad Sci. 2011; 108: 4516-4522.
[doi:10.1073/pnas.1000080107](https://doi.org/10.1073/pnas.1000080107)
 19. Bedani R, Vieira ADS, Rossi E.A, Saad, SMI. Tropical fruit pulps decreased probiotic survival to *in vitro* gastrointestinal stress in synbiotic soy yoghurt with okara during storage. LWT - Food Sci Technol. 2014; 55: 436-443.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.10.015>
 20. Collado M, Meriluoto J, Salminen S. Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. Eur Food Res Technol. 2008; 226: 1065-1073.
[doi.10.1007/s00217-007-0632-x](https://doi.org/10.1007/s00217-007-0632-x)
 21. Tallapragada P, Rayavarapu B, Rao PP, Ranganath NN, Veerabhadrapa PP. Screening of potential probiotic lactic acid bacteria and production of amylase and its partial purification. J Genet Eng Biotechnol. 2018; 16: 357–362.
<https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.03.005>
 22. Diep DB, Håvarstein LS, Nes IFA. Bacteriocin like peptide induces bacteriocin synthesis in *Lactobacillus plantarum* C11. Mol Microbiol. 1995; 18 (4): 631-639.
https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.mmi_18040631.x
 23. Marteau P, Rambaud JC. Potential of using lactic acid bacteria for therapy and immunomodulation in man. FEMS Microbiol. 1993; 12: 207–220.
[Doi: 10.1111/j.1574-6976.1993.tb00019.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1993.tb00019.x)
 24. Ng SY, Koon SS, Padam B S, Chye FY. Evaluation of probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from traditional Malaysian fermented Bambang (*Mangifera pajang*). CyTA - J of Food. 2015; 13: 1–10.
<https://doi.org/10.1080/19476337.2015.1020342>
 25. Divya JB, Varsha KK, Nampoothiri KM. Newly isolated lactic acid bacteria with probiotic features for potential application in food industry. Appl Bioch Biotech. 2012; 167:1314–1324.

Doi: 10.1007/s12010-012-9561-7

26. Vinderola CG, Reinheimer JA. Lactic acid starter and probiotic bacteria: A comparative “*in vitro*” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Res Int.* 2003; 36 (9): 895–904.
[https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(03\)00098-X](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(03)00098-X)
27. De Almada CN, Almada CN, Martinez RCR, Sant’Ana AS. Paraprobiotics: Evidences on their ability to modify biological responses, inactivation methods and perspectives on their application in foods. *Trends Food Sci Technol.* 2016; 58: 96-114.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.09.011>
28. Todorov SD, Furtado DN, Saad SM, Tome E, Franco BD. Potential beneficial properties of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from smoked salmon. *J Appl Microbiol.* 2011; 110: 971–986.
DOI:10.1111/j.1365-2672.2011.04950.x
29. Bao Y, Zhang Y, Zhang Y, Liu Y, Wang S, Dong X, Wang S, Dong X, Wang Y, Zhang H. Screening of potential probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from traditional dairy products. *Food Control.* 2010; 21 (5): 695–701.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.10.010>
30. Wang CY, Lin PR, Ng CC, Shyu YT. Probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from the feces of breastfed infants and Taiwanese pickled cabbage. *Anaerobe.* 2010; 16: 578–585.
doi:10.1016/j.anaerobe.2010.10.003
31. Yong L, Yong Z, Yan B, Heping Z. Study on cell surface properties and inhibitory effects on pathogens of four probiotic strains. *J Chin Inst Food Sci Technol.* 2010; 10: 28-34.
32. Armas F, Camperio C, Marianelli C. *In Vitro* Assessment of the Probiotic Potential of *Lactococcus lactis* LMG 7930 against Ruminant Mastitis-Causing Pathogens. *Plos One.* 2017; 12 (1): e0169543.
doi:10.1371/journal.pone.0169543
33. Lee NK, Han KJ, Son SH, Eom SJ, Lee SK, Paik HB. Multifunctional effect of probiotic *Lactococcus lactis* KC24 isolated from kimchi. *LWT - Food Sci Technol.* 2015; 64 (2): 1036-1041.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.019>
34. Zhang W, Liu M, Dai X. Biological characteristics and probiotic effect of *Leuconostoc lactis* strain isolated from the intestine of black porgy fish. *Braz J Microbiol.* 2013; 44 (3): 685-691.
doi: 10.1590/S1517-83822013005000053

35. Tuo Y, Yu H, Ai L, Wu Z, Guo B, Chen W. Aggregation and adhesion properties of 22 *Lactobacillus* strains. *J. Dairy Sci.* 2013; 96:4252–4257.
Doi: 10.3168/jds.2013-6547
36. Giaouris E, Chapot-Chartier MP, Briandet R. Surface physicochemical analysis of natural *Lactococcus lactis* strains reveals the existence of hydrophobic and low charged strains with altered adhesive properties. *Int J Food Microbiol.* 2009; 131: 2–9.
Doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.09.006
37. Kimoto-Nira H, Chise Suzuki C, Sasaki K, Kobayashi M, Mizumachi K. Survival of a *Lactococcus lactis* strain varies with its carbohydrate preference under *in vitro* conditions simulated gastrointestinal tract. *Int J Food Microbiol.* 2010; 143: 226–229.
Doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.033
38. Wadstrom T, Andersson KK, Sydow M, Axelsson L, Lindgren S, Gullmar B. Surface properties of lactobacilli isolated from the small intestine of pigs. *J App Bacteriol.* 1987; 62: 513–520.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1987.tb02683.x>
39. Rodrigues LR. Inhibition of Bacterial adhesion on Medical Devices. In: Linke D, Goldman A, editors. *Bacterial Adhesion. Advances in Experimental Medicine and Biology.* Springer, Dordrecht. 2011. pp. 351-367.
https://doi.org/10.1007/978-94-007-0940-9_22
40. Nikaido H, Outer membrane. In: Neidhardt FC, Curtiss R, editors. *Escherichia coli* and *Salmonella: Cellular and molecular biology.* Washington DC: American Society for Microbiology; 1996. pp. 29-47.
41. Ammor S, Tauveron G, Dufour E, Chevallier I. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility: 1-Screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food Control.* 2006; 17(6): 454-461.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.02.006>
42. Wang Y, Li A, Jiang X, Zhang H, Mehmood K, Zhang L, Jiang J, Waqas M, Iqbal M, Li J. Probiotic Potential of *Leuconostoc pseudomesenteroides* and *Lactobacillus* Strains Isolated From Yaks. *Front. Microbiol.* 2018; 9.
doi.org/10.3389/fmicb.2018.02987.
43. Chioda TP, Schocken-Iturrino RP, Garcia GR, Pigatto CP, Ribeiro CAM, Ragazzani AVF. Inibição do crescimento de *Escherichia coli* isolada de queijo “Minas Frescal” por *Lactobacillus acidophilus*. *Ciênc Rural.* 2007; 37 (2): 583-585.
<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782007000200048>

44. Costa GN, Suguimoto HH, Miglioranza LHS, Gómez RJHC. Antimicrobial activity of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains against pathogenic microorganisms “*in vitro*” *Semina: Ciênc Agrár.* 2012; 33 (5): 839-1846.
Doi: 10.5433/1679-0359.2012v33n5p1839
45. Sunny-Roberts EO, Knorr D. Evaluation of the response of *Lactobacillus rhamnosus* VTT E-97800 to sucrose-induced osmotic stress. *Food Microbiol.* 2008; 25:183–189.
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2007.05.003>
46. Sánchez B, Ruiz L, Gueimonde M, Ruas-Madiedo P, Margolles A. Toward improving technological and functional properties of probiotics in foods. *Trends Food Sci Technol.* 2012; 26: 56–63.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.02.002>
47. Smith WM, Dykes GA, Soomro AH, Turner MS. Molecular mechanisms of stress resistance in *Lactococcus lactis*. *Cur Res Technol Educ Top Appl Microbiol Microbial Biotechnol.* 2010; 2: 1106-1118.
48. Gonzalez EE, Aryana K. Salt Tolerance of Cheese Culture *Lactococcus lactis* R-604 as Influenced by Prior Salt Exposure and Lactose Deprivation. *Food Nutr Sci.* 2018; 9 (6).
Doi: 10.4236/fns.2018.96048

CAPÍTULO III ²

² Artigo a ser publicado na Revista **Preparative Biochemistry and Biotechnology**

Fernanda Silva Farinazzo ^{a*}, Maria Thereza Carlos Fernandes ^a, Carolina Saori Ishii Mauro ^a, Sandra Garcia ^a

^a Department of Food Science and Technology, Center of Agricultural Sciences, State University of Londrina, Celso Garcia Cid Highway - PR Route 445, Km 380, P.O. Box 10011, Zip Code 86.057-970, Londrina, Brazil.

*Corresponding author. E-mail address: fsfarinazzo@gmail.com (F. S. Farinazzo)

Statistical optimization of exopolysaccharide production by *Leuconostoc pseudomesenteroides* JF17 from native Atlantic Forest juçara fruit.

ABSTRACT

Leuconostoc pseudomesenteroides belongs to a group of lactic acid bacteria normally isolated from fruits, which has the capacity to produce exopolysaccharides (EPS). The present study aimed to optimize the EPS production of *L. pseudomesenteroides* JF17, isolated from juçara fruits (palm trees threatened with extinction in the Atlantic Forest), using the response surface methodology (RSM), besides evaluating the fermentation kinetics. The maximum production of EPS 53.77 mg/mL was obtained under ideal conditions of MRS broth supplemented with sucrose at 18%, w/v, fermentation temperature of 20 °C and initial pH of 7.30. The Luedeking-Piret model suggested that the production of EPS by the JF17 strain appeared to be associated with the cell growth of the microorganism, in addition to having high efficiency in the production of the polysaccharide from the substrate ($Y_{p/s} = 17.85 \pm 0.74$ mg EPS / CFU log). Thus, the ideal optimization conditions and kinetic parameters can be useful for increasing the scale up of the fermentation process in the industrial production of EPS by *L. pseudomesenteroides* JF17.

KEYWORDS: Lactic acid bacteria; microbial polysaccharides; homopolysaccharides; response surface methodology; Luedeking-Piret model.

Introduction

Lactic acid bacteria (LAB) have been widely known to produce exopolysaccharides (EPS), such as *Lactobacillus acidophilus* (1), *Leuconostoc mesenteroides* (2), *Lactobacillus suebicus* (3), *Leuconostoc pseudomesenteroides* (4), *Lactobacillus plantarum* (5). In addition, LAB are considered to be “Generally Recognized as Safe Foods (GRAS)”, so the EPS synthesized by LAB can generally be recognized as safe, which ensures that it can be easily used in food (6).

The various species of LAB, including those potentially producing EPS, can be found naturally in fruits (7), among them juçara. The juçara (*Euterpe edulis* Martius) is a palm tree native to the Brazilian Atlantic Forest, with great economic and ecological importance for the region (8). The extractive exploitation of the palm heart has led to an increase in the disappearance of the species in many natural reserves due to the sacrifice of the plant (9). On the other hand, the extraction of the fruit provides a sustainable alternative to the use of the tree, although less widespread economically (10).

Structurally, two types of EPS, homopolysaccharides and heteropolysaccharides can be produced by LAB, formed by one and two or more monosaccharide types, respectively. Glucans and fructans that contain only units of glucose and fructose, respectively, are homopolysaccharides produced by LAB strains through the activities of the enzymes glucansucrases and fructansucrases using sucrose as substrate. After sucrose hydrolysis, the catalysis of transglycosylation or transfructosylation reactions results in the formation of polymeric glucans (α -glucans) and fructans (β -fructans), respectively (11). So far, it has been shown that several LAB strains are able to produce glucans and fructans, and the production of EPS glucan type is most common and highly produced by *Leuconostoc* strains (12).

EPS production can be affected by the composition of the medium, which is related to microbial growth, the addition of extra nutrients or nutrients to improve growth, carbon,

nitrogen composition, fermentation temperature, oxygen tension, initial pH and incubation time (13).

To improve the production of EPS, by different strains of lactic acid bacteria, including *Leuconostoc* sp, the bioprocess optimization strategy has been widely used (14-16). In addition, the response surface (RSM) methodology based on statistical design can be used to improve EPS production (17). Therefore, the objective of this work was to optimize the production of *Leuconostoc pseudomesenteroides* EPS, a microorganism isolated from juçara fruits., using response surface methodology (RSM) and to evaluate the fermentation kinetics.

Material and methods

Microorganism

The strain *L. pseudomesenteroides* JL17 was isolated from juçara fruit sample, from Bimini Farm (23°14'0.48' S; 51°24'0.43' W), in the region of Rolândia, Brazil, both juçara fruit and microorganism were protected by genetic heritage with A701C5B and A02124C registration, respectively. The fruits were processed immediately after collection, washed and pulped (1:1/fruits: sterile water) in a planetary mixer (Arno, 408002194 BPA, Brazil) previously sanitized. The obtained pulp was fractionated in Erlenmeyer flasks (100 mL) and incubated at 25 °C for 48 hours (Novatecnica® Incubator, Brazil). Isolation was performed on De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) agar (Merck®, Germany), and the strain was identified based on morphological characteristics and 16S rRNA molecular characterization.

Morphological characteristics and 16S rRNA molecular characterization

The morphology of 198 isolated colonies was examined after incubation at 25 °C for 48 h. Only colonies with LAB characteristics were tested for EPS production capacity. For this, the colonies were inoculated on MRS agar supplemented with 10 % (w/v) sucrose at 30 °C for

48 h (18). After the incubation period, three identical colonies with a mucoid aspect were subjected to molecular characterization for sequencing the 16S rRNA molecular marker.

In this analysis, the MiSeq Sequencing System (Illumina Inc., USA) and Next Generation Sequencing (NGS) (Neoprosperta Microbiome Technologies, Brazil) were used. The preparation of the amplicon sequencing library was performed for bacteria using the VS-V4 16S 341 F (CCTACGGGRSGCAGCAG; 5'-3' (19) and 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT; 5' -3' (20) rRNA gene primers), with the following conditions: the first PCR primers contain Illumina sequences based on the TruSeq framework adapter (Illumina, San Diego, CA), allowing for the second PCR with indexing sequences. PCR reactions were performed using Platinum Taq (Invitrogen, USA). The final PCR reaction was washed using AMPureXP granules (Beckman Coulter, Brea, CA) and the samples collected in the sequencing libraries for quantification. Amplicon estimates performed with Picogreen dsDNA assays (Invitrogen, USA) and then the libraries were diluted for accurate qPCR quantification using the KAPA Library Quantification Kit for Illumina platforms (KAPA Biosystems, Woburn, MA) (21). The identified bacterium was stored in MRS broth (Merck®, Germany) supplemented with 20% (w/v) glycerol at -80 °C.

Isolation and purification of the EPS

The identified strain producing EPS was cultivated (1% v/v) in MRS broth supplemented with 10 - 20% (w/v) sucrose concentration, at 20 - 30 °C fermentation temperature, 6.5 – 7.5 initial pH, for 48 h and static condition (Novatecnica® Incubator, Brazil), according to the conditions to be optimized (Table 1). The cells in the culture broth were removed by centrifugation at 12,000 g for 15 min at 4 °C, after previous heating at 100 °C for 30 min to inactivate enzymes capable of degrading the EPS. After the addition of three volumes of chilled ethanol (95% v/v) to the supernatant with gentle agitation, the mixture was stored at 4 °C

overnight, for the polysaccharide precipitation (18). The precipitate was collected by centrifugation at 12,000 g at 4 °C for 15 min and redissolved in distilled water. This process was repeated three times to purify the exopolysaccharides (18). Then, freeze-dried using Freeze-dryer L101 (Liobras, Brazil) and weighed for EPS quantification.

Statistical optimization of EPS production

For the optimization processes, the face-centered central composite (CCF), was used to estimate the coefficients in a mathematical model, predict the response, verify the applicability of the model, in addition to predicting the ideal process conditions for the EPS production by response surface methodology (RSM). The experimental design selected was a 2^3 factorial design with face-centered star points ($\alpha = \pm 1$) and two repetitions of central points (18 experiments) (Table 1). The levels of factors used are shown in Table 1, where (-1), (0), and (+1) indicate the low level of each factor, mid-level, and the high level, respectively. The experimental data were designed using *Statistica* software version 10.0. A complete quadratic polynomial regression model was used to correlate the experimental data using the following Eq. 1:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i x_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^3 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} x_i x_j \quad (1)$$

where Y represents the response variable EPS concentration (mg/mL); β_0 is the interception coefficient; β_i is the coefficient for the linear effect; β_{ii} is the coefficient for the quadratic effect; β_{ij} is the ij^{th} coefficients of the interaction effect and $x_i x_j$ are input variables that influence response variable Y. The response variable for each trial was the average of three replicates. The sucrose concentrations (x_1), initial pH (x_2) and fermentation temperature (x_3)

were selected and used at 10 – 20%, 20 – 30 °C, and 6.5 – 7.5 h for $\pm \alpha$, according to preliminary studies (data not shown).

The polynomial equations established were used to map three-dimensional surfaces in order to view the individual and interactive effects of the process when one of the parameters is set at its optimum value. The impact and meaning of each term (linear, quadratic, and interactions) in the regression equation was evaluated by analysis of variance (ANOVA).

Validation of optimal conditions and predictive model

To validate the mathematical model, JF17 was incubated at the predicted optimization condition. Result of an experiment carried out under the ideal conditions of EPS production and the average experimental values were compared with the expected values to determine the validity of the model.

Fermentation experiments at optimized condition

The kinetic study of EPS production by *L. pseudomesenteroides* was performed in MRS supplemented with 18 % (w/v) sucrose, 20 °C and initial pH 7.30. The viability, the pH and substrate consumption were estimated and monitored quantitatively by sampling and analyzing 5 mL of fermentation broth for 72 h. The viability was evaluated by plating dilution with MRS agar incubated anaerobically at 30 °C for 48 h, results reported as log CFU/mL and substrate were analyzed by the phenol-sulfuric acid method (22).

The productivity of EPS - P_p (mg/mL.h) was estimated by the technique of precipitation in 95% ethanol, washing and subsequent lyophilization (mg/mL). The values of $Y_{p/x}$, EPS yield from cell viability (mg EPS/log CFU) were determined at the intervals where they showed maximum rates, and specific growth rate, μ (1/h), was also determined from experimental data,

$\mu = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt}$ Eq. (2). The kinetic model of a typical product, according to Luedeking-Piret model

(23), was used to classify the formation of the product according to its dependence on the growth rate and cell concentration (Eq. 3).

$$\frac{d_p}{d_t} = \alpha \frac{d_x}{d_t} + \beta x \quad (3)$$

Where α and β are product formation constants that contribute to fermentation conditions associated and not associated with growth and vary with the dynamics of fermentation. The product formation rate, d_p/d_t , allowed a correlation between viability and product concentration.

Statistical analysis

The numerical results of validation and microbial analyses in this study are averages of three independent fermentations. Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) using *Statistica* software version 10.0. Means comparisons were determined by Tukey's test ($p < 0.05$). The graphics were designed using the software GraphPad Prism 5.

Results and Discussion

Isolation and identification of the EPS producing strain

Morphological observation of a 48 h culture of the JF17 strain grown on MRS medium revealed the typical characteristics of genus *Leuconostoc*. JF17 was a Gram-positive strain. The pure colony was slimy, regularly edged, slightly convex and cream-colored. Based on morphological and 16S rDNA sequence analysis methods, JF17 was identified as *L. pseudomesenteroides* (GenBank -MN756802).

Optimization for EPS production

The optimization of process variables using a statistical approach for maximum EPS production was performed using the CCF with three factors selected: sucrose/ x_1 , initial pH/ x_2 and temperature/ x_3 to produce exopolysaccharide (Y_{EPS}) by *L. pseudomesenteroides* JF17. The responses obtained from the experimental data and those predicted for Y_{EPS} are shown in Table 1.

Table 1. Coded and real values, and the response obtained by the application of CCF during fermentation by *L. pseudomesenteroides* JF17.

Run	Sucrose (%)/x ₁	Initial pH/x ₂	Temperature (°C)/x ₃	EPS production (mg/mL)/Y _{EPS}	
				Actual value	Predict value
1	10 (-1)	6.5 (-1)	20 (-1)	11.93	16.54
2	10 (-1)	6.5 (-1)	30 (+1)	9.80	7.28
3	10 (-1)	7.5 (+1)	20 (-1)	34.93	32.50
4	10 (-1)	7.5 (+1)	30 (+1)	10.63	13.61
5	20 (+1)	6.5 (-1)	20 (-1)	38.99	35.86
6	20 (+1)	6.5 (-1)	30 (+1)	13.02	15.29
7	20 (+1)	7.5 (+1)	20 (-1)	48.67	51.03
8	20 (+1)	7.5 (+1)	30 (+1)	25.59	20.83
9	10 (-1)	7 (0)	25 (0)	32.87	30.22
10	20 (1)	7 (0)	25 (0)	40.23	43.49
11	15 (0)	6.5 (-1)	25 (0)	33.23	32.00
12	15 (0)	7.5 (+1)	25 (0)	40.91	42.75
13	15 (0)	7 (0)	20 (-1)	50.26	48.85
14	15 (0)	7 (0)	30 (+1)	27.09	29.12
15	15 (0)	7 (0)	25 (0)	46.38	44.55
16	15 (0)	7 (0)	25 (0)	48.13	44.55
17	15 (0)	7 (0)	25 (0)	41.47	44.55
18	15 (0)	7 (0)	25 (0)	43.45	44.55

The experimental design proposed in the work was used as a powerful technique to choose important variables that affect the production of EPS. EPS production varied markedly

from 9.80 mg/mL (run 2) minimum observed production, to 50.26 mg/mL (run 13) maximum observed production (Table 1). This variation reflected the importance of average optimization to obtain maximum EPS production.

The actual EPS production values were compared with the predicted response values that were obtained from quadratic model fitting techniques using the *Statistica* software 10.0. The experimental results were modeled with a second order polynomial equation Eq. (4) to explain the dependence of EPS production on *L. pseudomesenteroides* JF17 in relation to the independent variables.

$$Y_{\text{EPS}} = 44.55 + 6.63 x_1 + 5.38 x_2 - 9.86 x_3 - 7.69 x_1^2 - 7.17 x_2^2 - 5.57 x_3^2 - 0.20 x_1 x_2 - 2.84 x_1 x_3 - 2.41 x_2 x_3 \quad (4)$$

where Y_{EPS} is the production of EPS (mg/mL) and the expected response variable; x_1 , x_2 and x_3 are the coded values of the independent variables, sucrose, initial pH and temperature, respectively.

The results were analyzed by using analysis of variance (ANOVA) and statistically checked by F-test as shown in Table 2. The F-value (5.11) of the model indicated that regression model was statistically significant ($p = 0.01$). The p values were considered as a tool to verify the significance of the interaction influence, which in turn can indicate the patterns of the interactions between the variables (24). It was found that the values of R^2 (0.96) and Adj- R^2 (0.91) suggested that the regression equation developed has a good fit and could successfully predict the response and explain more than 95% of the variability in EPS production. The value for lack of fit ($p = 0.23$) implied that this was not significant compared with the pure error. All results showed a good consistency between experimental and predicted EPS production, which also implies that the mathematical model is suitable for simulating EPS production in the

present study. The non-significant terms were maintained in order to not reduce the value of R^2 .

Table 2. Analysis of variance (ANOVA) of quadratic models for the EPS production after fermentation by *L. pseudomesenteroides* JF17.

Source model	Sums of squares	df	Means square	F-value	p-value
x_1 (L)	440.10	1	440.10	49.85	0.01*
x_1 (Q)	160.33	1	160.33	18.16	0.02*
x_2 (L)	289.01	1	289.01	32.74	0.01*
x_2 (Q)	139.39	1	139.39	15.79	0.03*
x_3 (L)	973.18	1	973.18	110.24	0.00*
x_3 (Q)	83.98	1	83.98	9.51	0.05
$x_1 * x_2$	0.31	1	0.31	0.03	0.86
$x_1 * x_3$	63.96	1	63.96	7.24	0.07
$x_2 * x_3$	46.46	1	46.46	5.26	0.10
Lack of fit	114.60	5	22.92	2.60	0.23
Error	26.48	3	8.83		
Total	3257.78	17			
Regression	1702.30	3	567.43	5.11	0.01*
Residual	1555.49	14	111.11		
Total	3257.78	17			

$$R^2 = 0.96 \quad \text{Adj- } R^2 = 0.91$$

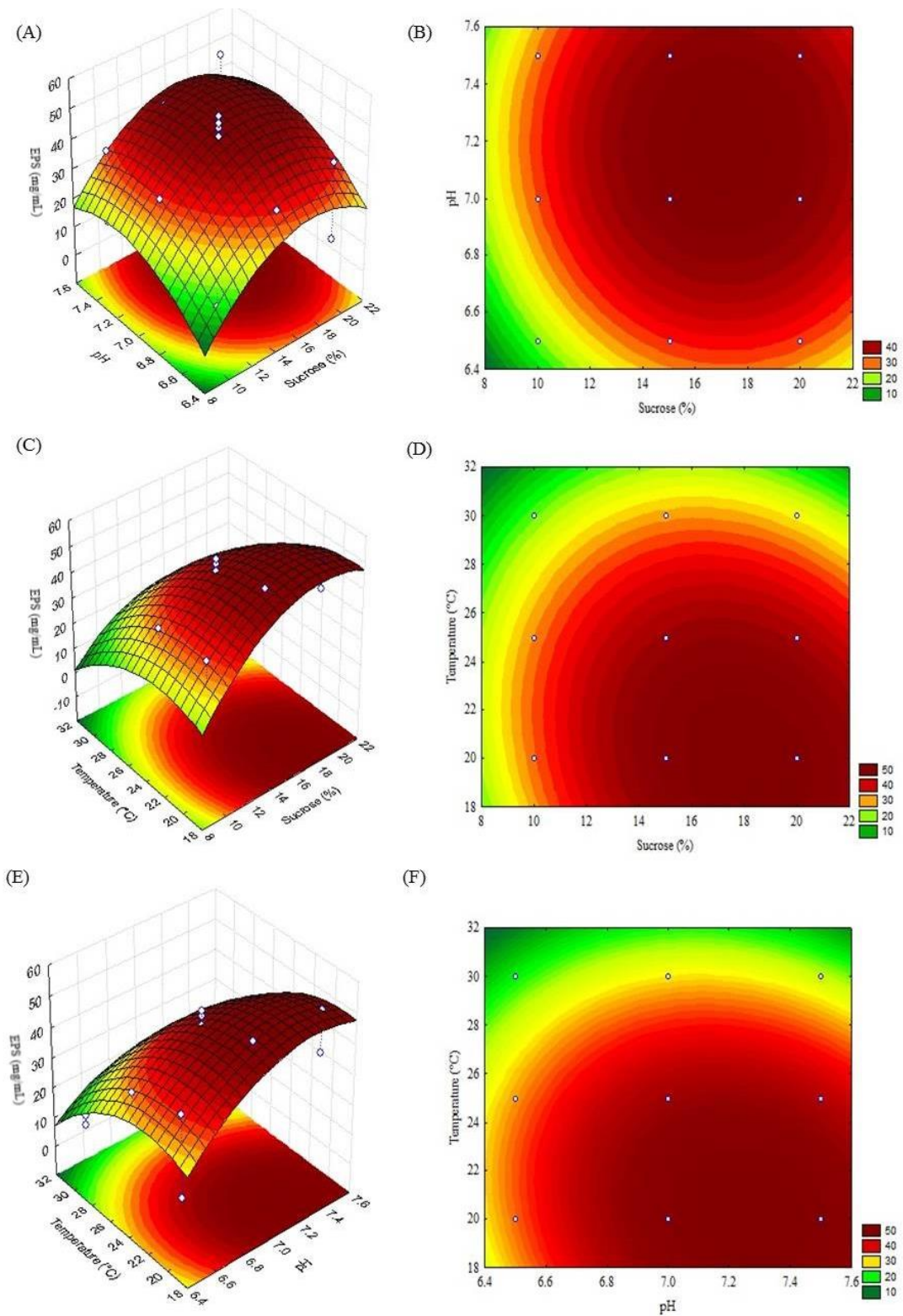
x_1 = sucrose (%); x_2 = pH; x_3 = temperature ($^{\circ}$ C); L: linear; Q: quadratic; * $p < 0.05$.

The three-dimensional response surfaces and contour graphics of *L. pseudomesenteroides* represent the interactions between the three variables (Figure 1). The curve corresponding to

the contour was constructed to express an infinite number of points between two independent variables, in which the color level reflects the different responses (25) to the production of EPS. According to the adjusted model related to the EPS production, within the tested levels, an increase in the sucrose content leads to a higher EPS production, and due to its positive interaction with the initial pH, it is favorable to keep both variables at their positive levels (sucrose between 15 and 20%, and initial pH between 7.0 and 7.50). However, the temperature variable showed a significant interaction with both initial pH and sucrose concentration, both with a negative effect, therefore the production of EPS increases when these variables are maintained at opposite levels (Figure 1). Thus, the experimental data reveal that the optimal values of the variables tested for EPS production were sucrose, 18.0%; initial pH 7.30, and temperature, 20 °C. Under these conditions, the maximum predicted EPS production was around 53.77 mg/mL.

The EPS production obtained in the present study was similar to that reported by Xing et al. (14). These authors showed that the ideal condition to optimize the fermentation of *Leuconostoc mesenteroides* DRP105 in the production of EPS was sucrose 86.83 mg/mL, tryptone 15.47 mg/mL, initial pH 7.18, with maximum production of 53.79 mg/mL in 36 h of fermentation. However, several studies have shown different production values, which are mostly dependent on the bacterial strain, EPS extraction method, in addition to variations in factors such as pH, medium composition and temperature used for production (26). Wang et al. (27) performed an optimization of EPS production using *Lactobacillus plantarum* KX041 isolated from pickle juice, sold in China, reached a maximum EPS production of 0.55 mg/mL, production 97.76 times lower than the observed in the present study. In different circumstances, Seesuriyachan et al. (28) obtained high production in EPS biosynthesis by *Lactobacillus confusus* TISTR 1498, 86.36 mg/mL under conditions optimized with NaCl, 4.97% and sucrose, 136.5 mg / mL and incubation time of 40.79 h.

Figure 1. Response surface plot (A, C and E) and contour graph (B, D and F) for EPS production (mg/mL) as a function of sucrose concentration (%), temperature ($^{\circ}\text{C}$) and initial pH after 48 h of fermentation of *L. pseudomesenteroides*.



Validation of the experimental design

The ideal condition to produce EPS followed the polynomial models Eq. (2). The validation experiment was performed to compare the experimental result with the predicted values, within the expected confidence interval ($p < 0.05$). The validation of the ideal condition provided for by the planning was carried out in triplicate (Table 3). The results of the analysis show that the average production was 50.55 ± 2.44 mg/mL, indicating that the experimental values were in good agreement with those predicted and suggested that the equation models are satisfactory and accurate. Based on the findings of the present study, it was concluded that the model can be conveniently used to optimize the parameters for greater EPS production.

Table 3. Predicted and experimental values of EPS production under optimal conditions for fermentation by *L. pseudomesenteroides* JF17.

Variable		
Independent	Sucrose (%)	18.0
	Initial pH	7.3
	Temperature (°C)	20.0
EPS production (mg/mL)		
Dependent	Predict	53.77 ^a
	Experimental	50.56 ^a ± 2.44

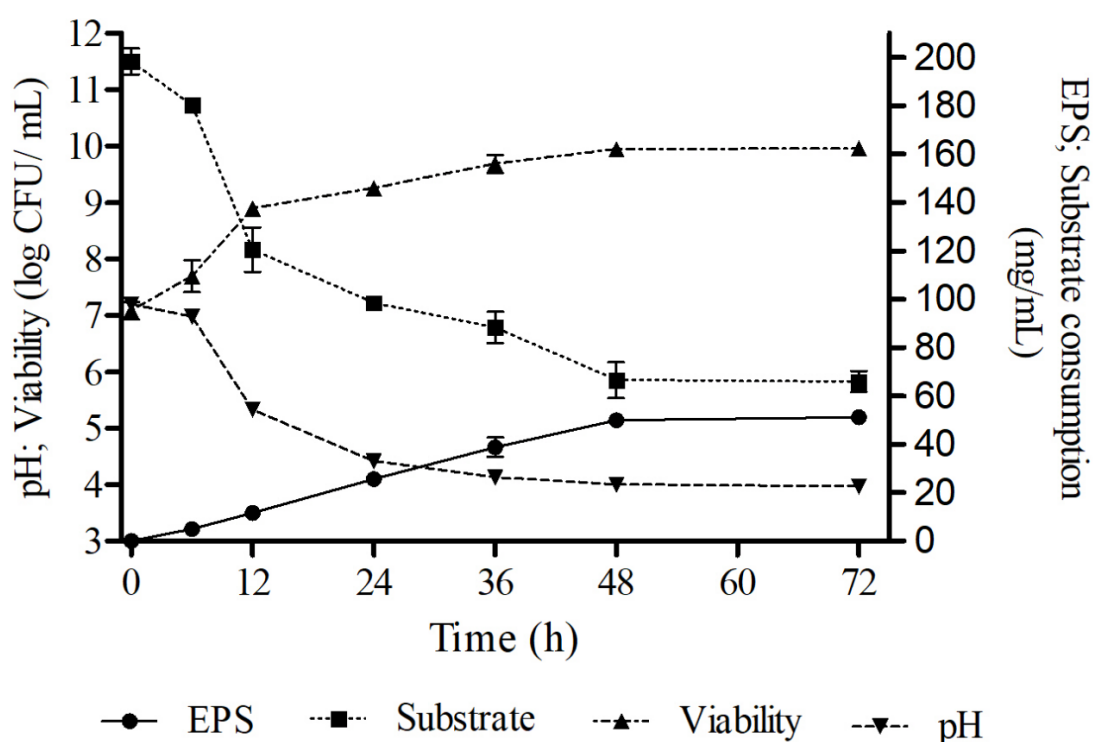
* Means followed by the same letter, in the same column, do not differ significantly ($p < 0.05$).

Fermentation experiments

The time course of growth, pH, EPS production and sugar concentration in the optimized broth are shown in Figure 2. *L. pseudomesenteroides* JF17 developed well in the MRS broth supplemented with sucrose (18%), initial pH 7.30 and temperature fermentation at 20 °C. There was a significant increase ($p < 0.05$) in the viable cell count, from an initial value of 7.08 (0 h) to 9.25 log CFU/mL (24 h), while the pH decreased dramatically, from 7.30 to

4.40, during the same cultivation period, compatible with exponential phase (Figure 2). EPS production for the JF17 strain increased during the initial growth phase and continued to increase to 50.04 mg/mL up to 48 h (Figure 2). As noted, it appears that EPS was not degraded until the end of 72 h. Previous studies show that during EPS synthesis, the substrate is used first for microbial growth in the exponential phase and then to produce EPS during the stationary phase (29).

Figure 2. Kinetic curves of growth, substrate consumption and extracellular metabolite production associated with *L. pseudomesenteroides* JF17 grown in MRS broth supplemented with sucrose at 20 °C and initial pH 7.30 (optimized conditions). All values are the mean of three experiments.



To better understand cell growth, substrate consumption and product formation were investigated and simulated, with experimental data, kinetic parameters and the Luedeking -

Piret model (Table 4). The analysis of the kinetic parameters showed that the specific cell growth rate was $\mu_N = 0.01 \pm 0.00$ /h and the yield of substrate in cells $Y_{X/S} = 0.02 \pm 0.00$ log CFU/mg. The EPS productivity of JF17 was high, 1.42 ± 0.47 mg.mL/h, and higher than that reported for other EPS, such as for the production of xanthan by Zhang and Shen (30) (0.04 - 0.44 g.L/h) and for EPS produced by *Enterobacter* spp A47 0.28 g.L/h (31). In addition, the specific coefficient of EPS production per cell unit was also high, $Y_{P/S} = 17.85 \pm 0.74$ mg EPS/log CFU (Table 4), indicating a high cellular efficiency in the conversion of carbohydrates to EPS, in the cultivation conditions used (32). Applying the Luedeking-Piret model, the specific EPS production and growth rates were correlated by a linear regression graph. The values for the stoichiometric coefficients α and β were calculated to be 9.42 ± 1.9 mg EPS/log CFU and 0.07 ± 0.02 mg EPS/log CFU / h, respectively (Table 4). The value of the correlation coefficient ($R^2 = 0.95$) of this linear model well describes the relationship between the rate of product formation and cell growth with a high level of confidence. It can be said that product formation is associated with bacterial growth, since the estimated value for the stoichiometric coefficient α was higher than that of β , the maintenance coefficient (33).

Table 4. Model parameters for EPS production by *L. pseudomesenteroides* JF17.

Microorganism	Kinetic parameters				Luedeking–Piret model		
	Growth	Substrate consumption	Product formation		α^e	β^f	R^2
	μ_x^a	$Y_{X/S}^b$	P_p^c	$Y_{P/X}^d$			
<i>L. pseudomesenteroides</i>	0.01±0.00	0.02±0.00	1.42±0.47	17.85±0.74	9.42±1.9	0.07±0.02	0.95

Mean \pm SD. ^a μ_x : specific cell growth rate (1/h); ^b $Y_{X/S}$: growth yield on total sugar (log CFU/mg substrate); ^c P_p : productivity of EPS (mg.mL/h); ^d $Y_{P/X}$: EPS yield on cell growth (mg EPS/log CFU); ^e α : Yield of product synthesis per log CFU produced (mg EPS/log CFU); ^f β : Specific rate of non-growth associated product synthesis (mg EPS/log CFU/h).

Conclusion

RSM was effective in studying and optimizing individual and interactive effects of the process variables concentrations of sucrose, temperature and initial pH on the EPS production. The maximum production of EPS by *L. pseudomesenteroides* JF17 was achieved in MRS broth supplemented with 18% (w/v) sucrose, initial pH 7.3 and fermentation temperature at 20 °C. The validation showed that the experimental values (50.56 ± 2.44 mg/mL) agreed with those predicted (53.77 mg/mL) and suggested that the equation models are satisfactory and accurate. EPS synthesis by JF17 seems to be partially growth associated, as suggested by the experimental results and confirmed by the kinetic model, in addition to have high polysaccharide production. Thus, the ideal cultivation conditions and fermentation kinetics that have been found can be useful as an adequate starting point for an increase in the scale of the fermentation process, helping to develop the industrial production of EPS from *L. pseudomesenteroides* JF17.

Acknowledgements

This research was supported by the Londrina State University, National Council of Technological and Scientific Development (CNPq), Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) and for sequencing the bacteria Neoprosperta Microbiome Technologies (Brazil).

REFERENCES

- (1) Abedfar, A.; Abbaszadeh, S.; Hosseininezhad, M.; Taghdir, M. Physicochemical and biological characterization of the EPS produced by *L. acidophilus* isolated from rice bran sourdough. *LWT – Food Sci Technol.* **2020**, *127*, 109373.

- (2) Taylan, O.; Yilmaz, M. T.; Dertli, E. Partial characterization of a levan type exopolysaccharide (EPS) produced by *Leuconostoc mesenteroides* showing immunostimulatory and antioxidant activities. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *136*, 436–444.
- (3) Ibarburu, I.; Puertas, A. I.; Berregi, I.; Rodríguez-Carvajal, M.A.; Prieto, A.; Dueñas, M. T. Production and partial characterization of exopolysaccharides produced by two *Lactobacillus suebicus* strains isolated from cider. *Int. J. Food Microbiol.* **2015**, *214*, 54–62.
- (4) Zhou, Q.; Feng, F.; Yang, Y.; Zhao, F.; Du, R.; Zhou, Z.; Han, Y. Characterization of a dextran produced by *Leuconostoc pseudomesenteroides* XG5 from homemade wine, *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *107*, 2234–2241.
- (5) Zhou, K.; Zeng, Y.; Yang, M.; Chen, S.; He, L.; Ao, X.; Zou, L.; Liu, S. Production, purification and structural study of an exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* BC-25. *Carbohydr. Polym.* **2016**, *144*, 205–214.
- (6) Badel, S.; Bernardi, T.; Michaud, P. New perspectives for *Lactobacilli* exopolysaccharides *Biotechnol. Adv.* **2011**, *29*, 54–66.
- (7) Sasikumar, K.; Vaikkath, D. K.; Devendra, L.; Nampoothiri, K. M. An exopolysaccharide (EPS) from a *Lactobacillus plantarum* BR2 with potential benefits for making functional foods. *Bioresour. Technol.* **2017**, *241*, 1152–1156.
- (8) Barroso, R. M.; Reis, A.; Hanazaki, N. Etnoecologia e etnobotânica da palmeira juçara (*Euterpe edulis* Martius) em comunidades quilombolas do Vale do Ribeira. *Acta Bot Bras.* **2010**, *24*, 518–528.
- (9) Borges, G.S.C.; Vieira, F.G.K.; Copetti, C.; Gonzaga, L.V.; Zambiasi, R.C.; Marcini Filho, J.; Fett, R. Chemical characterization, bioactive compounds, and antioxidant capacity of Jussara (*Euterpe edulis*) fruit from the Atlantic Forest in southern Brazil. *Food Res. Int.* **2011**, *44*, 2128–2133.

- (10) Chaimsohn, F.P.; Chiquetto, N.C. Construção do marco legal para a produção de açaí de juçara: contribuições da “oficina interestadual sobre legislação, comercialização e marketing para exploração de frutos da palmeira juçara. *Rev. Conex. UEPG*. **2013**, *9* (2), 244–253.
- (11) Zannini, E.; Waters, D-M.; Coffey, A.; Arendt, E. K. Production, properties, and industrial food application of lactic acid bacteria-derived exopolysaccharides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, *100* (3), 1121-1135.
- (12) Bounaix, M-S., Gabriel, V., Morel, S., Robert, H., Rabier, P., Remaud-Simeón, M., Gabriel, B., Fontagné-Faucher, C. Biodiversity of Exopolysaccharides Produced from Sucrose by Sourdough Lactic Acid Bacteria. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 10889–10897.
- (13) Freitas, F., Alves, V. D. and Reis, M. A. M. Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. *Trends Biotechnol.* **2011**, *29*, 388– 398.
- (14) Xing, H.; Du, R.; Zhao, F.; Han, Y.; Xiao, H.; Zhou, Z. Optimization, chain conformation and characterization of exopolysaccharide isolated from *Leuconostoc mesenteroides* DRP105. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *112*, 1208–1216.
- (15) Wang, Y.; Du, R.; Qiao, X.; Zhao, B.; Zhou, Z.; Han, Y. Optimization and characterization of exopolysaccharides with a highly branched structure extracted from *Leuconostoc citreum* B-2. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *142*, 73-84.
- (16) Oleksy-Sobczak, M.; Klewicka, E. Optimization of Media Composition to Maximize the Yield of Exopolysaccharides Production by *Lactobacillus rhamnosus* Strains. *Probiotics and Antimicrob. Proteins.* **2020**, *12*,774–783.
- (17) Du, R.; Xing, H.; Zhou, Z.; Han, Y. Isolation, characterisation and fermentation optimisation of glucansucrase-producing *Leuconostoc mesenteroides* DRP105 from sauerkraut with improved preservation stability. *Int. J. Food Sci. Tech*, **2017**, *52*, 2522–2530.

- (18) Trabelsi, I.; Slima, S. B.; Chaabane, H.; Riadh, B. S. Purification and characterization of a novel exopolysaccharides produced by *Lactobacillus* sp. Ca6. *Int. J. Biol. Macromol.* **2015**, *74*, 541–546.
- (19) Wang, Y.; Quian, P-Y. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. *PloS one.* **2009**, *4* (10), 1-9.
- (20) Caporaso, J.; Lauber, C.; Walters, W.; Berg-Lyons, D.; Lozupone, C.; Turnbaugh, P.; Fierer, N.; Knight, R. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2011**, *108*, 4516-4522.
- (21) Christoff, A. P.; Sereia, A. F. R.; Boberg, D. R.; Moraes, R. L. V.; Oliveira, L. F. V. Bacterial identification through accurate library preparation and high-throughput sequencing *Neoprosecta microbiome technologies.* **2017**.
- (22) Dubois, M.; Gilles, K. A.; Hamilton, J. K.; Pebers, P. A.; Smith, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal. Chem.* **1956**, *28*, 350–356.
- (23) Luedeking, R.; Piret, E. L. A kinetic study of the lactic acid fermentation: Batch process at controlled pH. *J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng.* **1956**, *1* (4), 393–431.
- (24) Zhao, X.; Han, Y.; Tan, X. Q.; Wang, J.; Zhou, Z. J. Optimization of antifungal lipopeptide production from *Bacillus* sp. BH072 by response surface methodology, *J. Microbiol.* **2014**, *52* (4), 324-32.
- (25) Farinazzo, F.S.; Farinazzo, E.S.; Spinosa, W.A.; Garcia, S. “*Saccharomyces boulardii*: Optimization of simultaneous saccharification and fermentation of cell production in organic and conventional apple substrate pulp”, *Food Sci. Biotechnol.* **2017**, *26* (4), 969–977.
- (26) Yang, Y.; Feng, F.; Zhou, Q.; Zhao, F.; Du, R.; Zhou, Z.; Han, Y. Isolation, purification and characterization of exopolysaccharide produced by *Leuconostoc*

- pseudomensenteroides* YF32 from soybean paste. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *114*, 529-535.
- (27) Wang, X.; Shao, C.; Liu, L.; Guo, X.; Xu, Y.; Lü, X. Optimization, partial characterization and antioxidant activity of an exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* KX041. *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, *103*, 1173-1184.
- (28) Seesuriyachan, P.; Kuntiya, A.; Hanmoungjai, P.; Techapun, C. Exopolysaccharide production by *Lactobacillus confusus* TISTR 1498 using coconut water as an alternative carbon source: the effect of peptone, yeast extract and beef extract. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* **2011**, *33* (4), 379-387.
- (29) Han, J.; Xu, X.; Gao, C.; Liu, Z.; Wu, Z. Levan-Producing *Leuconostoc citreum* Strain BD1707 and Its Growth in Tomato Juice Supplemented with Sucrose. *Appl. Environ. Microbiol.* **2016**, *82* (5), 1383–1390.
- (30) Zhang, Z.; Shen, H. Fermentation, performance and structure characteristics of xanthan produced by *Xanthomonas campestris* with a glucose/xylose mixture. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **2010**, *160*, 1653–1663.
- (31) Torres-Rodríguez, I.; Rodríguez-Alegría, M. E.; Miranda-Molina, A.; Giles-Gómez, M.; Morales, R. C.; López-Munguía, A.; Bolívar, F.; Escalante, A. Screening and characterization of extracellular polysaccharides produced by *Leuconostoc kimchii* isolated from traditional fermented pulque beverage. *SpringerPlus*, **2014**, *3*, 583.
- (32) Mozzi, F.; Savoy De Giori, G.; Oliver, G.; Front De Valdez. Exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* in milk under different growth conditions. *Milchwissenschaft - Milk Sci. Int.* **1996**, *51* (12) 670 – 673.
- (33) Sirajunnisa, A. R.; Vijayagopal, V.; Sivaprakash, B.; Viruthagiri, T.; Surendhiran, D. Optimization, kinetics and antioxidant activity of exopolysaccharide produced from

rhizosphere isolate, *Pseudomonas fluorescens* CrN6. *Carbohydr. Polym.* **2016**, *135*, 35–43.

CAPÍTULO IV ³

³ Artigo publicado na Revista **Process Biochemistry**, v. 91, p. 141–148, 2020.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.12.005>

Fernanda Silva Farinazzo ^{a,*}, Leticia Juliani Valente ^a, Mariana Bortholazzi Almeida ^b, Ane Stéfano Simionato^c, Maria Thereza Carlos Fernandes ^a, Carolina Saori Ishii Mauro ^a, Adriana Aparecida Bosso Tomal ^a, Sandra Garcia ^a

^aDepartment of Food Science and Technology, Center of Agricultural Sciences, Londrina State University, Celso Garcia Cid Highway - PR Route 445, Km 380, P.O. Box 10011, Londrina, Brazil; ^b Department of Chemistry, Center Exact Sciences, Londrina State University, Celso Garcia Cid Highway - PR Route 445, Km 380, P.O. Box 10011, Londrina, Brazil; ^c Department of Microbiology, Microbial Ecology Laboratory, Londrina State University, Celso Garcia Cid Highway - PR Route 445, Km 380, P.O. Box 10011, Londrina, Brazil

*Corresponding author: E-mail address: fsfarinazzo@gmail.com (F. S. Farinazzo)

Characterization and antioxidant activity of an exopolysaccharide produced by *Leuconostoc pseudomesenteroides* JF17 from juçara fruits (*Euterpe edulis* Martius)

Abstract

Juçara palm tree is considered an important species in the Atlantic forest ecosystem and the exploitation of its fruits is a main sustainable strategy adopted to its maintenance. Among several microorganisms in the juçara fruits, were found lactic acid bacteria (LAB) highly capable of synthesizing exopolysaccharides (EPS). Thus, the EPS synthesized by *Leuconostoc pseudomesenteroides* JF17 was characterized according to its chemical structure, physicochemical properties and antioxidant activity. HPLC analysis showed that the EPS consisted of a homopolysaccharide composed of glucose units, FT-IR spectroscopy revealed a dextran, confirmed by ^1H and ^{13}C NMR spectra which showed the composition of the polysaccharide, D-glucose units bound by α -(1 \rightarrow 6). The EPS showed high water retention capacity, $507.812 \pm 47.471\%$, and may be related to the porous structure revealed by SEM images. Thermal analysis indicated that the EPS had excellent thermal stability with degradation temperature of $320.8\text{ }^\circ\text{C}$ and melting point at $279.81\text{ }^\circ\text{C}$, with the enthalpy of 106.557 J/g . The EPS also presented sequestration ability on different free radicals tested, indicating high antioxidant activity. The results suggest that *L. pseudomesenteroides* JF17 might be widely used in the production of dextran which has potential qualities for applications in the food industry.

Keywords: Dextran; Glucan; Lactic Acid Bacteria; thermal property; chemical structure; antioxidant characteristic

1. Introduction

The juçara palm tree (*Euterpe edulis* Martius), belonging to the family Arecaceae, is native to the Atlantic Forest and produces a palm heart that has excellent commercial quality [1]. This plant is considered an important species in the ecosystem and listed as threatened with extinction [2], the exploitation of the fruits is one of the main sustainable strategies adopted to its maintenance [3]. Fruits in general, including juçara, are also important habitats for a variety of species of microorganisms in nature [4]. Many of these are lactic acid bacteria (LAB), and are highly capable of synthesizing various compounds along their metabolic pathways, such as exopolysaccharides (EPS) [5].

The production of EPS is well documented among several LAB, specifically the species from genera: *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, and *Streptococcus* [6]. EPS, when produced by LAB food grade GRAS (Generally Recognized As Safe), is an important natural and alternative source of commercial vegetable or animal additives since they can result in a safe, natural and healthy final product with texture and stability that can have a significant impact on product development [7].

The EPS produced by LAB are related to all forms of polysaccharides present outside the microbial cell wall [8]. These can be used to modify the rheology, texture and stabilization of industrialized products, presenting functional properties, which make them good viscosity agents, stabilizers, emulsifiers, as well as food and pharmaceuticals gelling agents [6]. They show differences in relation to gums, such as greater uniformity in their physicochemical properties due to the microorganism specificity and the possibility of control of the fermentation parameters, as pH, temperature and nutrients of the culture medium [9]. In addition, there has been an increasing interest in exploiting the EPS-producing LAB for their possible biological activities including antioxidant activities [10]. Therefore, EPS by LAB have been reported as a potential food additive or functional food ingredient with economic and health benefits.

Leuconostoc species are the primary producers of the dextrans that have multipurpose uses. Other LAB that produce dextrans include various *Streptococcus* and *Lactobacillus* species [11]. Dextran is a homopolysaccharide which is composed of D-glucose units containing α -(1 \rightarrow 6) bonds in the main chain and different branches α -(1 \rightarrow 4), α -(1 \rightarrow 3) and α -(1 \rightarrow 2). The degree of branching depends on the nature of the enzyme dextransucrase biosynthesized by the microbial strain. This enzyme hydrolyzes the sucrose of glycosidic binding, releasing glucose that is used in the biosynthesis of dextran and fructose [12]. In this scenario, the present study aimed to investigate the chemical properties, the physicochemical properties and the antioxidant activity of an exopolysaccharide synthesized by *L. pseudomesenteroides* isolated from juçara palm fruits.

2. Materials and methods

2.1. Preliminary screening for EPS producing isolates

Fruits from the juçara palm tree (1 kg) were collected aseptically from a humid subtropical environment, from Bimini Farm (23°14'0.48"S; 51°24'0.43' W), located at Rolândia city, southern Brazil. The fruits were processed immediately after collection, washed and pulped (1:1/fruits: sterile water) in a planetary mixer (Arno, 408,002,194 BPA, Brazil) previously sanitized. The obtained pulp was fractionated in Erlenmeyer flasks (100 mL) and incubated at 25 °C for 48 h (Novatecnica® Incubator, Brazil). After this period, MRS agar plates (Merck, Germany) were used for inoculation and colonies grown at 30 °C for 48 h in anaerobic flasks containing GasPak (Oxoid) were classified according to their characteristics and morphological structures. In total, 198 individual colonies were isolated for further analysis. Colonies with LAB characteristics, circular and smooth structure, cocci or rod morphology, Gram positive, catalase negative, and that ferment glucose with gas production [13,14], were tested for EPS production capacity. Colonies were inoculated on MRS agar

supplemented with 10 % (w/v) sucrose at 30 °C for 48 h (Novatecnica® Incubator, Brazil). After the incubation period, the presence of mucoid like colonies was verified [15].

2.2. Identification of bacteria through 16S rRNA sequencing

The selected three colonies with characteristic of LAB and mucoid appearance were subjected to molecular characterization to sequencing of the 16S rRNA molecular marker. The analysis of this marker was performed by high-throughput sequencing using the MiSeq Sequencing System (Illumina Inc., USA) and Next Generation Sequencing (NGS) technique. This stage was carried out in the molecular biology laboratory of Neopropecta, following the company's protocol (Neopropecta Microbiome Technologies, Florianópolis, Brazil). The amplicon sequencing library preparation was performed for bacteria using the V3-V4 16S rRNA gene primers 341F (CCTACGGGRSGCAGCAG; 5'-3' [16] and 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT, ; 5'-3' [17], with the following conditions: the first PCR primers contain the Illumina sequences based on TruSeq structure adapter (Illumina, San Diego, CA), allowing the second PCR with indexing sequences.

The PCR reactions were always carried out in triplicates using Platinum Taq (Invitrogen, USA) with the conditions: 95 °C for 5 min, 25 cycles of 95 °C for 45 s, 55 °C for 30 s and 72 °C for 45 s and a final extension of 72 °C for 2 min for PCR 1. In PCR 2 the conditions were 95 °C for 5 min, 10 cycles of 95 °C for 45 s, 66 °C for 30 s and 72 °C for 45 s and a final extension of 72 °C for 2 min. The final PCR reaction was cleaned up using AMPureXP beads (Beckman Coulter, Brea, CA) and samples were pooled in the sequencing libraries for quantification. The DNA concentration of the pool amplicon was estimated with Picogreen ds DNA assays (Invitrogen, USA), and then the pooled libraries were diluted for accurate qPCR quantification using KAPA Library Quantification Kit for Illumina platforms (KAPA Biosystems, Woburn, MA). The library pool was adjusted to a final concentration of 11.5 pM

and sequenced in a MiSeq system, using the standard Illumina primers provided in the kit. A single-end 300nt run was performed using a V2x300 sequencing kit.

The identified bacteria was registered in GenBank as *L. pseudomesenteroides* JF17 (MN756802), and it was stored in MRS broth (Merck, Germany) supplemented with 20% (w/v) glycerol at -80°C .

2.3. Extraction and purification of EPS

For EPS production, JF17 strain (1% v/v) was cultivated in MRS broth supplemented with 18% (w/v) sucrose, pH adjusted to 7.3 at 20°C for 48 h and static condition (Novatecnica[®] Incubator, Brazil), resulting in 53.77 g/L EPS, according to preliminary studies (data not shown). The cell suspension was heated to 100°C for 30 min for enzymes inactivation and to dissolve the EPS attached to the cells and then subsequently centrifuged at 12,000 g at 4°C for 15 min to remove biomass. Crude EPS was precipitated by chilled ethanol 95% (v/v) with the addition of 3 volumes of the supernatant. After precipitation at 4°C (overnight), the sample was centrifuged at $12,000 \times g$ for 15 min and the pellet was retained. For purification EPS pellets were dissolved in distilled water (~150mL), being the procedure repeated three times before lyophilization step. The polymer dry mass was determined by measuring the mass of the precipitate [15].

2.4. Monosaccharide composition using HPLC

Monosaccharides analysis was performed according to the method described in the ISO 11292:1995 [18]. EPS sample (0.3 g) was transferred to a screw-cap erlrmeyer (500 mL) and then, 50 mL of HCl (1.0 mol/L) was added. The acid hydrolysis was performed in thermostated bath at 85°C for 180 min. After cooled, the extract was filtered in white paper in 100 mL volumetric flask and the volume was filled up with ultrapure water (Milli-Q[®], Millipore,

Germany). An aliquot of 2 mL of sample solution was passed through a pre-conditioned SepPack cartridge (Waters technologies, Corp., EUA) followed by a filtration step using a 0.22 μm PTFE (Polytetrafluoroethylene) hydrophilic membrane (Millipore, Merck, Germany). The sample was injected into the chromatographic Dionex ED50 HPLC system (Dionex, Corp, CA, EUA) with Dionex CarboPack PA1 250 x 4.6 mm column (Dionex, Corp, CA, EUA) and mobile phases:(A) NaOH (1.4 mM) and (B) NaOH (300 mM). The analytical method presented a time of 70 min, with 45 minutes running time of phase A, followed by the regeneration stage (phase B) for 15 min, returning to the initial condition (phase A) for 10 min. The sample injection volume was 20 μL and the detection was performed in an ED50 detector with data acquisition and processing performed using PeakNet software (Dionex, Corp, CA, EUA). The sample composition was verified by comparing the retention time of the monosaccharides standards, glucose, fructose, mannose and raffinose (HPLC grade, purity > 99%, Sigma-Aldrich) with the retention time of the peaks presented in the sample.

2.5. Fourier transform-infrared (FT-IR) spectroscopy

Infrared spectrum of the purified EPS was obtained using a Fourier transform infrared spectrophotometer (FT-IR) Shimadzu IRPRESTIGE-21 (Shimadzu, Corp., Japan). The lyophilized EPS (10 mg) was mixed with dry KBr (2% w/w) powder and then pressed into pellets of the 1 mm for FT-IR analysis in the frequency range of 500–4000 cm^{-1} and processed by IR SOLUTION software (Shimadzu, Corp., Japan).

2.6. ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy analysis

Prior to analysis, lyophilized EPS (obtained in the 2.3 section) was dissolved in D_2O (99.9%) at concentrations of 10 mg/mL (for ^1H NMR) and 30 mg/mL (for ^{13}C NMR).

NMR spectrum of the EPS from strain JF17 were obtained using a Bruker AVANCE 400 MHz spectrometer (Bruker Co., Billerica, MA, USA) operated at 25 °C with a 5 mm inverse probe. Chemical shifts (δ) were expressed in parts per million (ppm).

2.7. Thermogravimetric analysis (TGA)

The pyrolysis and combustion were carried out in Shimadzu TGA-50 thermal analyzer (Shimadzu, Corp., Japan). The EPS sample (10 mg) was subjected to a temperature range of 25–400 °C under nitrogen gas flow 20 mL/min and a linear heating at the rate of 10 °C/min. The plot was plotted with weight loss (percentage) and heat flow against temperature.

2.8. Differential scanning calorimeter (DSC)

The thermal property of the EPS JF17 was studied by Differential Scanning Calorimeter (DSC) using Shimadzu DSC-60 thermal analyzer (Shimadzu, Corp., Japan). The lyophilized EPS sample (5 mg) was loaded onto a platinum pan, which was sealed and analyzed using empty pan as a reference. The melting point and enthalpy changes were determined by increasing the heating rate at 10 °C/min from 25 to 350 °C.

2.9. Scanning electron microscopy (SEM) analysis

The microstructure and surface morphology of the EPS from strain JF17 were investigated by scanning electron microscopy (SEM: Quanta 250 FEG, FEI Company, Hillsboro, OR, EUA). The lyophilized EPS sample (5 mg) was fixed on aluminum stub and gold-sputtered before SEM examination maintaining an accelerated voltage of 10 kv.

2.10. Determination of water solubility index (WSI) and water holding capacity (WHC)

Water solubility index of the EPS was determined according to the method described by Saravanan and Shetty [19]. Lyophilized EPS sample (0.2 g) was dissolved in 5 mL of ultrapure water and stirred for 30 min in a water bath at 40 °C to get an uniform suspension. The suspension was centrifuged at 5000 × g for 10 min and the supernatant was dried at 105 °C for 4 h to obtain the dry soluble solids weight. WSI was calculated as follows:

$$\text{WSI (\%)} = (\text{weight of dry soluble solids in supernatant}) / \text{weight of dry sample} \times 100 \quad (1)$$

The water holding capacity (WHC) [19] for the EPS was performed by dissolving 0.2 g of lyophilized EPS sample in 10 mL of ultrapure water and kept at 40 °C for 10 min for uniform dispersion. The dispersed sample was centrifuged at 16,000 g for 30 min and the supernatant was discarded. The pellet was dropped on pre-weighed filter paper for drainage of water. Then the filter paper was weight. WHC was calculated as follows:

$$\text{WHC (\%)} = \text{Total sample weight after water absorption} / \text{Total dry sample weight} \times 100 \quad (2)$$

2.11. *In vitro* antioxidant activities

Free radical scavenging activities 2,2'-diphenyl-β-picrylhydrazyl (DPPH[•]) of EPS were determined according to the report described by Wang et al. [20]. Briefly, 1 mL of aqueous EPS aliquot of various concentrations of sample (0, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 and 5.0 mg/mL) was mixed with 1.0 mL of DPPH[•] solution (0.25 mM dissolved in 98% ethanol). The mixture was incubated for 15 minutes at room temperature (25 °C) and it was kept in the dark. After this period, it was centrifuged at 8000 × g for 10 min and then the absorbance of the supernatant was measured at 517 nm in the spectrophotometer (Biochrom Ltd, Cambridge, England). The DPPH[•] radical scavenging activities were calculated according to Eq. (3).

The radicals scavenging activity was calculated as follows:

$$\text{Scavenging activity (\%)} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100 \quad (3)$$

where A_1 is the absorbance value of sample solution and A_0 is the absorbance value of the free radical solution without the sample (blank). Ascorbic acid was used as a positive control.

The hydroxyl radical scavenging activities were investigated according to Xing et al. [20]. 1 mL of aqueous EPS aliquot of various concentrations of sample (0, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 and 5.0 mg/mL) was mixed with FeSO_4 (1.0 mL, 9 mM); salicylic acid-ethanol (1.0 mL, 9 mM) and H_2O_2 (1.0 mL, 9 mM). The mixture was incubated at 37 °C and kept in the dark for 40 min. After, was centrifugated at $8000 \times g$ for 10 min and then the absorbance was measured at 510 nm. The hydroxyl radical scavenging activities were calculated according to Eq. (3).

The radical scavenging activity 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS^{++}) was investigated by the method of Wang et al. [10]. For this analyze, ABTS^{++} was produced by the reaction of 7 mM ABTS^{++} in water with 2.45 mM potassium persulfate, which was stored in the dark at room temperature for 16 h. The ABTS^{++} solution was diluted in ethanol to read an absorbance of 0.70 at 734 nm before use. The assay consisted of 2 mL of aqueous EPS aliquot of various sample concentrations (0, 0.2, 0.5, 1.0 and 2.0 mg/mL) added into 4 mL ABTS^{++} solution. Then, the mixture was incubated at 25 °C in the dark for 5 min. The absorbance was determined at 734 nm and the ABTS^{++} radical scavenging activities was also calculated according to Eq. (3).

2.12. Statistical Analysis

The numerical results of the physicochemical properties and antioxidant activity were averages of three replicates. Data were analyzed using the univariate variance analysis procedure (ANOVA) using Statistica 7.0, and the graphical analysis was performed GraphPad Prism 5 software and OriginLab 155 Inc., USA. A level of 0.05 was established to determine statistical significance.

3. Results and Discussion

3.1. Identification of the EPS-producing strain

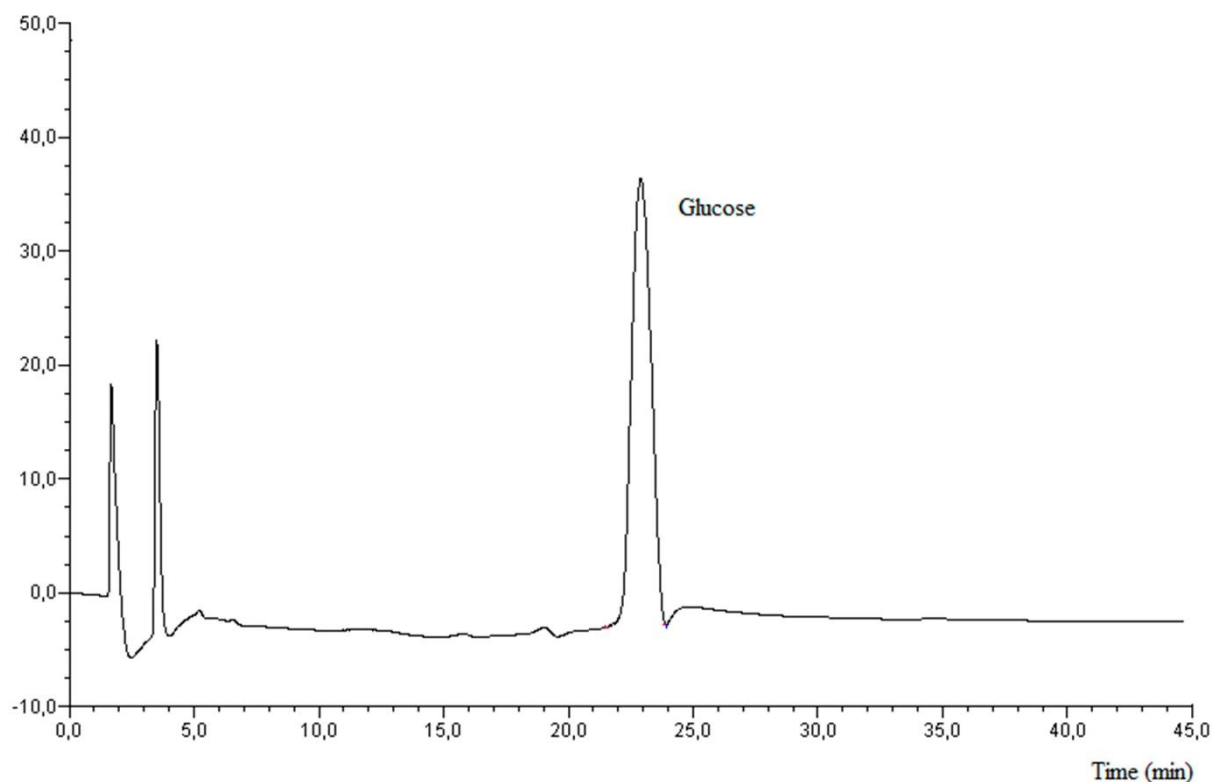
Out of 198 isolated colonies, 21 pure colonies had circular and smooth structure characteristics, rod-shaped, Gram-positive, catalase-negative morphology and gas production from glucose fermentation, characteristic of LAB. When MRS agar was supplemented with sucrose, 5 colonies were viscous and cream colored, characterizing EPS producers [15]. One of the colonies with EPS characteristics was genotypically identified and PCR amplified, and with the highest levels of similarity in the 16S rRNA gene sequence were *L. pseudomesenteroides* (100%). The strain was identified as *L. pseudomesenteroides* through morphological, biochemical, physiological tests and 16S rDNA sequencing analysis, and named *L. pseudomesenteroides* JF17.

3.2. Monosaccharide composition analysis of EPS

The chromatographic analysis of EPS produced by *L. pseudomesenteroides* JF17 revealed a single peak, at retention time of 23 min (Fig. 1), corresponding to the glucose as the only sugar, indicating a glucan, homopolysaccharide made up of glucose units. The glucan is composed of glucose units linked by glycosidic bonds, produced by the hydrolysis of sucrose by the action of the enzyme glucansucrase (glycosyl hydrolase) present in different LAB [22]. Han et al. [23] also indicated that glucose was the sole monosaccharide in the polysaccharide

synthesized by *Leuconostoc mesenteroides* BD1710 in the tomato-juice–sucrose medium. The EPS synthesized by *Weissella confusa* KR780676 cultured in MRS broth supplemented with 2% sucrose also was a homopolysaccharide, but made up of galactose monomers [24].

Fig. 1. HPLC Chromatogram showing the glucose monomer from EPS produced by JF17.

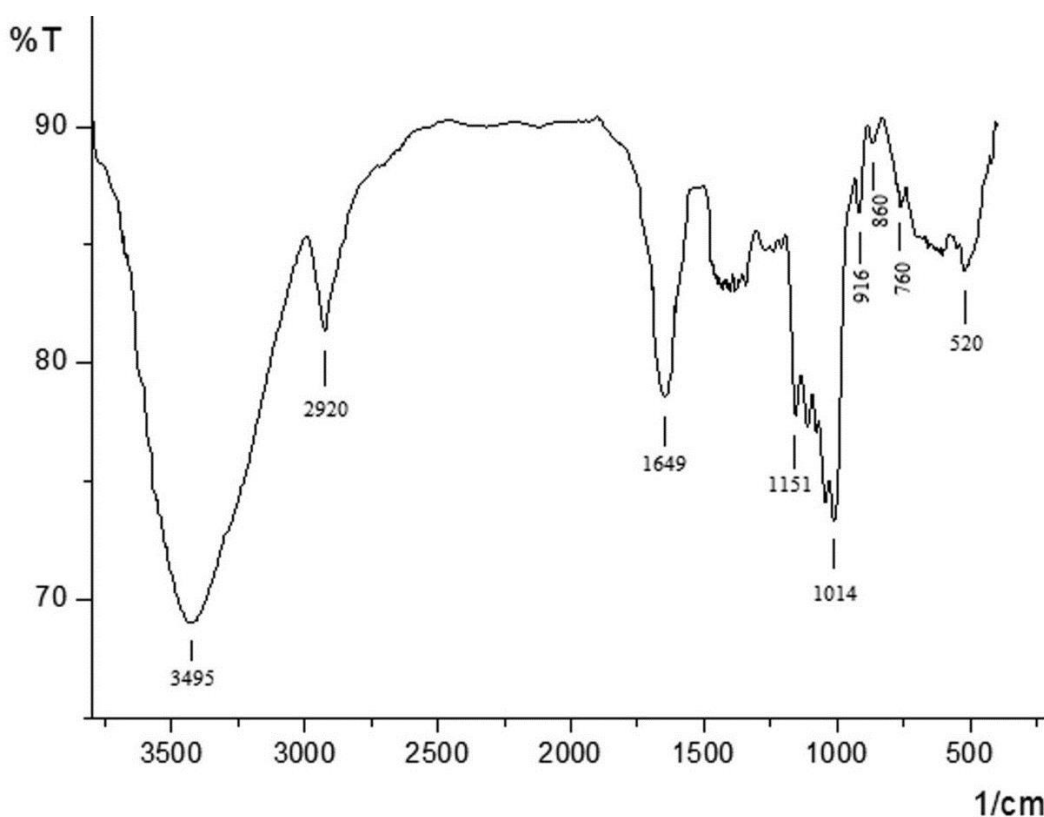


3.3. FT-IR spectroscopy analysis of EPS

FT-IR spectroscopy was conducted to investigate the functional groups and characterize the covalent bonds of the EPS produced by *L. pseudomesenteroides* JF17 (Fig. 2). The presence of high levels of hydroxyl groups (O-H) was indicated by the absorption range in the FT-IR spectra around 3495 /cm, confirming the polysaccharide nature of the sample [23]. The band in the region of 2920/cm was attributed to the stretching vibration to the C-H bonds. The absorption band at 1649/cm is related to fundamental vibrations of the water, specifically a symmetrical angular deformation in the plane (δ_s O-H) [18]. The main absorption bands that characterize the glycosidic bridge type of dextran EPS are the 1151/cm and 916/cm. These

bands are characteristic of the covalent vibrations of C-O-C bond and glycosidic bridge and the angular deformation band (δ C₁-H) respectively. In the region of fingerprint of the spectrum (916/cm), corresponding to the α -(1 \rightarrow 6) glycosidic bridge, was related to the pyranose form of glucosyl residue [25]. The presence of absorption band at 1014/cm (ν C-O) was attributed to the great chain flexibility present in dextran around the α -(1 \rightarrow 6) glycosidic bonds characteristic of exopolysaccharide produced by this species of LAB [26]. The stretching band to the 860/cm was characterized by α -D-glucose. The weak absorption band at 760 and 520/cm were indicative of glycosidic linkage peak for polysaccharide. The α -(1 \rightarrow 6) linkages of the EPS was further confirmed by ¹H and ¹³C NMR analysis.

Fig. 2. FT-IR spectrum of EPS produced by *L. pseudomesenteroides* JF17 at the region 3000 and 400/cm.



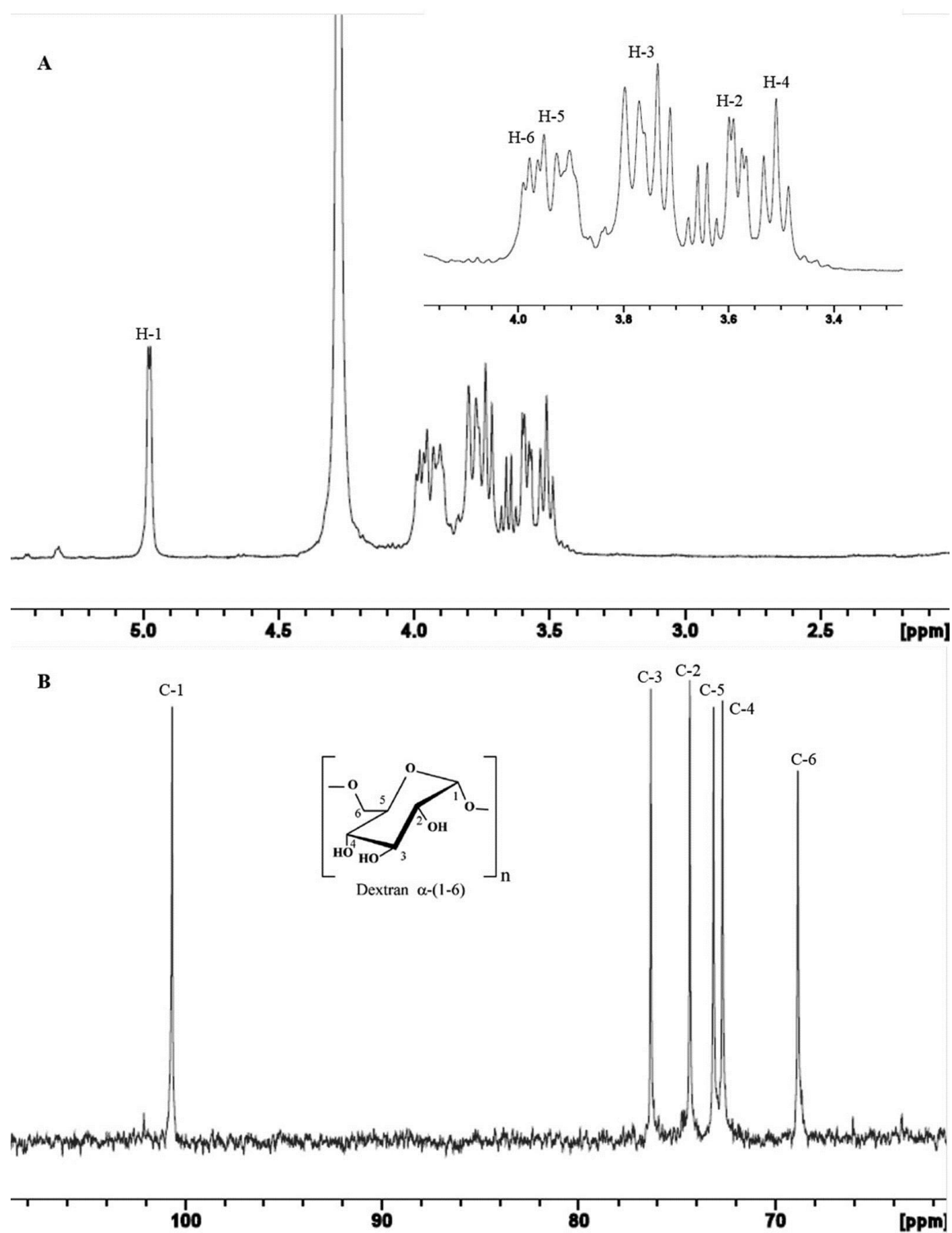
3.4. ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy analysis of EPS

NMR analysis was performed to obtain greater structural details of the dextran produced by *L. pseudomesenteroides* JF17. The ^1H NMR spectrum of the EPS (Fig. 3A) showed chemical shifts corresponding to the glycosyl residues as the repeating unit of the biopolymer. In the ^1H NMR spectrum of the EPS, a doublet in the anomeric region (H-1) was observed in δ 4.98 ppm, typical signal of an α -(1 \rightarrow 6) glycosidic chain, characteristic of a dextran [11]. This result was in good agreement with the FT-IR absorption peak at 916/cm (Fig. 2) and indicated that the EPS from strain JF17 mainly consisted of one monosaccharide residue. A ring proton region between δ 3.53 – 3.96 ppm was due to the C2 - C6 linked protons. D-glucose carbonyl hydrogens of (H-4) were observed as triplet (t) at 3.53 ppm, H-2 and H-3 have double-doublet (dd) signals at δ 3.57 and 3.75 ppm respectively and H-5 and H-6 were observed as double doublets (dl) at δ 3.92 and 3.96 ppm.

The ^{13}C NMR of the EPS (Fig. 3B) was conducted to assign the chemical shifts of the anomeric and non-anomeric carbons [11]. The C-1 presented δ 100.5 ppm corresponding to the presence of α -(1 \rightarrow 6) glycosidic linkage of the EPS [26]. The same anomeric pattern \sim δ 90 ppm, was found in studies such as Saravanan and Shetty [19] and Han et al. [23]. The four peaks observed at δ 76.20; 74.23; 73.10 and 72.50 ppm correspond to C-3, C-2, C-5 and C-4 carbons of glucose, respectively. The C-6 carbon signal of the glucose unit could be clearly observed at δ 68.5 ppm, indicating that two glucose units in the dextran chain backbone were linked by α -(1 \rightarrow 6) linkages [23]. No additional peaks were observed in region between δ 77-85 ppm indicating that no branched linkage was observed [25]. Thus, the results confirm that the EPS JF17 was a linear dextran composed of D-glucose units linked by α -(1 \rightarrow 6)-linkage. This dextran is the same as produced by *L. mesenteroides* XG5 [26], since it is an unbranched glucan with α -(1 \rightarrow 6) bonds. However, it is different from the dextran produced by *L. citreum* NM105 from the Manchurian sauerkraut, a glucan bearing contained α -(1 \rightarrow 6)-linked D-

glucopyranose units, 2,6-linked D-glucopyranose units and terminal -D-glucopyranose units at a ratio of 1:1:1, suggested that the highly α -(1 \rightarrow 2) branched dextran [27].

Fig. 3. ^1H (A) and ^{13}C (B) NMR of EPS by *L. pseudomesenteroides* JF17 (400 MHz, in D_2O).



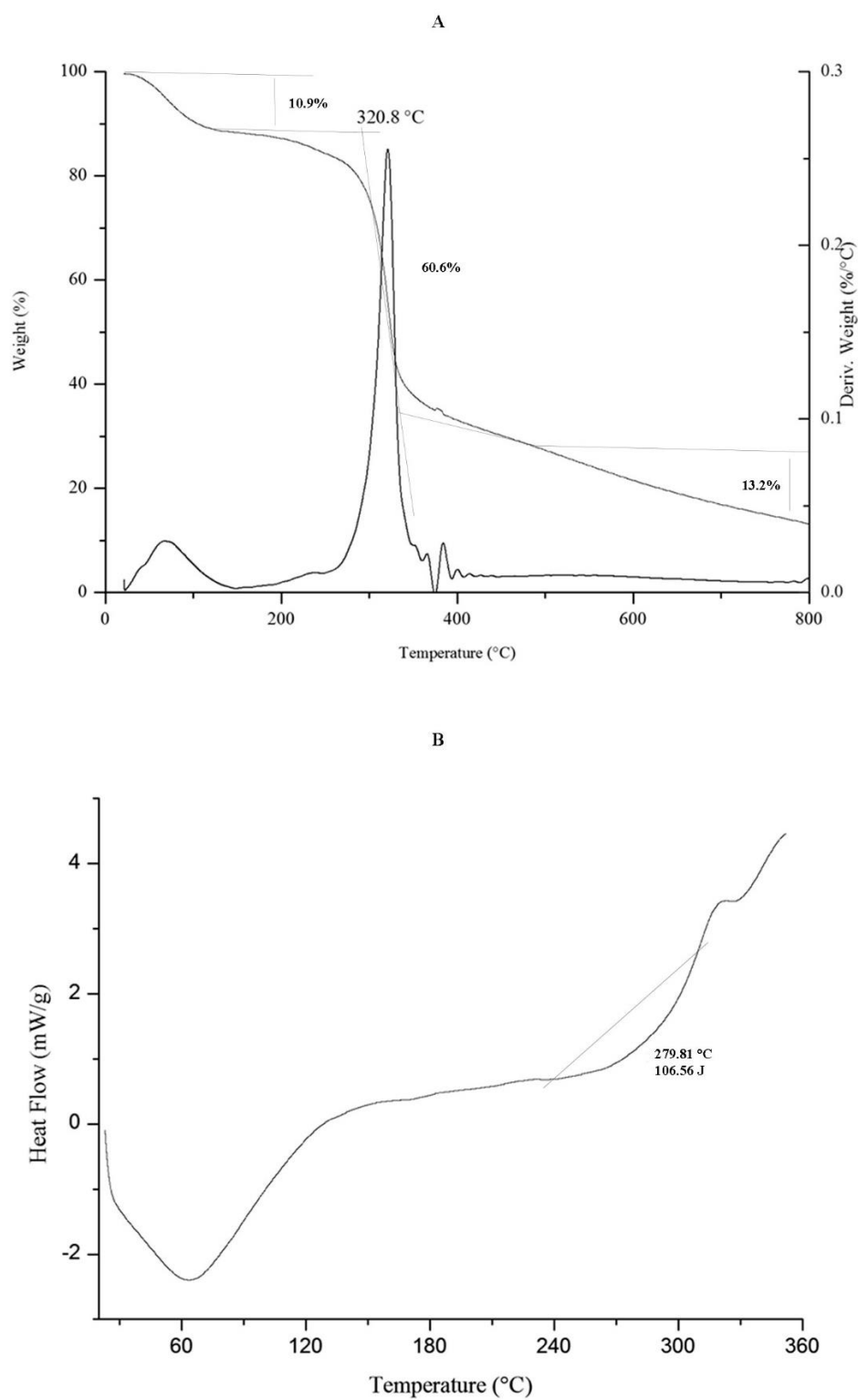
3.5. Thermal behavior of EPS, TGA and DSC

TGA analysis of EPS produced by *L. pseudomesenteroides* JF17 was performed dynamically between the weight loss and the temperature (Fig. 4A). The result indicated that there was degradation of EPS in three steps. Since there is a direct relationship between carboxyl group content and the material hydrophobicity, the initial material moisture content is given by the increased carboxyl group quantity [11]. Regarding to this, EPS had an initial weight loss of 10.9% between 21 °C and 130 °C, related to loss of moisture. The EPS weight remained stable when the temperature was raised from 130 °C to 270 °C. Dynamic weight loss (60.6%) was observed between 270 °C and 350 °C, which may be due to the depolymerization of EPS. The DTG curve (Termogravimetry derived) determined the degradation temperature of the dextran as 320.8 °C. Zhou et al. [26] reported that the degradation temperature of an EPS of *L. pseudomesenteroides* XG5 was 313.8 °C, very close to that found in this study. However, Ahmed et al. [28] showed that the degradation temperature of an EPS produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 was 299.6 °C. Finally, the EPS weight loss gradually decreased to leave a final residue of 13.2%.

DSC analysis was performed with the aim to investigate the energy levels and changes in enthalpy (ΔH) values of EPS with a heat flow from 25 to 350 °C. Analysis of the DSC thermogram of the dextran polymer showed the first endothermic peak at approximately 60 °C (Fig. 4B), being associated with water movement. The dextran JF17 showed a melting point of 279.81 °C and the endothermic enthalpy change (ΔH) needed to melt 1 g of EPS was 106.557 J (Fig. 4B). Kavitate et al. [24] described a curvature very close to that found in this study for galactan produced by *Weissella confusa* KR780676, which showed an endothermic enthalpy of 74.337 J/g at a melting point of 274.65 °C. In addition, Ahmed et al. [28] reported that the maximum melting temperature for reference material, such as locust bean, xanthan gum and guar gum was 109.11; 153.4 and 490.1 °C and the enthalpy change was 87.1; 93.2 and 192.9

J/g, respectively. These differences in thermal behavior may be due to the molecular configuration of the polymer [29].

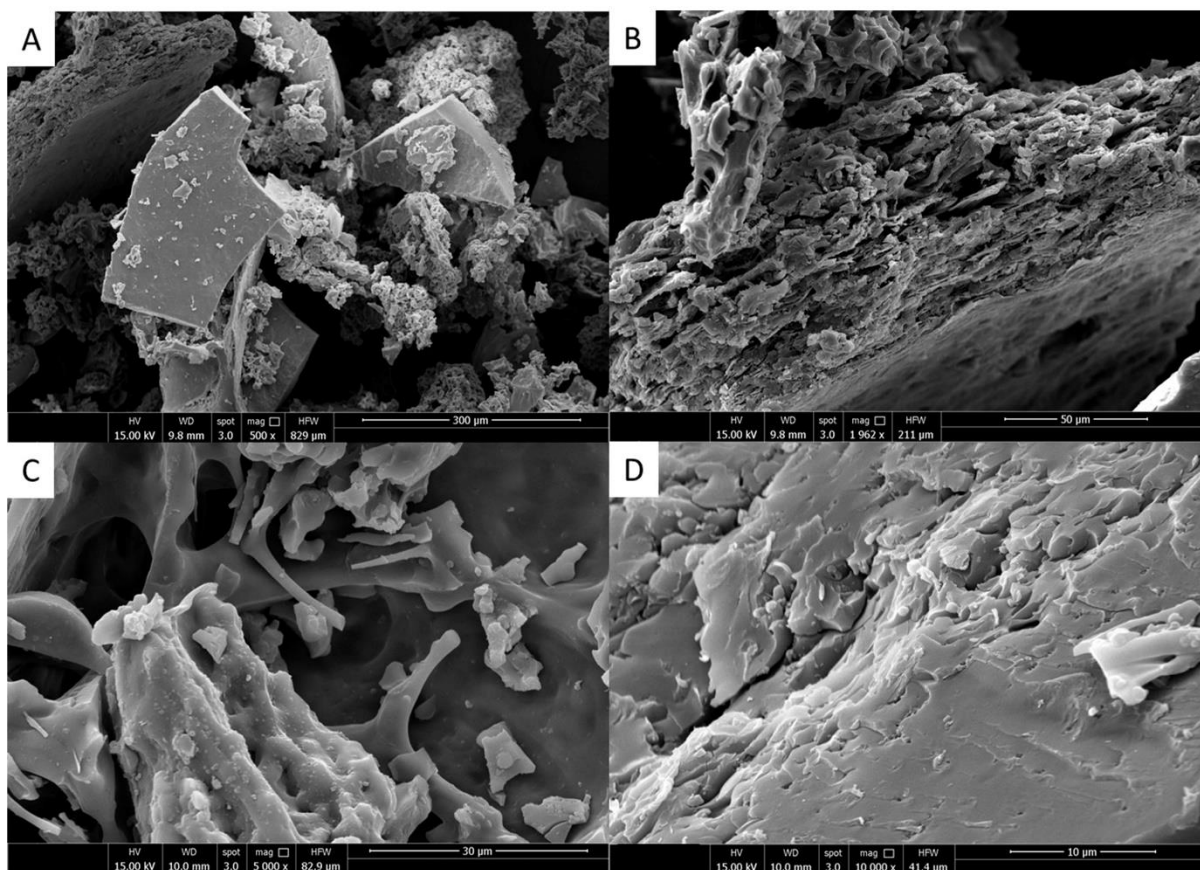
Fig. 4. Analysis of TGA (A) and DSC (B) of EPS produced by JF17 strain.



3.6. SEM analysis of EPS

The three-dimensional microstructures and surface morphology of EPS produced by *L. pseudomesenteroides* JF17 were represented by SEM (Fig. 5). SEM images of the dextran produced by JF17 strain at 500 \times and 2000 \times (Fig. 5A and 5B) revealed a porous structure. This structure is essential for viscosity and water retention capacity, improving the physical properties of the products, enabling a consistent matrix of hydrated polymer [31]. Similarly, dextran produced by *Leuconostoc lactis* KC117496 showed porous structure as a polymer matrix [18]. Smooth surfaces such as those seen at 5000 \times and 10000 \times (Fig. 5C and 5D) are favorable characteristics of the material used to produce plasticized biofilms [32].

Fig. 5. Scanning electron microscopy showing the surface morphology of the EPS at various magnifications at 500 \times (A), 2000 \times (B), 5000 \times (C), 10000 \times (D).



3.7. Water solubility index (WSI) and water-holding capacity (WHC) of EPS

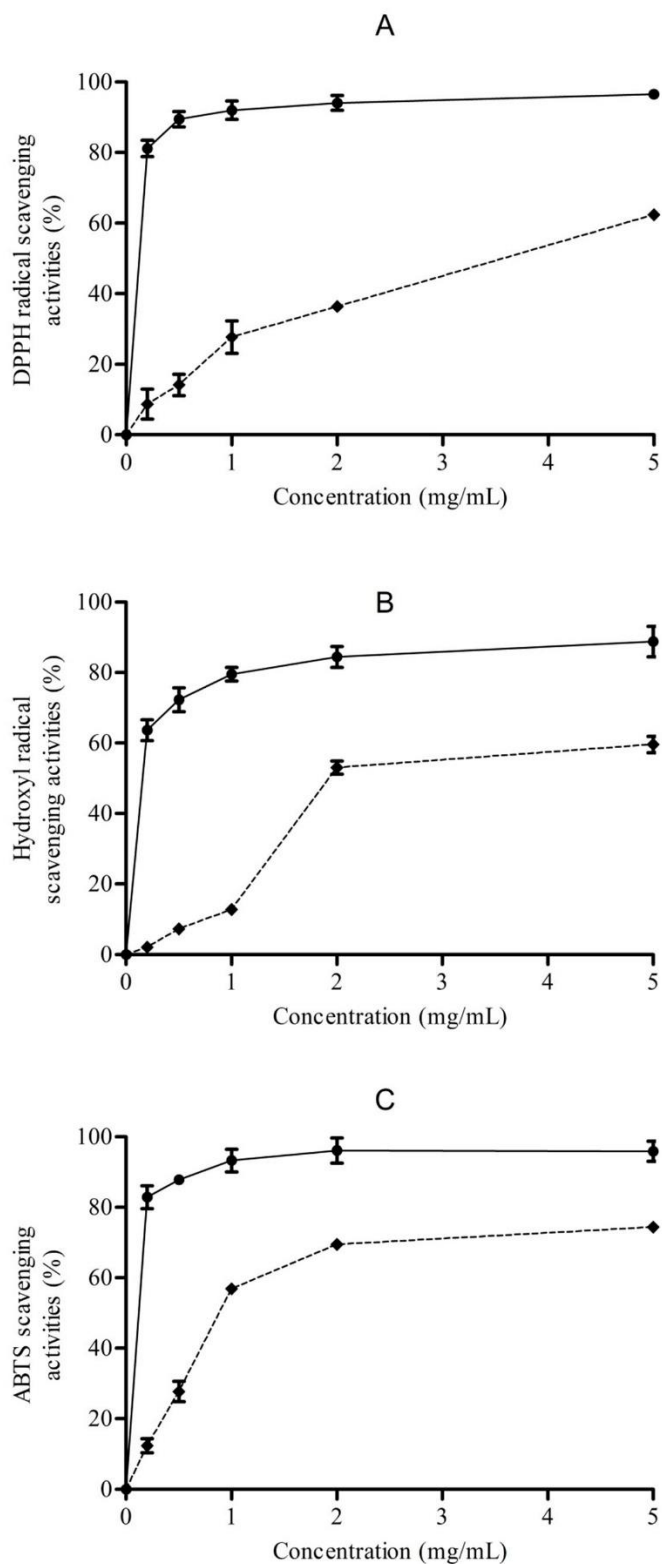
The WSI and the WHC of the dextran by *L. pseudomesenteroides* JF17 were $13.355 \pm 1.494\%$ and $507.812 \pm 47.471\%$, respectively. According to Saravanan and Shetty [19], *Leuconostoc lactis* KC117496 produced a dextran which had a WSI of 14.2% and a WHC of 117%. The WSI and WHC of an EPS produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 were found to be 14.2% and 496% respectively [28]. EPS of the JF17 strain was soluble in water with good water retention capacity, due to the structure of the porous matrix of the polymer, as observed in SEM (Fig. 5). This structure has the ability to interact easily with water molecules through hydrogen bonds [19], being potential binding and stabilizing agents of water [6].

3.8. Antioxidant activity of EPS

As shown in Fig. 6, the scavenging activity of the EPS by JF17 strain and ascorbic acid acted in a concentration-dependent manner (0.2 to 5.0 mg/mL). The highest concentration of EPS (5 mg/mL) presented the best radical sequestration. Although comparably lower to the results obtained for ascorbic acid, the EPS exhibited a promising antioxidant activity. The maximum scavenging activity of the DPPH[•] radical was 62.392% (Fig. 6A) and the calculated EC₅₀ value was 3.629 mg/mL. Xing et al. [21] reported that most of the DPPH radical scavenging activity of the EPS isolated by *Leuconostoc mesenteroides* DRP105, was 41.52%, at a concentration of 5 mg/mL of dextran. Hydroxyl radicals scavenging activities of the EPS by JF17 strain was 53.03% (Fig. 6B) and EC₅₀ of 6.761 mg/mL, at 5.0 mg/mL. The results showed the potential scavenging capacity of hydroxyl radicals from EPS of JF17 when compared to that reported by Xing et al. [21] that obtained scavenging activity of hydroxyl radicals from EPS by *L. mesenteroides* DRP105 of 30.48% in the same dose. The scavenging capacity of ABTS^{•+} radical from dextran produced by *L. pseudomesenteroides* JF17 was 74.393% (Fig. 6C) and calculated EC₅₀ value of 1.339 mg/mL, also at a concentration of 5

mg/mL. Among the radicals assessed, the ABTS^{•+} was the one with the largest scavenging by the EPS, showing its greatest activity. Wang et al. [10] reported a scavenging activity for EPS synthesized by *Lactobacillus plantarum* KX041 of approximately 80% (5 mg/mL), close to that found for JF17. Thus, EPS presented a large number of hydroxyl groups essential for antioxidant activity, which could donate electrons to reduce the radical in a more stable form [33]. These results indicated that EPS by JF17 strain had good scavenging activity of DPPH[•], hydroxyl and ABTS^{•+}, probably due to their hydrogen donation abilities.

Fig. 6. Antioxidant activities by scavenging activity of the radicals: DPPH (A), hydroxyl (B) e ABTS[•] (C) from \blacklozenge EPS by *L. pseudomesenteroides* JF17 and \bullet ascorbic acid. Data are presented as the mean \pm SD of the triplicates.



4. Conclusion

The results show that *L. pseudomesenteroides* JF17 isolated from juçara palm fruits produced a glucan (homopolysaccharide), a dextran formed by D-glucose units linked by α -(1 \rightarrow 6) bonds. It presented a highly porous structure with solubility and water binding capacity, optimum thermal behavior being a potential compound for commercial application as an additive or ingredient in the food industry. EPS showed good antioxidant activity with ABTS⁺, DPPH[•], and hydroxyl radicals, showing its potential health benefits.

Acknowledgements

This research was supported of the Londrina State University, National Council of Technological and Scientific Development (CNPq), Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) and Neoprospecta Microbiome Technologies (Brazil), for sequencing the bacteria.

References

- [1] M.O.P. Bicudo, R.H. Ribani, T. Beta, Anthocyanins, Phenolic Acids and Antioxidant Properties of Juçara Fruits (*Euterpe edulis* M.) Along the On-tree Ripening Process, Plant Food Hum. Nutr. 69 (2) (2014) 142–147.
- [2] G.S.C. Borges, F.G.K. Vieira, C. Copetti, L.V. Gonzaga, R.C. Zambiasi, J. Marcini Filho, R. Fett, Chemical characterization, bioactive compounds, and antioxidant capacity of Jussara (*Euterpe edulis*) fruit from the Atlantic Forest in southern Brazil, Food Res. Int. 44 (7) (2011) 2128–2133. doi: 10.1016/j.foodres.2010.12.006
- [3] F.P. Chaimsohn, N.C. Chiquetto, Construção do marco legal para a produção de açaí de juçara: contribuições da “oficina interestadual sobre legislação, comercialização e

- marketing para exploração de frutos da palmeira juçara, *Revista Conexão UEPG* 9 (2) (2013) 244-253.
- [4] M.A. Lachance, W.T. Starmer, C.A. Rosa, J.M. Bowles, J.S. Barker, D.H. Janzen, Biogeography of the yeast of ephemeral flowers and their insects, *FEMS Yeast Res.* 1 (1) (2001) 1-8. doi: 10.1111/j.1567-1364.2001.tb00007.x
- [5] I. Ibarburu, A. I. Puertas, I. Berregi, M.A. Rodríguez-Carvajal, A. Prieto, M.T. Dueñas, Production and partial characterization of exopolysaccharides produced by two *Lactobacillus suebicus* strains isolated from cider, *Int. J. Food Microbiol.* 214 (2015) 54–62. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.07.012
- [6] P. Sanlibaba, G.A. Çakmak, Exopolysaccharides Production by Lactic Acid Bacteria, *Appl Microbiol.* 2 (2) (2016). doi: 10.4172/2471-9315.1000115.
- [7] B. Ismail, K.M. Nampoothiri, Production, purification and structural characterization of an exopolysaccharide produced by a probiotic *Lactobacillus plantarum* MTCC 9510, *Arch. Microbiol.* 192 (12) (2010) 1049-1057.
- [8] P. Ruas-Madiedo, J. Hugenholtz, P. Zoon, An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria, *Int. Dairy J.* 12 (2-3) (2002) 163–171. doi: 10.1016/S0958-6946(01)00160-1.
- [9] D. M. Souza, C. H. Garcia-Cruz, Produção fermentativa de polissacarídeos extracelulares por bactérias, *Semina: Ciênc. Agrár.* 25 (4) (2004) 331-340. doi: 10.5433/1679-0359.2004v25n4p331.
- [10] X. Wang, C. Shao, L. Liu, X. Guo, Y. Xu, X. Lü, Optimization, partial characterization and antioxidant activity of an exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* KX041, *Int. J. Biol. Macromol.* 103 (2017) 1173–1184. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.05.118.

- [11] N.H. Maina, M. Tenkanen, H. Maaheimo, R. Juvonen, L. Virkki, NMR spectroscopic analysis of exopolysaccharides produced by *Leuconostoc citreum* and *Weissella confusa*, *Carbohydr. Res.* 343 (9) (2008) 1446–1455. doi: 10.1016/j.carres.2008.04.012.
- [12] I. Rosca, A.R. Petrovici, D. Peptanariu, A. Nicolescu, G. Dodi, M. Avadanei, I.C. Ivanov, A.C. Bostanaru, M. Mares, D. Ciolacu, Biosynthesis of dextran by *Weissella confusa* and its *in vitro* functional characteristics, *Int. J. Biol. Macromol.* 107 (2018) 1765-1772. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.10.048.
- [13] E. Öz, G. Kaban, Ö. Barış, M. Kaya, Isolation and identification of lactic acid bacteria from pastirma, *Food Control* 77 (2017) 158-162. doi: 10.1016/j.foodcont.2017.02.017.
- [14] A. B. Benavides, M. Ulcuango, L. Yépez, G. N. Tenea, Assessment of the *in vitro* bioactive properties of lactic acid bacteria isolated from native ecological niches of Ecuador, *Rev. Argent. Microbiol.* 48(3) (2016) 236-244. doi: 10.1016/j.ram.2016.05.003.
- [15] I. Trabelsi, S.B. Slima, H. Chaabane, B.S. Riadh, Purification and characterization of a novel exopolysaccharides produced by *Lactobacillus* sp. Ca6, *Int. J. Biol. Macromol.* 74 (2015) 541–546. doi:10.1016/j.ijbiomac.2014.12.045.
- [16] Y. Wang, P-Y. Quian, Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies, *PloS one* 4 (10) (2009) 1-9. doi: 10.1371/journal.pone.0007401
- [17] J. Caporaso, C. Lauber, W. Walters, D. Berg-Lyons, C. Lozupone, P. Turnbaugh, N. Fierer, R. Knight, Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108 (2011) 4516-4522. doi:10.1073/pnas.1000080107.
- [18] ISO/11292, Instant coffee: Determination of free and total carbohydrate contents. Method using high performance anion-exchange chromatography (1995).

- [19] N.C. Saravanan, P.K.H. Shetty, Isolation and characterization of exopolysaccharide from *Leuconostoc lactis* KC117496 isolated from idli bater, *Int. J. Biol. Macromol.* 90 (2016) 100–106. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.02.007.
- [20] J. Wang, X. Zhao, Y. Yang, A. Zhao, Z. Yang, Characterization and bioactivities of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW32, *Int. J. Biol. Macromol.* 74 (2015) 119–126. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2014.12.006.
- [21] H. Xing, R. Du, F. Zhao, Y. Han, H. Xiao, Z. Zhou, Optimization, chain conformation and characterization of exopolysaccharide isolated from *Leuconostoc mesenteroides* DRP105, *Int. J. Biol. Macromol.* 112 (2018) 1208–1216. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.02.068.
- [22] S. Patel, D. Kothari, A. Goyal, Purification and characterization of an extracellular dextran sucrose from *Pediococcus pentosaceus* isolated from the soil of northeast India, *Food Technol. Biotechnol.* 49 (3) (2011) 297-303.
- [23] I. Han, F. Hang, B. Guo, Z. Liu, C. You, Z. Wu, Dextran synthesized by *Leuconostoc mesenteroides* BD1710 in tomato juice supplemented with sucrose, *Carbohydr. Polym.* 112 (2014) 556–562. doi: 10.1016/j.carbpol.2014.06.035.
- [24] D. Kavitate, P.B. Devi, S.P. Singh, P.H. Shetty, Characterization of a novel galactan produced by *Weissella confusa* KR780676 from an acidic fermented food, *Int. J. Biol. Macromol.* 86 (2016) 681-689. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.01.099.
- 1.6.5.1** [25] E.M. Paulo, E.F. Boffo, A. Branco, A.M.M.P. Valente, I.S. Melo, A.G. Ferreira, M.R.A. Roque, S.A. De Assis, Production, extraction and characterization of exopolysaccharides produced by the native *Leuconostoc pseudomesenteroides* r2 strain, *An. Acad. Bras. Ciênc.* 84(2) (2012) 495-507. doi: 10.1590/S0001-37652012000200018.

- [26] Q. Zhou, F. Feng, Y. Yang, F. Zhao, R. Du, Z. Zhou, Y. Han, Characterization of a dextran produced by *Leuconostoc pseudomesenteroides* XG5 from homemade wine, *Int. J. Biol. Macromol.* 107 (Part B) (2018) 2234–2241. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.10.098.
- [27] Y.P. Yang, Q. Peng, Y.Y. Guo, Y. Han, H.Z. Xiao, Z.J. Zhou, Isolation and characterization of dextran produced by *Leuconostoc citreum* NM105 from manchurian sauerkraut, *Carbohyd. Polym.* 133 (2015) 365–372. doi: 10.1016/j.carbpol.2015.07.061.
- [28] Z. Ahmed, Y. Wang, N. Anjum, A. Ahmad, S.T. Khan, Characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir - Part II, *Food Hydrocol.* 30 (1) (2013) 343–350. doi: 10.1016/j.foodhyd.2012.06.009.
- [29] M. Miao, Y. Ma, C. Huang, B. Jiang, S.W. Cui, T. Zhang, Physicochemical properties of a water soluble extracellular homopolysaccharide from *Lactobacillus reuteri* SK24.003, *Carbohyd. Polym.* 131 (2015) 377–383. doi: 10.1016/j.carbpol.2015.05.066.
- [30] K.V. Sajna, R.K. Sukumaran, L.D. Gottumukkala, H. Jayamurthy, K.S. Dhar, A. Pandey, Studies on structural and physical characteristics of a novel exopolysaccharide from *Pseudozyma* sp. NII 08165, *Int. J. Biol. Macromol.* 59 (2013) 84–89. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2013.04.025
- [31] Y. Wang, C. Li, P. Liu, Z. Ahmed, P. Xiao, X. Bai, Physical characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* KF5 isolated from Tibet Kefir, *Carbohyd. Polym.* 82(3) (2010) 895–903. doi: 10.1016/j.carbpol.2010.06.013.
- [32] J. Wang, X. Zhao, Z. Tian, Y. Yang, Z. Yang, Characterization of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW11 isolated from Tibet Kefir, *Carbohyd. Polym.* 25 (2015) 16–25. doi: 10.1016/j.carbpol.2015.03.003.

- [33] J.-W. Shen, C.-W. Shi, C.-P. Xu, Exopolysaccharides from *Pleurotus pulmonarius*: fermentation optimization, characterization and antioxidant activity, *Food Technol. Biotechnol.* 51(4) (2013) 520–527.

CAPÍTULO V ⁴

⁴ Artigo submetido na Revista **LWT - Food Science and Technology**.

Fernanda Silva Farinazzo ^{a*}, Maria Thereza Carlos Fernandes ^a, Carolina Saori Ishii Mauro ^a, Sandra Helena Prudêncio ^a, Sandra Garcia ^a

^a Department of Food Science and Technology, Center of Agricultural Sciences, State University of Londrina, Celso Garcia Cid Highway - PR Route 445, Km 380, P.O. Box 10011, Zip Code 86.057-970, Londrina, Brazil.

*Corresponding author: E-mail address: fsfarinazzo@gmail.com (F. S. Farinazzo)

Techno-functional properties of a dextran produced by *Leuconostoc pseudomesenteroides* JF17 from juçara palm fruit (*Euterpe edulis* Martius)

Abstract

The present study aimed to contribute to the technical-functional knowledge about a dextran produced by *L. pseudomesenteroides* JF17. For this, its physical-chemical, rheological, water and oil holding, emulsifying and texture properties were evaluated. Dextran-JF17 consisted mainly of carbohydrates ($87.87 \pm 1.45\%$, w/w), with $48.86 \pm 1.2\%$ (w/w) soluble fibers, in addition to low protein content ($2.98 \pm 0.49\%$, w/w). It had a high water retention capacity ($470.89 \pm 39.67\%$, w/v) and oil ($89.945 \pm 4.16\%$, w/v) in comparison with other microbial EPS already studied. Dextran-JF17 solutions (0.5, 1.0% and 2.0%, w/v) showed typical pseudoplastic non-Newtonian fluid behavior. Regarding its emulsion properties, dextran-JF17 had a higher emulsion capacity (26.73 ± 0.31 mL of oil/g dextran) than guar gum (15.45 ± 1.33 mL oil/gum), in addition to presenting emulsion activity values of approximately 65% (w/v) in 24 h, indicating a strong emulsion stabilization capacity. The viscous solution of dextran-JF17 showed cohesiveness and springiness similar to those reported for guar gum gel. Overall, these results suggest that dextran-JF17 is a good candidate for application in the food and pharmaceutical industries as a viscosifying, stabilizing and emulsifying agent.

Keywords: Exopolysaccharide, Biopolymer, Viscosity, Emulsifier, Rheology

1. Introduction

Lactic acid bacteria (LAB) are members of various ecosystems, displaying dynamic interactions within animal and plant kingdoms (George et al., 2018). Thus, LAB can be found naturally in the plant and fruit microbiota, as in juçara palm (*Euterpe edulis* Martius). This palm, native to the Atlantic Forest, is an important species for the ecosystem and its fruits provide a sustainable alternative for the use of the tree (Chaimsohn & Chiquetto, 2013), in addition, its microbiota has LAB capable of producing a bioactive exopolysaccharide (EPS) (Farinazzo et al., 2020).

EPS is an extracellular biopolymer of long chain and high molecular weight produced during the metabolic process of microorganisms (Ye, Liu, Wang, Wang, & Zhang, 2012). EPS has distinct structural characteristics, which implies physical-chemical properties that define their technological applications, such as water retention agents, gelling agents, emulsifiers, stabilizers and texture intensifiers (Hussain et al., 2017). Bacterial polysaccharides have some advantages in industry, as most show higher water solubility compared to plant gums, such as guar gum, locust bean gum, and also exhibit better viscosifying, thickening, stabilizing, gelling and emulsifying activities (Han et al., 2015).

The EPS produced by LAB are receiving increasing attention because of the generally regarded as safe status (GRAS) (Devi, Kavitate, & Shetty, 2016). LAB produces a wide variety of EPS qualities, and its synthesis has been studied in *Leuconostoc* (Xing et al., 2018), *Lactobacillus* (Dilna et al., 2015) and *Bifidobacterium* (Inturri et al., 2017). *Leuconostoc* species produce dextrans, homopolysaccharides that contain only one type of monomer, glucose, which may have linkages α -glucan with α -(1 \rightarrow 6), mutan with α -(1 \rightarrow 3) and alternan with α -(1 \rightarrow 6) and α -(1 \rightarrow 3) (Majumder & Goyal, 2009). In our previous studies, a microbial dextran produced by *Leuconostoc pseudomesenteroides* JF17 was identified and isolated. This

biopolymer was a α -glucan with α -(1 \rightarrow 6) linkages, with excellent thermal stability and high antioxidant activity (Farinazzo et al., 2020).

To expand the perspectives on technological application, it is necessary to better study the newly discovered dextran produced by *L. pseudomesenteroides* JF17 isolated from juçara fruits in our previous studies (Farinazzo et al., 2020). Therefore, this work aimed to evaluate the physical-chemical, rheological, water and oil holding, emulsifying and textural properties of dextran-JF17 produced by *L. pseudomesenteroides* JF17 and evaluate its potential in food applications.

2. Material and methods

2.1. Microorganism and culture conditions

L. pseudomesenteroides JF17 (GenBank: MN756802) with high EPS yield, isolated from juçara palm fruits, was used as an EPS-producing strain characterized as a dextran (Farinazzo et al., 2020). Briefly, strain JF17 was grown in previously optimized EPS production using MRS broth (Merck, Germany) supplemented with 18% (w/v) sucrose, initial pH 7.3 at 20 °C for 48 h and static conditions (Novatecnica[®] Incubator, Brazil). The strain was kept at -80 °C in 20% (v/v) glycerol. Juçara fruit and *L. pseudomesenteroides* JF17 are protected by genetic heritage with registration A701C5B and A02124C, respectively.

2.2. Production and purification of the dextran

A novel microbial dextran was produced by *L. pseudomesenteroides* JF17 and identified in our laboratory as previously described by Farinazzo et al. (2020). For purification, the freeze-dried crude dextran was dissolved in distilled water and dialyzed using a 12 kDa cellulose membrane (Sigma) against deionized water for 48 h with water change every 12 h. After this

process, the dextran was lyophilized (Freeze-dried L101 – Liobras, Brazil) and used for further analysis (Dilna et al., 2015).

2.3. Physicochemical analysis of dextran

The moisture, ash, protein, lipid and dietary fiber contents of dextran-JF17 were determined according to the AOAC method (AOAC, 2000). The total carbohydrate content of dextran was determined by the phenol–sulfuric acid method, using glucose as a standard (Dubois, Gilles, Hamilton, Rebers, & Smith, 1956). Dextran color was determined using a colorimeter (Minolta[®], model CR400, Osaka, Japan). The pH (1% solution at 25 °C) was measured using a digital potentiometer (Hanna[®] instrument, Romania).

2.4. Rheological properties in aqueous solution

The rheological behavior of dextran-JF17 was compared with commercial guar gum (Durga Enterprises, India), approved in most areas of the world (FAO, 2008). The study was conducted with a Brookfield digital rheometer (Brookfield DV-III, Stoughton, Massachusetts, USA) using Rheocalc V33 software (Brookfield, Middleboro, USA). The dynamic viscosity of different solutions was measured at 25 °C with 40 to 100 rpm and a SC4-31 spindle for concentrations of dextran-JF17 0.5, 1.0 and 2.0%, (w/v) and guar gum 0.5%, w/v; also with 4 to 10 rpm and SC4-25 spindle for 1.0 and 2.0% (w/v) guar gum concentrations. The shear stress, shear rate and apparent viscosity were collected every 45 s, preceded by 45 s of previous stabilization (totaling 3 min). The consistency index (K) and the flow behavior index (n) were determined from the Ostwald-De-Waele model (Power Law) Eq. (1).

$$\tau = K \cdot \dot{\gamma}^n \quad (1)$$

where τ is the shear stress (mPa), $\dot{\gamma}$ is the shear rate (1/s), K is the consistency index parameter (mPa/s) and n is the flow behavior index (dimensionless).

2.5. Water and oil holding capacity

Water holding capacity (WHC) of dextran-JF17 and guar gum were determined by following the procedure of Lobo, Gómez, Valdez, & Torino (2019). Dextran or guar gum (40 mg) was diluted in 2 mL of deionized water with a vortex mixer. The dissolved material was centrifuged at $16000 \times g$ for 25 min, and the unbound water, was discarded. All biopolymer was discarded on filter paper for complete drainage of water, and the weight of precipitated dextran or gum was recorded. The percentage of WHC was calculated using Eq. (2):

$$\text{WHC (\%)} = \text{Water absorbed weight (g)} / \text{Initial biopolymer weight (g)} \times 100 \quad (2)$$

The oil holding capacity (OHC) was calculated in a similar manner by adopting the method of Insulkar, Kerkar, & Lele (2018). For the purpose, soybean oil was used as dispersing media.

2.6. Emulsifying capacity

The emulsifying capacity (EC) was determined according to the method described, with modifications, by Gurov, Mukhin, Larichev Lozinskaya, & Tolstoguzov (1983). Dextran-JF17 or guar gum (1 g) was homogenized in 10 mL of distilled water, in which soybean oil (nonpolar phase) was added at a flow rate of 3.5 mL/min by titration and mixed with an Ultra-Turrax[®] Tube Drive (IKA[®] Brazil) shaker at speed 6,000 rpm. The phase inversion point was determined by a sharp fall of the electric conductivity recorded. The emulsifying capacity was calculated as the amount of emulsified oil per gram of sample (mL/g).

2.7. Emulsifying activity

Briefly, 3 mL of soybean oil was added to 2 mL of a dextran aqueous solution (1.0 %, w/v) or gum in a test tube (100 mm x 13 mm) and stirred in the vortex at 50 Hz (Labnet's Vortex Mixer VX-200) for 2 min. The mixture was preserved at 25 °C for 0, 1, 24 and 168 h, and the emulsifying activity (EA₁, EA₂₄ and EA₁₆₈) was calculated according to Eq. (3) (Yang et al., 2018):

$$EA_1, EA_{24}, EA_{168} \text{ or } EA_{360} = (\text{Emulsion volume} / \text{Total volume}) \times 100 \quad (3)$$

2.8. Optical microscope evaluation of emulsions

A 50 µL volume of the emulsion (1.0% w/v, dextran-JF17 or guar gum) formed at zero storage time at 25 °C was examined and photographed through a 40× objective lens of light microscope (K55-BA, Olen[®] Brazil).

2.9. Instrumental texture profile analysis

Samples, dextran-JF17 or guar gum, of 50 g (2.0%, w/v) were prepared in distilled water at 80 °C with stirring for 10 min. These were then transferred to 50 mL glass containers, adjusting the height of the hydrocolloid to approximately 30 mm and cooling to 25 °C for 24 h (De Oliveira, Amaral, & Burkert, 2018). After, the samples were submitted to TPA, using a TA-XT Plus texture analyzer (Stable Micro Systems, Surrey, United Kingdom), equipped with a 25 mm diameter cylindrical probe, with the following experimental conditions: pretest speed 2.0 mm/s; test speed 2.0 mm/s; posttest speed 2.0 mm/s; 6 mm penetration and a 5 s rest period between the two cycles; trigger force of 0.05 N. Parameters such as hardness, adhesiveness, springiness, cohesiveness and gumminess, were estimated.

2.10. Statistical analysis

The data were expressed as the mean \pm SD and analyzed statistically by the one-way ANOVA procedure of Statistica software (version 10.0). The differences between the means were detected by Tukey's post hoc test with a 5% significance level.

3. Results and discussion

3.1. Physicochemical analysis of dextran

After purification, the dextran produced by *L. pseudomesenteroides* JF17 presented relatively low moisture ($5.63 \pm 0.08\%$, w/w), showing efficiency in the lyophilization process and an ash content of $2.79 \pm 0.00\%$ (w/w) (Table 1). Low protein content ($2.98 \pm 0.49\%$ w/w) was found for dextran-JF17 (Table 1) indicating that there was efficacy in the methods of preparation and purification adopted. The protein content found is close to that reported for the EPS produced by *Bacillus amyloliquefaciens* LPL061 (1.9%) (Han et al., 2015). However, it is lower than that found in EPS studies produced by *Lactobacillus helveticus* MB2-1 and *Mesorhizobium loti* Semia 816, which show contents of 4.08% and 11.31%, respectively (Li et al., 2014; De Oliveira et al., 2018). These differences may be due to the different techniques used for isolation and purification of EPS in different studies. Furthermore, no lipid content was found for JF17 dextran, which reinforces the efficiency of the purification.

The total carbohydrate content in dextran-JF17 was $87.87 \pm 1.45\%$ (w/w), with $52.90 \pm 0.15\%$ (w/w) of total fibers, $48.86 \pm 1.2\%$ (w/w) of soluble fibers and $4.04 \pm 0.98\%$ of insoluble fibers (Table 1). High carbohydrate content from EPS by LAB has been documented by several researchers (Han et al., 2015; Trabelsi et al., 2018). The high content of soluble fibers agrees with the ability of dextran-JF17 to dissolve in water due to its highly linear structure (Farinazzo et al., 2020).

An average pH of 5.72 ± 0.15 was recorded for 1% dextran-JF17 solution at 25 °C. Dextran-JF17 presented a high lightness value, $L^* = 80.24 \pm 1.07$, while a^* and b^* were recorded at 4.57 ± 0.37 and 18.94 ± 0.70 , respectively (Table 1). These results induced a yellowish color, therefore, its incorporation in food could affect the color of the final product (Trabelsi et al., 2018).

Table 1. Physicochemical properties of the dextran-JF17 produced by *L. pseudomesenteroides* JF17

Physicochemical composition	Dextran-JF17 (Mean \pm SD)
Moisture (%)	5.63 ± 0.08
Ash (%)	2.79 ± 0.00
Proteins (%)	2.98 ± 0.49
Lipids (%)	ND
Total carbohydrates (%)	87.87 ± 1.45
Total fiber (%)	52.90 ± 0.15
Soluble fiber (%)	48.86 ± 1.2
Insoluble fiber (%)	4.04 ± 0.98
pH (1% w/v, solution at 25 °C)	5.72 ± 0.15
Color: a^* = redness	4.57 ± 0.37
b^* = yellowness	18.94 ± 0.70
L^* = Lightness	80.24 ± 1.07

Data are means \pm SD of triplicates. ND, not detected

3.2. Rheological properties

As shown in Fig. 1, the viscosity versus shear rate curves were characterized by further increases in the shear rate as a decrease in viscosity occurred. The highest viscosity values (106.48 mPa.s) for dextran-JF17 were obtained at the lowest shear rate (13.6/s) at 2.0% (w/v) aqueous concentration (Fig 1 a). Thus, for all tested concentrations, the dextran solutions showed non-Newtonian behavior framed as a pseudoplastic fluid, where the viscosity decreased with the increase in the shear rate. The same characteristics were observed for guar gum (Fig. 1 b). In general, the behavior of a polysaccharide in a solution corresponds to that of a pseudoplastic fluid (De Oliveira et al., 2018). Other authors have also identified that dextran produced by microorganisms, such as *Leuconostoc pseudomesenteroides* XG5 and *Leuconostoc dextranicum* NRRL B-1146 had pseudoplastic behavior (Majumder & Goyal, 2009; Zhou et al., 2018). As shown in Fig. 1, at concentrations of 2.0%, 1.0% and 0.5% (w/v) the apparent viscosity of guar gum was the highest followed by dextran-JF17 2.0%, 1, 0% and 0.5% (w/v). With the increase in the concentration of the polymer, the molecules overlap, inducing the formation of intermolecular interaction and, hence, limiting polymer chain arrangement and stretching, this consequently leads to increased viscosity (Freitas et al., 2009).

The Ostwald-De-Waele model (Power Law) is widely used to describe the rheological behavior of pseudoplastic fluids. The model parameter is shown in Table 2. Dextran-JF17 and commercial guar gum presented values of n less than 1 (0.45-0.95), confirming the pseudoplastic behavior. Moosavi-Nasab, Alahdad, & Nazemi (2009) showed that the viscosity of the dextran produced by *L. mesenteroides* NRRL B512 at different concentrations decreased with increasing shear rate, which is a typical characteristic of a pseudoplastic fluid. In addition, k increased with increasing dextran concentration, from 16.82 ± 4.86 to 43.07 ± 5.46 , to 1.5 and 10% (w/v) dextran, respectively, as also reported in this work for dextran-JF17 (Table 2).

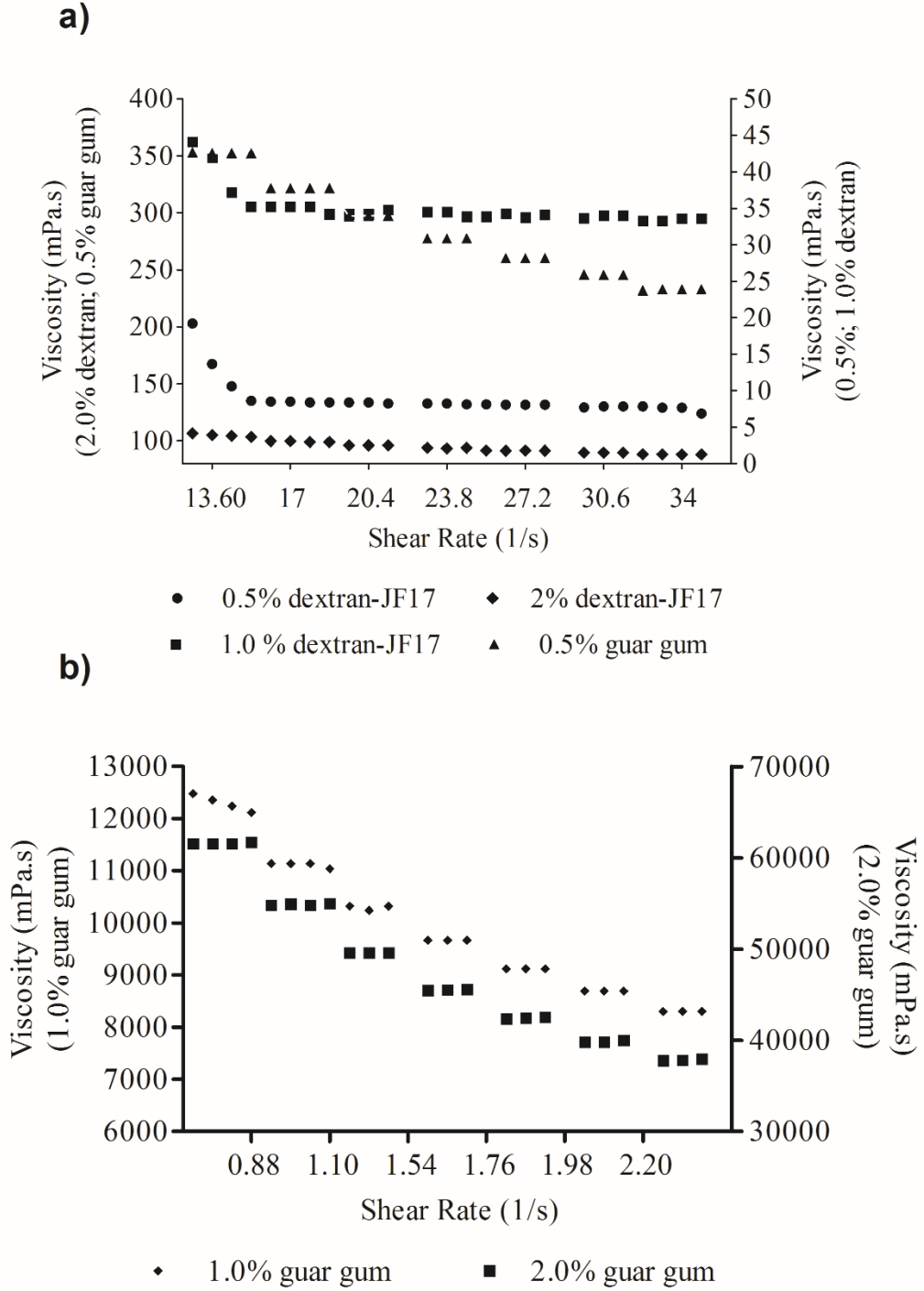
From the point of view of the development of food products, this pseudoplastic property of the dextran produced by *L. pseudomesenteroides* JF17 is important for producing good sensory properties, as swallowing and during food processing operations, such as mixing and pumping. Polysaccharides with pseudoplastic behavior are suitable for the manufacture of various food products including sauces, dairy products, cake and salad dressing. (Han et al., 2014).

Table 2. Effect of various concentrations of aqueous solutions of dextran-JF17 and commercial guar gum on the rheological parameters

	Concentration (% w/v)	K (mPa)	N	(R ²)
Dextran-JF17	0.5	10.01	0.93	0.99
	1.0	39.79	0.95	0.99
	2.0	169.43	0.81	0.99
Guar gum	0.5	1156.80	0.55	0.99
	1.0	11581.00	0.56	0.98
	2.0	57470.00	0.45	0.98

Flow behavior index, n , and consistency index, K , were obtained by the Ostwald-de-Waele model

Fig. 1. Viscosity as a function of the shear rate of aqueous solutions, including 0.5, 1.0, 2.0 % dextran-JF17 and 0.5 % commercial guar gum (A), and 1.0, 2.0 % commercial guar gum (B)



3.3. Water and oil holding capacity

The WHC for dextran was significantly higher ($p < 0.05$) ($470.89 \pm 39.67\%$, w/v) when compared to the WHC for guar gum ($290.87 \pm 9.62\%$, w/v) ($p < 0.05$) (Table 3). The WHC for dextran-JF17 is close to that previously reported for dextran produced by *Leuconostoc lactis* KC117496 ($509.45 \pm 28.59\%$) (Zhao et al., 2019) and *W. cibaria* JAG8 (352%) (Tingirikari, Kothari, & Goyal, 2014). The particle structure and the low moisture content of the polymer significantly influenced the hydrocolloid hydration properties. The high WHC of dextran-JF17 may be linked to the microstructure of the porous polymer, which can retain large amounts of water molecules (Farinazzo et al., 2020). These results indicated that dextran-JF17 exhibited excellent hydrophilicity and ability to retain water, showing promising potential to improve the textural and rheological properties of food products.

Table 3. Technical-functional properties of dextran-JF17 and commercial guar gum

Properties	Dextran-JF17	Guar gum
Water holding capacity (%)	$470.89^a \pm 39.67$	$290.87^b \pm 9.62$
Oil holding capacity (%)	$89.94^a \pm 4.16$	$107.82^a \pm 11.80$
Emulsifying capacity (mL/g)	$26.73^a \pm 0.31$	$13.50^b \pm 1.52$

Data are means \pm SD of triplicates and alphabet letters indicate the same letters in the same line are not statistically significantly different according to Turkey test ($p < 0.05$).

In the analysis of the OHC, dextran-JF17 showed a remarkable oil holding capacity ($89.95 \pm 4.16\%$, w/v), which was significantly equal ($p < 0.05$) to that of guar gum ($107.82 \pm 11.80\%$, w/v) ($p < 0.05$) (Table 3). However, the OHC presented by dextran-JF17 is higher than that reported for EPS produced by *Weissella confusa* KR780676 (5.1%) (Devi et al., 2016) and *Lactobacillus* sp. Ca6 (15.9%) (Trabelsi et al., 2018). OHC refers to the adsorption of organic

compounds on the surface of the substrates and is more closely related to the porosity of the fiber structure than to the affinity of the fiber molecule for oil (Biswas, Kumar, Bhosle, Sahoo, & Chatli, 2009). OHC for dextran-JF17 was quite significant compared to an already commercial gum; thus, it can also be an option for use in food applications where structural interaction and absorption by fat occurs, mainly in flavor retention, better palatability and prolonged shelf life (Gan et al., 2020).

3.4. Emulsifying capacity (EC)

The dextran-JF17 obtained by the metabolism of *L. pseudomesenteroides* had an EC of 26.73 ± 0.31 mL of oil/g dextran, higher than that found for commercial guar gum, 13.50 ± 1.52 mL oil/gum ($p < 0.05$) (Table 3). It is known that microbial and vegetable gums, as well as some vegetable and animal proteins, have lipid emulsifying effect. Guar gum, although of a highly hydrophilic nature, reduces the surface tension of water and adsorbs on the oil-water interfaces, reducing its interfacial tensions (Garti & Reichman, 1994).

The EC of an EPS can be attributed to certain functional groups in the biopolymer, which provide hydrophobicity to the EPS and subsequently contribute to its EC (Maalej et al., 2016). The dextran-JF17 consists of glucose molecules and can be considered a polar structure (Farinazzo et al., 2020); moreover, it still has approximately 3% protein, possibly covalently linked to this molecular arrangement, which can contribute to its EC. Other commercial gums, such as acacia gum, have EC (30.5 ± 2.86 mL oil/gum - data not shown) attributed to a glycoprotein fraction. The hydrophobic portion adsorbs strongly on the surface of the oil droplets, while the hydrophilic branches limit the aggregation and coalescence of the droplets by steric and/or repulsive electrostatic forces (Desplanques, Renou, Grisel, & Malhiac, 2012).

3.5. Emulsifying activity (EA)

After 1, 24 and 168 h, the emulsions of dextran-JF17 or guar gum (1%, w/v) in soybean oil were compared for their stability, and the results are shown in Table 4. Dextran-JF17 had an EA $65.44 \pm 1.09\%$ (w/v) after 1 h, and a significant drop ($p < 0.05$) was observed only after 168 h of storage at 25 °C ($52.64 \pm 0.65 \%$, w/v). The same trend was observed for guar gum, which showed a significant drop in 168 h ($43.44 \pm 1.41\%$, w/v). The EA of an EPS can be measured by its ability to retain a hydrocarbon emulsion in water. In addition to increasing the emulsion viscosity, EPS can form a stable emulsion film and prevents the emulsion droplets from coalescing (Paximada, Tsouko, Kopsahelis, Koutinas, & Mandala, 2016). For a compound to be a stable emulsifier, it must retain at least 50% of the emulsion after its formation (Gan et al., 2020); thus, dextran-JF17 was more stable than guar gum, as this later had a lower EA in 168 h of storage, so dextran-JF17 can be considered a good emulsion stabilizing agent.

Table 4. Emulsification activity of dextran-JF17 or commercial guar gum (1.0 % w/v, aqueous solutions) at different time intervals.

Emulsification activity (%)	Dextran-JF17	Guar gum
EA ₀	100 ^{Aa} \pm 0.00	100 ^{Aa} \pm 0.00
EA ₁	65.44 ^{Ba} \pm 1.09	58.50 ^{Ba} \pm 2.12
EA ₂₄	62.27 ^{Ba} \pm 0.56	56.20 ^{Ba} \pm 2.40
EA ₁₆₈	52.64 ^{Cb} \pm 0.65	43.44 ^{Ca} \pm 1.41

The mean values (\pm SD) of triplicates within the same column that do not share the same common capital letters differ significantly ($p < 0.05$). Different lowercase letters indicated significant differences in data on one line ($p < 0.05$). EA₀, EA₁, EA₂₄ and EA₁₆₈: emulsification index after 0, 1, 24 and 168 h, respectively.

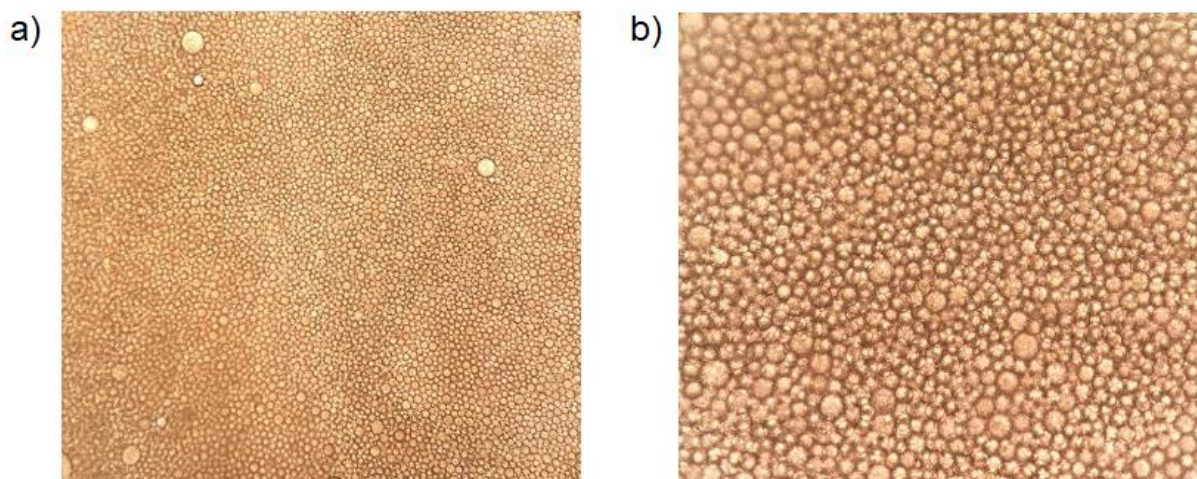
The surface activity of the polysaccharides that contributes to the stability of the emulsion can be attributed to the presence of hydrophobic groups for molecular bonding at the oil interface and the structure of the chain to sterically stabilize the oil droplets (Kpodo, Agbenorhevi, Alba, & Kontogiorgos, 2020). The dextrans produced by *L. pseudomesenteroides* YF32 and *Leuconostoc citreum* N21 had emulsifying activities in sunflower oil of 67.25 and $66.7 \pm 0.87\%$, respectively, after 1 h, with a slight drop to 64.36 and $63.4 \pm 0.92\%$ in 24 h. (Yang et al., 2018; Yang et al., 2019), values close to those found in this study.

3.6. Microscope evaluation of emulsions

Fig. 2 shows typical micrographs for emulsions prepared with dextran-JF17 and commercial guar gum. The emulsion prepared with dextran from *L. pseudomesenteroides* JF17 was different from the emulsion of guar gum. Smaller, densely compacted and uniformly distributed droplets were observed in the emulsion prepared with dextran-JF17, while larger droplets were observed in the emulsion prepared with guar gum. The emulsion droplet size is considered an important parameter that determines physical stability, such as flocculation and creaminess rate of different emulsions (Kim, Morr, & Schenz, 1996).

The emulsion prepared with dextran had a smaller droplet size, where most of the particles were smaller than $8 \mu\text{m}$ (Fig 2 a), while the guar gum varied from 10 to $37 \mu\text{m}$ (Fig 2 b). Han et al. (2015) reported that the drops of an emulsion prepared with 1% EPS of *Bacillus amyloliquefaciens* LPL061 were smaller than $7 \mu\text{m}$, while guar gum ranged from 1 to $58 \mu\text{m}$. Smaller drops of oil can result in more stable emulsions. Therefore, these results reveal that dextran-JF17 has the potential to be used as emulsifiers in the food industry.

Fig. 2. Photomicrographs of emulsions prepared with 1 % (w/v) of (a) dextran-JF17, (b) guar gum (40 ×) with soybean oil.



3.7. TPA

From the force-deformation curves, the attributes of hardness, adhesiveness, springiness, cohesiveness and gumminess were calculated (Table 5). At a concentration of 2% (w/v aqueous solution) dextran-JF17 did not form a gel, only viscous solution. This probably interfered so that some studied texture parameters were significantly different than those observed for guar gum gel (2% w/v).

The viscous solution of guar gum had a hardness 1.98 times higher than that of the dextran-JF17 biopolymer, indicating that the structure of guar gum gel showed higher resistance to compression (Table 5). Adhesiveness and gumminess were also 16.50 times and 1.78 times higher, respectively, for guar gum gel. However, the parameters of springiness and cohesiveness were similar for both biopolymers ($p > 0.05$). Devi et al. (2016) found that the 2 % (w/v) galactan solution by *Weissella confusa* KR780676 had a hardness of 9.88 g, springiness of 1.00, cohesiveness of 0.46 and gumminess of 4.54, approximate values to those reported in this study.

Texture is one of the organoleptic attributes that determines the palatability of food. Almost all types of processed food products can be manipulated to modify their texture through the addition of hydrocolloids (Li & Nie, 2016). Studies have shown that the addition of EPS can positively affect the physical and textural properties of products such as yogurt, bread and fermented sausage, in addition to improving the sensory characteristics of the final product (Yang et al., 2014; Dertli et al., 2016; Wang et al., 2020).

Table 5. Textural properties of viscous solution of dextran-JF17 (2% w/v) and guar gum gel (2% w/v)

	Parameters				
	Hardness (g)	Adhesiveness (g.s)	Springiness	Cohesiveness	Gumminess
Dextran-JF17	8.60 ^b ±0.53	-1.14 ^b ±0.14	1.08 ^a ±0.34	0.95 ^a ±0.20	8.28 ^b ±2.27
Guar gum	17.08 ^a ±0.84	-18.81 ^a ±1.96	0.94 ^a ±0.04	0.86 ^a ±0.04	14.75 ^a ±1.37

Data are means ± SD of triplicates

Different lowercase letters in the same column indicate that there is a significant difference at 95% confidence level. *(p < 0.05).

4. Conclusion

Dextran-JF17 produced by *L. pseudomesenteroides* consisted mainly of carbohydrates, with approximately 40 % soluble fibers. It had a high water and oil retention capacity compared to other microbial EPS. The dextran biopolymer maintained an EA close to 65 % in 24 h and was able to stabilize the emulsions in soybean oil. In addition, it had a higher EC than commercial guar gum. Dextran-JF17 had lower viscosity compared to guar gum, but both polymers showed non-Newtonian pseudoplastic behavior. The parameters of texture, cohesiveness and elasticity were similar both in viscous solution of dextran-JF17 and gel of guar gum, in the studied aqueous concentration of 2% (w/v). These factors, combined, make

dextran-JF17 a suitable biopolymer for a viscosity, stabilizing and emulsifying agent in the food and pharmaceutical industries.

Acknowledgements

This research was supported by the Londrina State University, National Council of Technological and Scientific Development (CNPq) and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES).

References

- AOAC, Official Method of Analysis of AOAC International, 17th ed. Association official Analytical Communities, Arlington, VA, USA, 2000.
- Biswas, A. K., Kumar, V., Bhosle, S., Sahoo, J., & Chatli, M. K. (2009). Dietary fiber as functional ingredients in meat products and their role in human health. *International Journal of Livestock Production*, 2, 45–54.
- Chaimsohn, F.P., & Chiquetto, N.C. (2013). Construção do marco legal para a produção de açaí de juçara: contribuições da “oficina interestadual sobre legislação, comercialização e marketing para exploração de frutos da palmeira juçara. *Revista Conexão UEPG*, 9 (2), 244–253.
- De Oliveira, J. M., Amaral, S. A., & Burkert, C. A. V. (2018). Rheological, textural and emulsifying properties of an exopolysaccharide produced by *Mesorhizobium loti* grown on a crude glycerol-based medium. *International Journal of Biological Macromolecules*, 120, Part B, 2180-2187.
- Dertli, E., Yilmaz, M. T., Tatlisu, N. B., Toker, O. S., Cankurt, H., & Sagdic, O. (2016). Effects of in situ exopolysaccharide production and fermentation conditions on physicochemical,

- microbiological, textural and microstructural properties of Turkish-type fermented sausage (sucuk). *Meat Science*, 121, 156–165.
- Desplanques, S., Renou, F., Grisel, M., & Malhiac, C. (2012) Impact of chemical composition of xanthan and acacia gums on the emulsification and stability of oil-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, 27, 401-410.
- Devi, P. B., Kavitha, D., & Shetty, P. H. (2016). Physico-chemical characterization of galactan exopolysaccharide produced by *Weissella confusa* KR780676. *International Journal of Biological Macromolecules*. 93, 822–828.
- Dilna, S. V., Surya, H., Aswathy, R. G., Varsha, K. K., Sakthikumar, D. N., Pandey, A., & Nampoothiri, K. M. (2015). Characterization of an exopolysaccharide with potential health-benefit properties from a probiotic *Lactobacillus plantarum* RJF4. *LWT - Food Science and Technology*, 64, 1179-1186.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356.
- FAO (2008). *Guar Gum Chemical and Technical Assessment*. Report of 69th JECFA - Chemical and Technical Assessment (CTA), Rome, Italy. Available in: <http://www.fao.org/3/a-at962e.pdf>.
- *Farinazzo, F. S., Valente, L. J., Almeida, M. B., Simionato, A. S., Fernandes, M. T. C., Mauro, C. S. I., Tomal, A. A. B., & Garcia, S. (2020). Characterization and antioxidant activity of an exopolysaccharide produced by *Leuconostoc pseudomesenteroides* JF17 from juçara fruits (*Euterpe edulis* Martius). *Process Biochemistry*, 91, 141–148.
- Freitas, F., Alves, V. D., Carvalheira, M., Costa, N., Oliveira, C., Reis, M. A. M. (2009). Emulsifying behaviour and rheological properties of the extracellular polysaccharide

produced by *Pseudomonas oleovorans* grown on glycerol byproduct. *Carbohydrate Polymers*, 78, 549–556.

Gan, L., Li, X., Zhang, H., Zhang, R., Wang, H., Xu, Z., Peng, B., & Tian, Y. (2020). Preparation, characterization and functional properties of a novel exopolysaccharide produced by the halophilic strain *Halomonas saliphila* LCB169T. *International Journal of Biological Macromolecules*, 156, 372–380.

Garti, N. & Reichman, D. (1994). Surface properties and emulsification activity of galactomannans. *Food Hydrocolloids*, 8 (2), 155-173.

George, F., Daniel, C., Thomas, M., Singer, E., Guilbaud, A., Tessier, F.J., Revol-Junelles, A-M., Borges, F., & Foligné, B. (2018). Occurrence and Dynamism of Lactic Acid Bacteria in Distinct Ecological Niches: A Multifaceted Functional Health Perspective. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2899.

*Gurov, A. N., Mukhin, M. A., Larichev, N. A., Lozinskaya, N. V., & Tolstoguzov, V. B. (1983). Emulsifying properties of proteins and polysaccharides I. Methods of determination of emulsifying capacity and emulsion stability. *Colloids and Surfaces*, 6 (1), 35-42.

*Han, Y., Liu, E., Liu, L., Zhang, B., Wang, Y., Gui, M., Wu, R., & Li, P. (2015). Rheological, emulsifying and thermostability properties of two exopolysaccharides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* LPL061. *Carbohydrate Polymers* 115, 230–237.

Han, P. P., Sun, Y., Wu, X. Y., Yuan, Y. J., Dai, Y. J., & Jia, S. R. (2014). Emulsifying, Flocculating, and Physicochemical Properties of Exopolysaccharide Produced by *Cyanobacterium Nostoc flagelliforme*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172:36–49.

- Hussain, A., Zia, A.M., Tabasum, S., Noreen, A., Ali, M., Iqbal, R., & Zube, M. (2017). Blends and composites of exopolysaccharides: properties and applications: a review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 94, 10-27.
- Insulkar, P., Kerkar, S., & Lele, S. S. (2018). Purification and structural-functional characterization of an exopolysaccharide from *Bacillus licheniformis* PASS26 with in-vitro antitumor and wound healing activities. *International Journal of Biological Macromolecules*, 120, 1441-1450.
- Inturri, R., Molinaro, A., Di Lorenzo, F., Blandino, G., Tomasello, B., Hidalgo-Cantabrana, C., De Castro, C., & Ruas-Madiedo, P. (2017). Chemical and biological properties of the novel exopolysaccharide produced by a probiotic strain of *Bifidobacterium longum*. *Carbohydrate Polymers*, 174, 1172–1180.
- Kim, Y. D., Morr, C. V., & Schenz, T. W. (1996). Microencapsulation properties of gum arabic and several food proteins: Liquid orange oil emulsion particles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(5), 1308–1313.
- Kpodo, F. M., Agbenorhevi, J. K., Alba, K., & Kontogiorgos, V. (2020). Emulsifying properties of Ghanaian grewia gum. *International Journal of Food Science and Technology*, 55, 1909–1915
- Li, J. M., & Nie, S. P. (2016). The functional and nutritional aspects of hydrocolloids in foods. *Food Hydrocolloids*, 53, 46-61.
- Li, W., Ji, J., Rui, X., Yu, J., Tang, W., Chen, X., Jiang, M., Dong, M. (2014). Production of exopolysaccharides by *Lactobacillus helveticus* MB2-1 and its functional characteristics in vitro. *LWT - Food Science and Technology*, 54, 732-739.
- Lobo, R. E., Gómez, M. I., Valdez, G. F., & Torino, M. I. (2019). Physicochemical and antioxidant properties of a gastroprotective exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* CRL1190. *Food Hydrocolloids*, 96, 625-633.

- Maalej, H., Hmidet, N., Boisset, C., Bayma, E., Heyraud, A., & Nasri, M. (2016). Rheological and emulsifying properties of a gel-like exopolysaccharide produced by *Pseudomonas stutzeri* AS22. *Food Hydrocolloid*, 52, 634- 647.
- Majumder, A., & Goyal, A (2009). Rheological and gelling properties of a novel glucan from *Leuconostoc dextranicum* NRRL B-1146. *Food Research International* 42, 525–528.
- Moosavi-Nasab, M., Alahdad, Z. & Nazemi, S. H. (2009). Characterization of the Dextran Produced by *Leuconostoc mesenteroides* from Date Fruit Extract. *Iran Agricultural Research*, 28 (1), 79-88.
- Paximada, P., Tsouko, E., Kopsahelis, N., Koutinas, A. A., & Mandala, I. (2016). Bacterial cellulose as stabilizer of o/w emulsions. *Food Hydrocolloids*, 53, 225–232.
- Tingirikari, J. M. R., Kothari, D., & Goyal, A. (2014). Superior prebiotic and physicochemical properties of novel dextran from *Weissella cibaria* JAG8 for potential food applications. *Food & Function*, 5, 2324-2330.
- Trabelsi, I., Ktari, N., Triki, M., Bkhairia, I., Slima, S. B., Aydi, S. S., Aydi, S., Abdeslam, A., & Salah, R. B. (2018). Physicochemical, techno-functional, and antioxidant properties of a novel bacterial exopolysaccharide in cooked beef sausage. *International Journal of Biological Macromolecules*, 111, 11-18.
- Wang, Y., Trani, A., Knaapila, A., Hietala, S., Coda, R, Katina, K., & Maina, N., H. (2020). The effect of *in situ* produced dextran on flavour and texture perception of wholegrain sorghum bread. *Food Hydrocolloids*, 106, 105913.
- Xing, H., Du, R., Zhao, F., Han, Y., Xiao, H., & Zhou, Z. (2018). Optimization, chain conformation and characterization of exopolysaccharide isolated from *Leuconostoc mesenteroides* DRP105. *International Journal of Biological Macromolecules*, 112, 1208–1216.

- Yang, Y., Feng, F., Zhou, Q., Zhao, F., Du, R., Zhou, Z., & Han, Y. (2018). Isolation, purification and characterization of exopolysaccharide produced by *Leuconostoc pseudomesenteroides* YF32 from soybean paste. *International Journal of Biological Macromolecules*, 114, 529–535.
- Yang, Y., Feng, F., Zhou, Q., Zhao, F., Du, R., Zhou, Z., & Han, Y. (2019). Isolation, Purification, and Characterization of Exopolysaccharide Produced by *Leuconostoc citreum* N21 from Dried Milk Cake. *Transactions of Tianjin University*, 25, 161–168.
- Yang, T., Wu, K., Wang, F., Liang, X., Liu, Q., Li, G., & Li, Q. (2014). Effect of exopolysaccharides from lactic acid bacteria on the texture and microstructure of buffalo yoghurt. *International Dairy Journal*, 34, 252–256.
- Ye, S., Liu, F., Wang, J., Wang, H., & Zhang, M. (2012). Antioxidant activities of an exopolysaccharide isolated and purified from marine *Pseudomonas* PF-6. *Carbohydrate Polymers*, 87(1), 764–770.
- Zhao, D., Jiang, J., Du, R., Guo, S., Ping, W., Ling, H., & Ge, J. (2019). Purification and characterization of an exopolysaccharide from *Leuconostoc lactis* L2. *International Journal of Biological Macromolecules*, 139, 1224–1231.
- Zhou, Q., Feng, F., Yang, Y., Zhao, F., Du, R., Zhou, Z., & Han, Y. (2018). Characterization of a dextran produced by *Leuconostoc pseudomesenteroides* XG5 from homemade wine. *International Journal of Biological Macromolecules*, 107, 2234–2241.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Até o momento, poucos estudos têm relatado sobre a microbiota nativa de frutos juçara, importante palmeira da Mata Atlântica. Este parece ser a primeira descrição sobre a presença de BAL com potencial propriedade probiótica e tecnológica de seu exopolissacarídeo. *Lactococcus lactis* J7, uma das BAL isoladas e identificadas, exibiu capacidade de tolerar condição gastrointestinal simulada, apresentou atividade antimicrobiana contra patógenos de origem alimentar e poderia se adaptar à sobrevivência e colonização no trato intestinal de acordo com sua agregação e coagregação. Assim, *L. lactis* J7 poderia ser um candidato probiótico promissor para o desenvolvimento de alimentos funcionais com vantagens distintas sobre *Leuconostoc pseudomesenteroides* JF17, outra BAL isolada de frutos juçara.

L. pseudomesenteroides JF17 foi testada quanto sua capacidade de produção de EPS e apresentou alta produção (53.77 mg / mL), quando as condições ideais de cultivo, concentração de sacarose (18 %, m / v), pH inicial (7,3) e temperatura de fermentação (20 °C), foram otimizadas. As condições ideais de cultivo e cinética de fermentação encontradas também podem ser úteis como ponto de partida adequado para o aumento da escala do processo fermentativo, auxiliando no desenvolvimento da produção industrial de EPS.

Os resultados das análises de HPLC, FTIR e NMR revelaram que o EPS era uma dextrana linear que consistia em unidades consecutivas de D-glicopiranosose ligadas por α -(1 \rightarrow 6). A dextrana liofilizada apresentou estrutura porosa e o excelente comportamento térmico poderia sugerir sua potencial aplicação comercial. O comportamento pseudoplástico e viscosidade, tornam-na ideal como agente espessante ou viscosificante. A alta solubilidade em água e capacidade de retenção de água da dextrana sugere suas aplicações como hidrocolóides e agentes estabilizadores. Emulsões estáveis também foram produzidas pela dextrana em óleo de soja, além de ter apresentado ótima capacidade de emulsão. Ela ainda mostrou boa atividade antioxidante em ABTS^{•+}, DPPH[•] e radicais hidroxila, podendo ser considerada potencialmente benéfica para a saúde.

Esses fatores combinados, tornam a dextrana produzida por *L. pseudomesenteroides* JF17 um biopolímero adequado como agente de viscosidade, estabilizante, emulsificante e antioxidante nas indústrias alimentícia e farmacêutica. Entretanto, para melhor compreender o potencial tecnológico deste EPS, novos estudos devem ser desenvolvidos para verificar as aplicações potenciais da dextrana em alimentos como em molho para salada, maionese, queijo, bebida láctea, produtos cárneos, entre outros.

Também, estudos mais aprofundados devem ser realizados para investigar as propriedades probióticas das bactérias isoladas, como teste de toxicidade e de aderência usando linhagens de células de epitélio e modelos animais. Novas cepas de BAL com potenciais probióticos podem ser isoladas e investigadas, a partir do fruto juçara para ampliar a utilização de microrganismos probióticos em alimentos, bem como, promover uma exploração sustentável dos frutos da palmeira em extinção.

ANEXOS

GenBank

Lactococcus lactis cepa J7 16S gene do RNA ribossomal, sequência parcial

GenBank: MW132602.1

[Gráficos](#) [FASTA](#)[Vamos para:](#)

LOCUS MW132602 471 bp DNA linear BCT 24-OCT-2020

DEFINIÇÃO Lactococcus lactis cepa J7 16S gene do RNA ribossomal, parcial
sequência.

ACESSÃO MW132602

VERSÃO MW132602.1

PALAVRAS-CHAVE .

FONTE Lactococcus lactis

ORGANISMO [Lactococcus lactis](#)Bactérias; Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Streptococcaceae;
Lactococcus.

REFERÊNCIA 1 (bases 1 a 471)

AUTORES Farinazzo, FS, Fernandes, MT, Mauro, CS e Garcia, S.

Envio direto de TITLE

REVISTA submetida (19-OUT-2020) Ciencia e Tecnologia de Alimentos,
Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, 900,
Londrina, Paraná 10.011, Brasil

COMENTÁRIO ## Assembly-Data-START ##

Método de montagem :: CLC Genomics Workbench vv 10.0

Tecnologia de Sequenciamento :: Illumina

Assembly-Data-END

CARACTERÍSTICAS Local / Fonte de qualificadores

1..471

```

/ organismo = "Lactococcus lactis"
/ mol_type = "DNA genômico"
/ estirpe = "J7"
/ isolation_source = "Jucara fruit (Euterpe edulis Martius)"
/ db_xref = "taxon: 1358 "
/ country = "Brasil"
/ collection_date = "08 de maio de 2017"
rRNA
.....
<1 ..> 471
/ product = "RNA ribossômico 16S"

```

ORIGEM

```

1 cctacgggac gcagcagtag ggaatcttcg gcaatggacg aaagtctgac cgagcaacgc
61 cgcgtagtg aagaaggttt tcggatcgta aaactctgtt ggtagagaag aacgttggtg
121 agagtggaaa gctcatcaag tgacggtaac taccagaaa gggacggcta actacgtgcc
181 agcagccgcg gtaatacgtg ggtcccagc gttgtccgga ttattgggc gtaaagcgag
241 cgcagtggtt ttattaagtc tgggtgtaaa ggcagtggt caaccattgt atgcattgga
301 aactggtaga cttgagtga ggagaggaga gtggaattcc atgtgtagcg gtgaaatgag
361 tagatatag gaggaacacc ggtggcgaaa gcggctctct ggcctgtaac tgacactgag
421 gctcgaagc gtggggagca aacaggatta gatacccccag tagtccttaa t

```

//

GenBank

Leuconostoc pseudomesenteroides cepa JF17 16S gene do RNA ribossômico, sequência parcial

GenBank: MN756802.1

[Gráficos](#) [FASTA](#)
[Vamos para:](#)

LOCUS MN756802 477 bp DNA linear BCT 09-DEZ-2019
 DEFINIÇÃO Leuconostoc pseudomesenteroides cepa JF17 16S gene do RNA ribossômico, sequência parcial.
 ACESSÃO MN756802
 VERSÃO MN756802.1
 PALAVRAS-CHAVE .
 FONTE Leuconostoc pseudomesenteroides
 ORGANISMO [Leuconostoc pseudomesenteroides](#)
 Bactérias; Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Leuconostocaceae; Leuconostoc.
 REFERÊNCIA 1 (bases 1 a 477)
 AUTORES Farinazzo, FS, Fernandes, MTC, Saori, C., Tomal, AL e Garcia, S.
 TÍTULO Caracterização e atividade antioxidante de um exopolissacarídeo produzido por Leuconostoc pseudomesenteroides JF17 a partir de frutos de jucara
 REVISTA não publicada
 REFERÊNCIA 2 (bases 1 a 477)
 AUTORES Farinazzo, FS, Fernandes, MTC, Saori, C., Tomal, AL e Garcia, S.
 Envio direto de TITLE
 REVISTA submetida (03-DEZ-2019) Ciencia e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, 900, Londrina, Paraná 10.011, Brasil
 COMENTÁRIO ## Assembly-Data-START ##
 Método de montagem :: CLC Genomics Workbench v. 10.0
 Tecnologia de Sequenciamento :: Illumina
 ## Assembly-Data-END ##
 CARACTERÍSTICAS Local / Fonte de qualificadores
 1..477
 / organismo = "Leuconostoc pseudomesenteroides"
 / mol_type = "DNA genômico"
 / estirpe = "JF17"
 / isolation_source = "Jucara fruit"
 / db_xref = "taxon: [33968](#)"
 / country = "Brasil: Londrina"
 <1 ..> 477
 / product = "RNA ribossômico 16S"
 rRNA

 ORIGEM
 1 ggcaaaccta cggggggcag cagtagggaa tcttcacaa tgggcaaaag cctgatggag
 61 caacgccgcg tgtgtgatga aggctttcgg gtcgtaaagc actgttggat gggagaaga
 121 gctagaatag ggaatgattt tagtttgacc gtaccatacc agaaaggac ggctaaatac
 181 gtgccagcag ccgcggtaat acgtatgtcc cgagcgttat ccggatttat tggcgtaaa
 241 gcgagccgag acggttgatt aagtctgatg tgaagcccc gagctcaact ccggaatggc
 301 attggaact ggttaacttg agtcagtag aggtaagtgg aactccatgt gtacgggtgg
 361 aatgcgtaga tatatggaag aacaccagtg gcgaaggcgg cttactggac tgtaactgac
 421 gttgagctc gaaagtgtgg gtacaaaca ggattagata cccagtagt cctaaag
 //



**Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº A701C5B

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **A701C5B**
 Usuário: **UEL**
 CPF/CNPJ: **78.640.489/0001-53**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico**

Espécie

Leuconostoc mesenteroides

Título da Atividade: **Análise metabólica e propriedades bioativas da microbiota de frutos de juçara (Euterpe edulis Martius)**

Equipe

Sandra GARCIA **UEL**
Fernanda Silva Farinazzo **Universidade estadual de Londrina**



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO
Cadastro de Acesso Nº A38EECB

Tipo de Usuário:	INDEPENDENTE
Responsável pelo cadastro:	07602700902
Objeto do Acesso:	Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado
O acesso foi realizado antes de 17/11/2015 ou obteve autorização de acesso antes de 17/11/2015?	Não, sem solicitação de autorização em tramitação
Finalidade do Acesso:	Pesquisa
Estas atividades são baseadas em acesso realizado anteriormente?:	Não
Este cadastro está vinculado a cadastro anterior de remessa?	Não

Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado

Título da Atividade:	Isolamento e identificação de bactéria ácido láctica de frutos de palmeira juçara
Título da Atividade em inglês:	Isolation and identification of lactic acid bacteria from juçara palm fruits
Resumo da atividade (incluindo objetivos e resultados esperados ou obtidos, conforme o caso)	As bactérias ácido lácticas são os microrganismos mais comuns aplicados como probióticos. Os benefícios dos probióticos estão ligados às cepas, daí a necessidade de se investigar novas culturas com propriedades probióticas. Frutas como a juçara, palmeira da Mata Atlântica ameaçada de extinção, são nichos ricos em microrganismos, entre eles as bactérias ácido lácticas. Assim, foram isoladas e identificadas cepas de bactérias ácido lácticas, de frutos juçara (<i>Euterpe edulis Martius</i>), nativos da Mata Atlântica. As colônias isoladas foram submetidas à caracterização morfológica e molecular pelo sequenciamento do marcador molecular 16S rRNA, utilizando o MiSeq Sequencing System (Illumina Inc., EUA) e Next Generation Sequencing (NGS). A bactéria ácido láctica identificada foi um <i>Lactococcus lactis</i> com 100% de similaridade. Sendo nomeado como <i>Lactococcus lactis</i> J7
Resumo não sigiloso da Atividade em Inglês	Lactic acid bacteria are the most common microorganisms applied as probiotics. The benefits of probiotics are linked to strains, hence the need to investigate new crops with probiotic properties. Fruits such as juçara, an endangered palm of the Atlantic Forest, are niches rich in microorganisms, including lactic acid bacteria. Thus, strains of lactic acid bacteria, juçara fruits (<i>Euterpe edulis Martius</i>), native to the Atlantic Forest, were isolated and identified. The isolated colonies were subjected to morphological and molecular characterization by sequencing the molecular marker 16S rRNA, using the MiSeq Sequencing System (Illumina Inc., USA) and Next Generation Sequencing (NGS). The lactic acid bacteria identified was a <i>Lactococcus lactis</i> with 100%

Palavra(s)-chave: similarity. Being named as *Lactococcus lactis* J7
Lactococcus lactis; *Euterpe edulis* Martius; Sequenciamento de Nova Geração

Palavra(s)-chave em inglês: *Lactococcus lactis*; *Euterpe edulis* Martius; Next Generation Sequencing

Período das Atividades: 01/08/2016 01/09/2020

Equipe

Nome Completo	Documento	Instituição	Nacionalidade
Fernanda Silva Farinazzo	***.027.009-**	UEL	Brasil
Sandra Garcia	***.726.148-**	UEL	Brasil

Sobre o Componente do Patrimônio Genético Acessado

O acesso ao patrimônio genético será realizado em área indispensável à segurança nacional ou águas jurisdicionais brasileiras, plataforma continental e zona econômica exclusiva:

Não

Tipo de Componente:

Micro-organismos (exceto algas, fungos e vírus)

Nome Científico:

Lactococcus lactis

Reino:

BACTERIA

Filo/Divisão:

Firmicutes

Classe:

Bacilli

Ordem:

Lactobacillales

Família:

Streptococcaceae

Estirpe/Linhagem/Cepa:

J7

Trata-se de variedade tradicional local ou crioula ou raça localmente adaptada ou crioula?

Sim

Sobre a Procedência Do Patrimônio Genético

Procedência da amostra:

In situ

UF:

PR

Município:

Rolândia

Latitude:

23° 14" 0.48' S

Longitude:

51° 4" 0.43' W

Bioma:

Mata Atlântica

Data da coleta

08/05/2017

Sobre o Conhecimento Tradicional Associado

O acesso ao patrimônio genético será realizado em área indispensável à segurança nacional ou águas jurisdicionais brasileiras, plataforma continental e zona econômica exclusiva:	Não
Fonte de obtenção do Conhecimento Tradicional Associado:	CTA de origem não identificável
Conhecimento Tradicional Associado ao Patrimônio Genético Acessado:	Isolamento e identificação de microrganismos
Patrimônio Genético:	Lactococcus lactis
<u>Sobre o provedor do Conhecimento Tradicional Associado</u>	
Houve ingresso em Terra Indígena?	Não

Data do Cadastro: 09/10/2020 14:49:41
Situação do Cadastro: Concluído

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 14:54 de 09/10/2020.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - **SISGEN**



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO
Cadastro de Acesso Nº A02124C

Tipo de Usuário:	INDEPENDENTE
Responsável pelo cadastro:	07602700902
Objeto do Acesso:	Patrimônio Genético
O acesso foi realizado antes de 17/11/2015 ou obteve autorização de acesso antes de 17/11/2015?	Não, sem solicitação de autorização em tramitação
Finalidade do Acesso:	Pesquisa
Estas atividades são baseadas em acesso realizado anteriormente?:	Não
Este cadastro está vinculado a cadastro anterior de remessa?	Não

Patrimônio Genético

Título da Atividade:	isolamento e identificação de bactérias ácido lácticas de frutos de palmeira juçara
Título da Atividade em inglês:	isolation and identification of lactic acid bacteria from juçara palm fruits
Resumo da atividade (incluindo objetivos e resultados esperados ou obtidos, conforme o caso)	Os frutos em geral, incluindo o juçara são habitats importantes para uma variedade de espécies de microrganismos na natureza e muitos deles são bactérias do ácido láctico (BAL). Assim, o objetivo do trabalho foi isolar e identificar bactérias lácticas isoladas de frutas juçara após fermentação espontânea (48 h a 25 °C). Para isso, colônias isoladas e purificadas foram coradas pelo método de Gram, avaliando quanto a catalase e fermentação da glicose. Após as colônias selecionadas com características de BAL foram submetidas a caracterização molecular ao sequenciamento do marcador molecular 16S rRNA. A análise deste marcador foi realizada por sequenciamento de alto rendimento usando a técnica de sequenciamento MiSeq (Illumina Inc., EUA) e Sequenciamento de Nova Geração (NGS). Os resultados mostraram, partir da observação morfológica, que uma cultura de 48h isolada em ágar MRS possuía características típicas das BAL. As colônias puras eram lisas, com morfologia de bastonetes, Gram positivas, catalase negativas e produzido gás a partir de glicose. Uma região da sequência de genes 16S rRNA da cepa foi amplificada por PCR, e com os maiores níveis de similaridade na sequência do gene 16S rRNA foram L. pseudomesenteroides (100%). Assim, a cepa foi identificada como L. pseudomesenteroides através de testes morfológicos, bioquímicos, fisiológicos e análise de sequenciamento 16S rDNA, denominada L. pseudomesenteroides JF17.
Resumo não sigiloso da Atividade em Inglês	Fruits in general, including juçara are important habitats for a variety of species of microorganisms in nature and many of them are lactic acid bacteria (LAB). Thus, the objective of the work was

to isolate and identify lactic acid bacteria isolated from juçara fruits after spontaneous fermentation (48 h at 25 °C). For this, isolated and purified colonies were stained by the Gram's method, evaluated ability to produce catalase and glucose fermentation. After the colonies selected with characteristics of LAB were submitted to molecular characterization to the sequencing of the 16S rRNA molecular marker. The analysis of this marker was performed by high-throughput sequencing using the MiSeq Sequencing System (Illumina Inc., USA) and Next Generation Sequencing (NGS) technique. The results showed, from the morphological observation, that a culture of 48h isolated in MRS agar had characteristics typical of the LAB. The pure colonies were smooth, with rod morphology, Gram positive, catalase negative and produced gas from glucose. A region of the 16S rRNA gene sequence of strain was amplified by PCR, and the highest levels of similarity in the 16S rRNA gene sequence were *L. pseudomesenteroides* (100%). Thus, strain was identified as *L. pseudomesenteroides* by morphological, biochemical, physiological and 16S rDNA sequencing analysis, named *L. pseudomesenteroides* JF17.

Palavra(s)-chave: *Euterpe edulis*; *L. pseudomesenteroides*; LAB; NGS

Palavra(s)-chave em inglês: *Euterpe edulis*; *L. pseudomesenteroides*; LAB; NGS

Período das Atividades: 01/08/2016 01/12/2017

Equipe

Nome Completo	Documento	Instituição	Nacionalidade
Fernanda Silva Farinazzo	***.027.009.**	UEL	Brasil
Sandra Garcia	***.726.148.**	UEL	Brasil

Sobre o Componente do Patrimônio Genético Acessado

O acesso ao patrimônio genético será realizado em área indispensável à segurança nacional ou águas jurisdicionais brasileiras, plataforma continental e zona econômica exclusiva:

Não

Tipo de Componente: Micro-organismos (exceto algas, fungos e vírus)

Nome Científico: *Leuconostoc pseudomesenteroides*

Reino: BACTERIA

Filo/Divisão: Firmicutes

Classe: Bacilli

Ordem: Lactobacillales

Família: Leuconostocaceae

Estirpe/Linhagem/Cepa: JF17

Trata-se de variedade tradicional local ou crioula ou raça localmente adaptada ou crioula? Não

Sobre a Procedência Do Patrimônio Genético

Procedência da amostra:	In situ
UF:	PR
Município:	Rolândia
Latitude:	23° 14" 0.48' S
Longitude:	51° 24" 0.43' W
Bioma:	Mata Atlântica
Data da coleta	02/05/2016

Data do Cadastro: 12/07/2019 17:24:39

Situação do Cadastro: Concluído

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 14:56 de 09/10/2020.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - **SISGEN**



Neo 10001190/2018

AMOSTRA	180516644323
Descrição:	j7
Data do recebimento da amostra:	19 de Junho de 2018
Data de liberação do resultado:	19 de Julho de 2018

Análise de sequenciamento do marcador genético rDNA 16S (V3-V4) - BACTÉRIAS	Sequências	Porcentagens
<i>Lactococcus lactis</i>	21479	100,0%



Neo 10000298/2017

AMOSTRA	170616428302
Descrição:	isolado bactéria
Data do recebimento da amostra:	6 de Julho de 2017
Data de liberação do resultado:	24 de Agosto de 2017

Análise de sequenciamento do marcador genético rRNA 16S (V3-V4) - BACTÉRIAS	Sequências	Porcentagens
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	10916	100,0%