



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
REDE RENORBIO

NATÁLIA ALMEIDA ONOFRE CORDEIRO

**KEFIR DE ÁGUA BIONAT-I: ANÁLISE METAGENÔMICA DOS GRÃOS,
OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DO EXOPOLISSACARÍDEO
CONSORCIANA E SEU POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO**

Recife

2018

NATÁLIA ALMEIDA ONOFRE CORDEIRO

**KEFIR DE ÁGUA BIONAT-I: ANÁLISE METAGENÔMICA DOS GRÃOS,
OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DO EXOPOLISSACARÍDEO
CONSORCIANA E SEU POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia em Agropecuária

Orientador: Profº. Dr. Ederson Akio Kido.

Coorientador: Profº. Dr. Ricardo Yara.

Recife

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Cordeiro, Natália Almeida Onofre

Kefir de água BIONAT-I: análise metagenômica dos grãos, obtenção e caracterização estrutural do exopolissacarídeo consorciado e seu potencial biotecnológico/ Natália Almeida Onofre Cordeiro- 2018.

150 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Ederson Akio Kido

Coorientador: Ricardo Yara

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Recife, 2018.

Inclui referências, apêndice e anexo

1. Biotecnologia 2. Kefir 3. Glucanas I. Kido, Ederson Akio (orient.) II. Yara, Ricardo (coorient.) III. Título

660.6

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2018-297

NATÁLIA ALMEIDA ONOFRE CORDEIRO

**KEFIR DE ÁGUA BIONAT-I: ANÁLISE METAGENÔMICA DOS GRÃOS,
OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DO EXOPOLISSACARÍDEO
CONSORCIANA E SEU POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Área de concentração Biotecnologia em Agropecuária, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Aprovada em: 09/04/2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dr. Ederson Akio Kido (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. Valdir de Queiroz Balbino
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. Ranildon de Souza Bezerra
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Cláudia Sampaio de Andrade Lima
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. José Ribamar Costa Ferreira Neto
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho à instituição que é a base da minha vida: minha família.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador prof. Dr. Ederson Kido pela oportunidade, confiança no meu trabalho, respeito e pela imprescindível orientação.

Ao meu co-orientador prof. Dr. Ricardo Yara por acreditar em mim, pela paciência, apoio e por todos os preciosos ensinamentos.

À Deus por sua bondade infinita, por me permitir chegar até aqui, por me guiar pelos melhores caminhos e por estar sempre me dando forças para seguir em frente e à Nossa Senhora, mãe protetora, por sempre interceder por mim e me iluminar.

Aos meus pais Rui e Ana por todo amor, incentivo, torcida, dedicação. Tudo isso só foi possível devido ao apoio de vocês. Obrigada por sempre priorizarem meus estudos e por acreditarem em mim.

Ao meu esposo Edvar, meu grande incentivador, pela compreensão, paciência, companheirismo. Obrigada por estar sempre ao meu lado e por dar tanta importância aos meus sonhos.

Ao meu Irmão Rafael, meus sogros, cunhados e toda minha família e amigos pelo carinho e pela torcida.

Aos meus sobrinhos João, Davi e Abner, por representarem o que realmente importa: o amor.

À profa. Dra. Cláudia Sampaio pelas oportunidades, pela amizade e por estar sempre ao meu lado.

À profa. Kêsia Xisto, pelo carinho, apoio e ajuda na realização das análises microbiológicas.

Aos amigos do Laboratório de Genética Molecular: Amanda Souza, Amanda Thamires, Fernanda, George, Gizele, Kátia, Manassés, Neto, Rahisa pela disponibilidade em ajudar, pela agradável convivência e pela amizade. E à amiga Marislane, pelo companheirismo e parceria em todos os momentos destes anos de Doutorado.

Às Professoras Adriana, Beate e Cláudia pelo uso do Laboratório de Biofísica Química; À Rafael e Regina, pela amizade e parceria. Ao grupo do kefir/polímeros do LBQ: Aline Lima, Antônio, Bruno, Carlos, Diogo, Eduarda, Flávia, Gilvânia, Luzia, Priscilla, Ricardo, Vinícius pela colaboração e amizade. Ao grupo de Biomol do LBQ: Alice, Bruna Corina, Juan-Nanda, Marília Lima, por todo apoio, aprendizado,

momentos de descontração e palavras de incentivo; vocês são muito especiais. Aos amigos do LBQ: Brunna Patriota, Isabela, João Paulo, Leylianne, Marília Grazielly, Niedja, Paola, Prof. Paulo Euzébio, Renan, Sueli, Yago pela disponibilidade de sempre, por cada conversa, cada risada; vocês são pessoas incríveis, pelas quais eu sou grata por ter em minha vida. E a todos os colegas que fizeram e fazem parte do LBQ. Tudo foi mais fácil tendo vocês por perto durante esses seis anos.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia Aplicada e Ensaio Antimicrobianos Evelyne, João Pedro, Luciméri, Maria Cláudia, Raísa, Rosilma, Vinícius pelos momentos de aprendizado e amizade.

Ao programa de pós-graduação em Biotecnologia – Rede Nordeste de biotecnologia (RENORBIO), à coordenadora Profa. Dra. Teresinha e aos funcionários Dani e Dinho pela disponibilidade e auxílio nas questões burocráticas.

À Universidade Federal de Pernambuco, pelo espaço físico, a todos os funcionários e professores.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

Aos membros das bancas de seminários, qualificação e defesa, pela disponibilidade e por todas as sugestões a fim de aprimorar meu trabalho.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

“Quanto mais eu estudo a natureza, mais me maravilho com a obra do Criador. Nas menores de suas criaturas Deus colocou propriedades extraordinárias.” (Louis Pasteur).

RESUMO

Kefir é uma associação simbiótica de bactérias e leveduras, que se multiplicam em uma matriz constituída de exopolissacarídeos (EPS), que são produzidos pelos próprios micro-organismos. O kefir BIONAT-I é um consórcio de kefir de água que foi selecionado, a partir de várias culturas de kefir, tendo como critério principal a obtenção de biomassa em meio hipertônico. Tanto o processo de seleção *per se*, quanto à mudança para o cultivo em meio hipertônico podem, potencialmente, alterar a composição de EPS produzidos e o perfil microbiológico do consórcio utilizado. Assim, este trabalho teve como objetivo a caracterização e avaliação de atividades biológicas de EPS extraído do consórcio BIONAT-I, além da análise de sua composição microbiana por método independente de cultivo. A partir de um extrator alcalino foi obtido um homopolissacarídeo de glicose, com ligações predominantes β -1-6, caracterizado, portanto como uma β -glucana. Este EPS ainda não descrito foi denominado de consorciana. A consorciana apresentou atividade citotóxica contra linhagens neoplásicas de leucemia mielocítica crônica e adenocarcinoma de mama humana, além de promover, a partir de células mononucleares do sangue periférico, a estimulação da produção de citocinas IL-6 e TNF- α , envolvidas no processo de cicatrização. Observou-se que a consorciana comporta-se como um hidrogel superabsorvente absorvendo até 10 vezes o seu peso seco podendo desta forma ser utilizado como matéria-prima para produção de filmes bioativos. Além disso, com intuito de elucidar a microbiota do consórcio BIONAT-I foi realizada a análise de metagenômica dos grãos. Por esta abordagem foi possível identificar as principais espécies de bactérias e leveduras presentes no consórcio. Houve predominância das espécies de bacterianas *Zymomonas mobilis* e *Clostridium tyrobutyricum*, além da detecção de micro-organismos não anteriormente citados como componentes de grãos de kefir, como *Ethanoligenens harbinense* e *Torulaspora quercuum*. Adicionalmente, foi realizado isolamento microbiano em meios de cultura Tryptic Soy Agar (TSA), De Man, Rogosa and Sharpe Agar (MRS) e Chloramphenicol Yeast Glucose Agar (CYG). Foram então selecionados 28 morfotipos de colônias de micro-organismos isolados. A partir da amplificação e clivagem foram obtidos perfis de restrição com a enzima *TaqI*, e os morfotipos foram divididos em 13 grupos, sendo dois morfotipos de leveduras. Os resultados obtidos indicam que o consórcio BIONAT-I tem composição microbiana diferente dos

consórcios de kefir descritos na literatura, além de produzir um EPS do tipo 1→6 β -glucana ainda não descrito para culturas de kefir, evidenciando seu potencial biotecnológico.

Palavras-chave: Kefir. β -glucana. Consorciana. Citotóxica. Imunomoduladora. Consórcio microbiano. Metagenômica.

ABSTRACT

Kefir is a symbiotic association of bacteria and yeasts, which multiply in a matrix consisting of exopolysaccharides (EPS), which are produced by the microorganisms themselves. The BIONAT-I kefir is a water kefir consortium that was selected from several kefir cultures with the main criterion being the obtaining of biomass in hypertonic medium. Both the selection process *per se* and the change to cultivation in hypertonic medium may potentially alter the EPS composition produced and the microbiological profile of the consortium used. Thus, the aim of this work was to characterize and evaluate biological activities of EPS extracted from the BIONAT-I consortium, besides the analysis of its microbial composition by an independent cultivation method. From an alkaline extractor was obtained a homopolysaccharide of glucose monomers with predominant β -1-6 bonds, characterized therefore as β -glucan. This eps not yet described was denominated consorciana. Consortian showed cytotoxic activity against neoplastic lines of chronic myelocytic leukemia and adenocarcinoma of the human breast, besides promoting, from peripheral blood mononuclear cells, the stimulation of the production of IL-6 and TNF- α cytokines, involved in the cicatrization process. It was observed that consortian behaves as a superabsorbent hydrogel absorbing up to 10 times its dry weight and can be used as a raw material for the production of bioactive films. Moreover, in order to elucidate the microbiota of the BIONAT-I consortium was performed the analysis of grain metagenomics. By this approach it was possible to identify the main species of bacteria and yeast present in the consortium. There was a predominance of bacterial species such as *Zymomonas mobilis* and *Clostridium tyrobutyricum* besides the presence of microorganisms not previously mentioned as components of kefir grains such as *Ethanoligenens harbinense* and *Torulaspora quercuum*. Additionally, microbial isolation was performed in Tryptic Soy Agar (TSA), De Man, Rogosa and Sharpe Agar (MRS) and Chloramphenicol Yeast Glucose Agar (CYG) culture media. 28 colony morphotypes of isolated microorganisms were selected. From the amplification and cleavage, restriction profiles were obtained with the enzyme TaqI, and the morphotypes were divided into 13 groups, being two morphotypes of yeasts. The results obtained indicate that BIONAT-I consortium has different microbial composition from the kefir consortia described in the literature, besides producing an

EPS of the type 1 → 6 β -glucan not yet described for cultures of kefir, evidencing its biotechnological potential.

Keywords: Kefir. β -glucan. Consortian. Cytotoxic. Immunomodulatory. Microbial consortium. Metagenomic.

LISTA DE FIGURAS

Revisão Bibliográfica

Figura 1 - Grãos de kefir (A) de água (cultivados em solução de açúcar mascavo) e (B) de leite.....	24
Figura 2 - Representação esquemática das etapas de cultivo do kefir. Os grãos de kefir (A) são adicionados ao substrato (B) e mantidos para a fermentação a temperatura ambiente por 24-48 h (C); após fermentação é feita a filtração (D), se obtendo o líquido fermentado (E). Um novo ciclo é então iniciado com os grãos.....	32
Figura 3 - Diferentes processos de fermentação no kefir: leveduras realizam fermentação alcoólica, produzindo etanol; BAA utilizam o etanol para realizar fermentação acética, produzindo ácido acético; BAL realizam fermentação láctica, produzindo ácido láctico.....	33
Figura 4 - Monossacarídeos de três a seis carbonos.....	35
Figura 5 - Dois isômeros de gliceraldeído: D-Gliceraldeído e L-Gliceraldeído. As linhas sólidas se projetam para fora do plano do papel, em direção ao leitor; linhas tracejadas se projetam atrás do plano do papel, longe do leitor.....	36
Figura 6 - Formação de α -D-glicopirranose e β -D-glicopirranose, duas formas cíclicas da D-glicose.....	37
Figura 7 - Representação de homopolissacarídeos e heteropolissacarídeos (A) simples (B) ramificados.....	38
Figura 8 - Representação esquemática das etapas de formação de biofilme bacteriano. À medida que a população celular aumenta, o mesmo acontece com a produção de EPS, necessário para a formação do biofilme.....	39
Figura 9 - Estrutura química de xantana.....	41
Figura 10 - Estrutura química de gelana.....	41
Figura 11 - Estrutura química de dextrana.....	42
Figura 12 - Estrutura química de curdlana.....	43
Figura 13 - Estrutura química de celulose bacteriana.....	43
Figura 14 - Estrutura química de kefirana.....	44
Figura 15 - Método dependente de cultivo (microbiologia clássica) na identificação da microbiota de uma comunidade.....	46

Figura 16 - Estrutura dos ribossomos.....	47
Figura 17 - Esquema representativo do rRNA procarioto e das regiões hipervariáveis do gene 16S rRNA (A), rRNA eucarioto (B).....	48
Figura 18 - Fluxograma das etapas de uma análise metagenômica.....	49
Figura 19 - Etapas do sequenciamento Illumina HiSeq.....	52

Structural characterization and immunomodulatory activity of Consortian, a novel exopolysaccharide extracted from kefir consortium grains

Fig. 1 - FTIR spectrum of the EPS extracted from the BIONAT-I consortium of kefir.....	69
Fig. 2 - TGA thermal spectra of the EPS extracted from the BIONAT-I consortium of kefir.....	69
Fig. 3 - Gas chromatograms of alditol derivatives of standard monosaccharides (1-rhamnose; 2-arabnose; 3-mannose; 4-glucose; 5-galactose) and hydrolyzed EPS.....	70
Fig. 4 - Proposed structure for the EPS obtained from the BIONAT-I consortium of kefir.....	71
Fig. 5 - (a) 1D ^1H NMR spectra at 900 MHz of EPS. A: signal of anomeric protons of α -glucose; B: signal of anomeric protons of β -glucose. Region of the anomeric fucose signals was highlighted in greater magnification to observe their proportions in EPS (integral numbers in parenthesis). (b) 2D $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ edited HSQC at 900 MHz of the EPS. Black: phase signals (CH carbon/proton); Red: antiphase signals (CH_2); A: α -D-Glucp residues; B: β -D-Glucp residues; C/H* carbon in free state; C/H# carbon in bounded state by glycosidic linkage.....	73
Fig. 6 - Effects of cell viability of human PBMC treated with consortian at different concentrations.....	74
Fig. 7 - Immunomodulatory profile of consortian on production of (a) $\text{TNF-}\alpha$ and (b) IL-6 by human PBMC cultures in 24 h assay.....	75

Metagenomic analysis of microbial diversity of a consortium of kefir producer consortian

Fig 1 - Venny diagrams of the unique and shared OTUs between the two biological replicates for V3-V4 region of bacterial 16S rDNA (A) and yeast ITS2 region (B).....	90
Fig 2 - Rarefaction curves considering sequences of V3-V4 region of bacterial 16S rDNA (A) and yeast ITS2 region (B). The curves were based on OTUs showing 97 % similarity.....	90
Fig 3 - Relative abundance at phylum level considering the bacterial community presented in the kefir grain BIONAT-I.....	92
Fig 4 - Relative abundance at family level considering the bacterial community presented in the kefir grain BIONAT-I.....	93
Fig 5 - Relative abundance at genus level considering the bacterial community presented in the kefir grain BIONAT-I.....	93
Fig 6 - Taxonomic tree at species level considering the bacterial community presented in the kefir grain BIONAT-I. Numbers at the nodes indicate bootstrap values (expressed as a percentage of 10000 replications).....	95
Fig 7 - Relative abundance at family level considering the yeast community presented in the kefir grain BIONAT-I.....	96
Fig 8 - Relative abundance at genus level considering the yeast community presented in the kefir grain BIONAT-I.....	97
Fig 9 - Taxonomic tree at species level considering the yeast community observed in the kefir grain BIONAT-I. Numbers at the nodes indicate bootstrap values (expressed as a percentage of 10000 replications).....	98

Isolamento, caracterização morfológica e diferenciação por restrição enzimática de micro-organismos de grãos do consórcio de kefir BIONAT-I

Figura 1 - Amplificação de uma região do gene 16S para os morfotipos 1 a 26 e de uma região ITS para os morfotipos 27 e 28.....	114
Figura 2 - Exemplo de perfil de restrição obtido por clivagem com a enzima <i>TaqI</i> de alguns dos morfotipos de colônias isoladas.....	115
Figura 3 - Dendrograma obtido pelo método UPGMA para os 11 grupos de bactérias formados após clivagem.....	116

LISTA DE TABELAS

Revisão Bibliográfica

Tabela 1 - Principais micro-organismos encontrados em kefir de água e leite...	27
Tabela 2 - Comparação entre pH e composição de ácidos e etanol em kefir de água e leite.....	35
Tabela 3 - Algumas aplicações para EPS.....	41
Tabela 4 - Comparação de diferentes tecnologias de sequenciamento de segunda geração.....	52

Structural characterization and immunomodulatory activity of Consortian, a novel exopolysaccharide extracted from kefir consortium grains

Table 1 - Retention times and the proportions of the methylated derivatives obtained from the EPS after acid hydrolysis.....	71
Table 2 - ^1H and ^{13}C chemical shifts of the units founded in the EPS obtained from fermentation of kefir grains in brown sugar.....	82

Metagenomic analysis of microbial diversity of a consortium of kefir producer consortian

Table1 - Sequencing data Illumina 2500 HiSeq involving biological replicates kefir grains BIONAT-I for 16S and ITS2 analysis.....	89
Table 2 - Some measurements of alpha diversity, including species richness estimators (Chao1 and ACE), community diversity indices (Shanon and Simpson) and Good's-coverage (97 % similarity).....	91

Isolamento, caracterização morfológica e diferenciação por restrição enzimática de micro-organismos de grãos do consórcio de kefir BIONAT-I

Tabela 1 - Contagem de UFC/mL do consórcio BIONAT – I em três diferentes meios de cultura.....	111
---	-----

Tabela 2 - Caracterização morfológica, coloração de Gram, morfologia e arranjo celular e teste de catalase das colônias isoladas do consórcio BIONAT – I.....	112
Tabela 3 - Agrupamento molecular dos 28 isolados do consórcio BIONAT-I.....	115

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACE	Abundance-based coverage estimators
ADSC	Células-tronco derivadas de tecido adiposo humano
aHDF	Fibroblastos dérmicos adultos humanos
ARDRA	Análise de Restrição do DNA Ribossômico Amplificado
ATCC	American Type Culture Collection
ATR	Attenuated total reflection
BAA	Bactérias ácido acéticas
BAL	Bactérias ácido lácticas
BSA	Albumina sérica bovina
CBA	Cytometric bead array
CYG	Chloramphenicol Yeast Glucose
dATP	Desoxiadenosina Trifosfatada
dCTP	Desoxicitidina Trifosfatada
ddATP	Didesoxiadenosina Trifosfatada
ddCTP	Didesoxicitidina Trifosfatada
ddGTP	Didesoxiguanosina Trifosfatada
ddNTP	Didesoxinucleotídeo Trifosfatado
ddTTP	Didesoxitimidina Trifosfatada
dGTP	Desoxiguanosina Trifosfatada
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTP	Desoxinucleotídeo Trifosfatado
DRX	Difração de raios X
dTTP	Desoxitimidina Trifosfatada
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
EPS	Exopolissacarídeo
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FTIR	Fourier transform infrared spectroscopy
GARP	Globally optimized alternating phase rectangular pulses
Gb	Gigabases
GC-MS	Gas chromatography–mass spectrometry

G-CSF	Granulocyte-colony stimulating factor
HEP-2	Linhagens de células de carcinoma de laringe humana
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulfonic acid
hFOB 1.19	Linhagens de osteoblastos fetais humanos
HSQC	Heteronuclear Single-Quantum Correlation
IFN- γ	Interferon gama
IL	Interleucina
ITS	Internal Transcribed Spacers
K-562	Linhagens de células de leucemia mielocítica crônica
LAB	Lactic acid bactéria
LPS	Lipopolissacarídeo
MCF-7	Linhagens de células de adenocarcinoma de mama humana
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MIP – 1 β	Macrophage inflammatory protein-1 β
MRB	Modificadores da resposta biológica
MRS	De Man, Rogosa and Sharpe
MTT	Brometo de [3-4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolol]
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NCI	National Cancer Institute
NMR	Nuclear Magnetic Ressonance
OTU's	Operational taxonomic units
pb	Pares de bases
PBMCs	Peripheral blood mononuclear cell
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PI	Propidium iodide
PLGA	Poli (ácido láctico-co-ácido glicólico)
rDNA	Ácido Desoxirribonucleico Ribossomal
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
rRNA	Ácido Ribonucleico Ribossomal
TGA	Thermogravimetric analysis
Th	Células T helper
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa

TSA	Tryptic Soy Agar
UFC	Unidades formadoras de colônias
UPGMA	Unweighted pair group method with arithmetic mean
UV-Vis	Espectroscopia no ultravioleta-visível
YGP	Yeast glucan particles
YPG	Yeast peptone glucose

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
2 OBJETIVOS	24
2.1 OBJETIVO GERAL	24
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3 REVISÃO DE LITERATURA	25
3.1 KEFIR	25
3.1.1 O que é, origem e distribuição no mundo	25
3.1.2 Microbiota	26
3.1.3 Bioquímica e propriedades terapêuticas	32
3.2 CARBOIDRATOS	36
3.2.1 Exopolissacarídeos	39
3.2.2 Principais EPS microbianos	41
3.2.3 EPS produzidos por kefir	45
3.3 MICROBIOLOGIA CLÁSSICA E O SURGIMENTO DE MÉTODOS MOLECULARES	46
3.4 GENES RIBOSSOMAIS	47
3.5 METAGENÔMICA E TÉCNICAS DE SEQUENCIAMENTO	49
3.5.1 Metagenômica do kefir	54
4 MATERIAL E MÉTODOS	56
4.1 CULTIVO DOS GRÃOS DE KEFIR	56
4.2 EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DO EPS	56
4.2.1 Extração e purificação do EPS do consórcio BIONAT-I	56
4.2.2 Caracterização estrutural do EPS	56
4.2.3 Atividade Biológica do EPS	56
4.2.4 Análise estatística	57
4.3 ANÁLISE METAGENÔMICA DO CONSÓRCIO BIONAT-I	57
4.3.1 Extração do DNA total	57
4.3.2 Amplificação dos genes 16S do rDNA bacteriano e ITS2 do rDNA fúngico	57
4.3.3 Preparo, sequenciamento e análise das bibliotecas	57
4.4 ISOLAMENTO E DIFERENCIAÇÃO POR RESTRIÇÃO ENZIMÁTICA DE MICRO-ORGANISMOS ISOLADOS DO CONSÓRCIO BIONAT-I	58

4.4.1 Isolamento de micro-organismos	58
4.4.2 Caracterização morfológica, coloração diferencial e teste de catalase	59
4.4.3 Diferenciação das colônias isoladas por restrição enzimática.....	59
5 RESULTADOS	60
5.1 STRUCTURAL CHARACTERIZATION AND IMMUNOMODULATORY ACTIVITY OF CONSORTIAN, A NOVEL EXOPOLYSACCHARIDE EXTRACTED FROM KEFIR CONSORTIUM GRAINS.	60
5.2 METAGENOMIC ANALYSIS OF MICROBIAL DIVERSITY OF A CONSORTIUM OF KEFIR PRODUCER CONSORTIAN	83
5.3 ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E DIFERENCIAÇÃO POR RESTRIÇÃO ENZIMÁTICA DE MICRO-ORGANISMOS DE GRÃOS DO CONSÓRCIO DE KEFIR BIONAT-I.	106
6 CONCLUSÕES	120
REFERÊNCIAS	121
APÊNDICE A – PATENTE DE INVENÇÃO: PROCESSO DE OBTENÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEO TIPO BETA-GLUCANA, EXTRAÍDO DE CONSÓRCIO MICROBIANO DO KEFIR, COM CARACTERÍSTICAS DE HIDROGEL SUPERABSORVENTE, AÇÃO CITOTÓXICA PARA LINHAGENS NEOPLÁSICAS, AÇÃO IMUNOMODULADORA E MATÉRIA-PRIMA PARA FILME POLIMÉRICO BIOATIVO.	132
ANEXO A – COMPROVANTE DO DEPÓSITO DA PATENTE	140

1 INTRODUÇÃO

Kefir é uma associação microbiana simbiote, que através de processo fermentativo, produz probióticos, que apresentam diversas funções benéficas à saúde. Os grãos gelatinosos são formados principalmente por exopolissacarídeos (EPS) produzidos pelos micro-organismos do consórcio e podem ser cultivados em diversos substratos, sendo os mais comuns o leite (kefir de leite) e a solução de açúcar mascavo (kefir de água). EPS microbianos são polímeros naturais e biodegradáveis, que apresentam diversas aplicações biotecnológicas nas indústrias alimentícia, farmacêutica, cosmética, biomédica, entre outras.

Cada cultura de kefir é única, e a garantia de suas características depende da interação entre todos os componentes do consórcio. Assim, as propriedades pertencentes aos grãos não são as mesmas dos componentes microbianos individuais, não sendo possível combinar os membros isolados de um consórcio visando obter um novo consórcio com a mesma funcionalidade.

Estudos cultivo dependente e independente indicam que a microbiota de kefir é formada basicamente por leveduras e bactérias ácido lácticas (BAL) e ácido acéticas (BAA). Entretanto essa microbiota é variável de cultura para cultura, além de também variar ao longo do tempo, de acordo com o substrato utilizado e das condições de cultivo, não obstante a funcionalidade como probiótico e os aspectos visuais das culturas são semelhantes.

A complexidade das interações microbiológicas dentro e fora dos grãos é outro fator que dificulta a elucidação da funcionalidade simbiótica do kefir. Neste sentido, o uso de técnicas moleculares, como a metagenômica, torna-se um instrumento útil para esta finalidade. Ademais a metagenômica pode apoiar o desenvolvimento de ferramentas genéticas de caracterização de populações ativas de kefir e seus produtos, sendo importantes para estabelecer o controle de qualidade de lotes, para exploração confiável deste probiótico único.

O consórcio de kefir BIONAT-I foi obtido pela triagem de diversos consórcios sendo este selecionado para uma maior produção de biomassa em meio hipertônico. A finalidade desta seleção foi obter consórcios com maior produção de EPS. Sendo este um procedimento não usual por parte dos consumidores habituais de kefir, espera-se que a partir das culturas iniciais haja uma mudança no perfil populacional

do consórcio selecionado, bem como uma eventual mudança no perfil do polissacarídeo produzido.

Biomateriais oriundos de EPS microbianos possuem diversas aplicações biotecnológicas, desta forma a caracterização de EPS produzido por consórcios probióticos é desejável, todavia, o conhecimento da comunidade microbiana envolvida no processo é chave para uma futura exploração biotecnológica; neste sentido a metagenômica possui um papel estratégico na exploração deste recurso. Assim, o presente trabalho visou elucidar, através de metagenômica, a composição microbiana do consórcio de kefir BIONAT-I e caracterizar o EPS obtido do consórcio.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o EPS do consórcio BIONAT-I e elucidar a composição microbiológica do consórcio por meio da análise de metagenômica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a caracterização química, física e estrutural do EPS do consórcio BIONAT-I;
- Avaliar a atividade biológica do EPS por meio da atividade citotóxica contra células de linhagens tumorais e atividade imunomoduladora em células mononucleares do sangue periférico;
- Realizar análise metagenômica do consórcio BIONAT-I e identificar os principais micro-organismos presentes na microbiota do consórcio;
- Isolar e agrupar, por amplificação e clivagem, micro-organismos do consórcio.

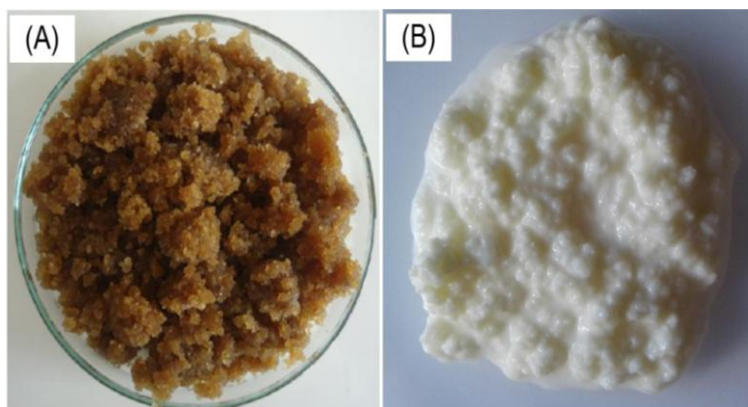
3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 KEFIR

3.1.1 O que é, origem e distribuição no mundo

Kefir é uma associação de micro-organismos, formada principalmente por bactérias e leveduras (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003) que, vivendo em simbiose, são responsáveis pelas fermentações láctica, alcoólica e acética do substrato (JIANZHONG et al., 2009). Apresenta-se macroscopicamente como grãos gelatinosos, de formato irregular e tamanhos variados entre 0,5 a 3,5 cm de diâmetro, e coloração também variável, de acordo com o substrato utilizado (**Figura 1**) (MARSHAL, 1993; WALDHERR et al., 2010). Os substratos mais empregados no cultivo são leite e solução de açúcar mascavo (MAGALHÃES et al., 2010).

Figura 1 - Grãos de kefir (A) de água (cultivados em solução de açúcar mascavo) e (B) de leite.



Fonte: O autor (2018).

O termo kefir tem origem do turco “keif” que significa “aquilo que causa prazer”, “bem estar” (KAUFMANN, 1997; OTLES e CAGINDI, 2003). O kefir, originário das montanhas do Cáucaso, Rússia, é utilizado na medicina popular há séculos pela população da região, sendo usado no controle e tratamento de diversas enfermidades (ZOURARI e ANIFANTAKIS, 1988).

A produção artesanal-familiar do kefir difundiu-se mundialmente, a partir do final do século XIX, tornando-se popular no início do século XX, quando cientistas começaram a estudar seu envolvimento com a melhoria da saúde e aumento da

longevidade (NEVE e HELLER, 2002; SHAVIT, 2008). Com essa difusão e devido aos seus significativos valores terapêuticos e nutricionais, o kefir passou a fazer parte da alimentação humana em muitas partes do mundo, incluindo sudoeste da Ásia, leste e norte da Europa, América do Norte, Japão (OTLES e CAGINDI, 2003).

O kefir já é conhecido no mundo inteiro e bastante consumido, já que é considerado um alimento funcional, tendência que vem sendo objeto de pesquisa intensa em ciência nutricional (FARNWORTH, 2005). Nos Estados Unidos da América, Canadá, Grã Bretanha, Austrália e diversos outros países, produtos alimentícios a base de kefir, como bebidas fermentadas e queijos, são produzidos industrialmente e amplamente comercializados (PRADO et al., 2015). Kefir não lácteo, produzido através de grãos em solução de açúcar mascavo e/ou frutas é amplamente consumido no México (MAGALHÃES et al., 2010).

No Brasil, até pouco tempo, sua fabricação e consumo eram exclusivamente artesanais. Atualmente o kefir já é encontrado industrializado, em forma de bebida fermentada à base de leite, leite de soja e suco de frutas. Contudo, a produção artesanal-familiar ainda é a forma mais comum de obtenção e utilização dos grãos, sejam de leite ou água (MARSH et al., 2013a). Nascimento (2017) fez uma seleção de consórcios de kefir de água, usando o critério de produção de biomassa em meio hipertônico. O consórcio que apresentou melhor desempenho foi designado de BIONAT-I.

3.1.2 Microbiota

Os grãos de kefir cultivados em leite e açúcar mascavo são semelhantes quanto à forma. Entretanto, a composição microbiana do kefir é variável, de acordo com a origem geográfica dos grãos, condições climáticas, método e substrato utilizados no cultivo (GARROTE, ABRAHAM e DE ANTONI, 2001; DOBSON et al., 2011; HAMET et al., 2013; MARSH et al., 2013b) assim, seu processo fermentativo pode resultar em produtos diferentes.

Em geral, bactérias ácido lácticas (BAL), bactérias ácido acéticas (BAA) e leveduras formam a microbiota do kefir (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003). Algumas espécies, entretanto, foram relatadas exclusivamente em kefir de água ou de leite. O quadro 1 mostra as principais espécies microbianas identificadas em kefir de água e leite, através de técnicas dependentes e independentes de cultivo.

Tabela 1 - Principais micro-organismos encontrados em kefir de água e leite.

Tabela 1 - Principais micro-organismos encontrados em kefir de água e leite.			
MICRO-ORGANISMOS	KEFIR DE ÁGUA	KEFIR DE LEITE	REFERÊNCIAS
BAA			
<i>Acetobacter</i>			
<i>A. aceti</i>	X		MAGALHÃES et al., 2010; MAGALHÃES et al., 2011; MIGUEL et al., 2011; LEITE et al., 2012; GULITZ et al., 2013; MARSH et al., 2013a; LAUREYS e VUYST, 2014; GAO et al., 2015
<i>A. cerevisiae</i>	X		
<i>A. fabarum</i>	X	X	
<i>A. ghanensis</i>	X		
<i>A. indonesiensis</i>	X		
<i>A. lovaniensis</i>	X	X	
<i>A. orientalis</i>		X	
<i>A. orleanensis</i>	X		
<i>A. peroxydans</i>	X		
<i>A. syzygii</i>	X		
<i>A. tropicalis</i>	X		
<i>Acinetobacter</i>			
<i>A. tjernbergiae</i>		X	GAO et al., 2013; ZAMBERI et al., 2016
<i>A. lwoffii</i>		X	
<i>A. jhonsonii</i>		X	
<i>Gluconacetobacter</i>			
<i>G. europaeus</i>	X		MIGUEL et al., 2011; GULITZ et al., 2013; MARSH et al., 2013a
<i>G. hansenii</i>	X		
<i>G. intermedius</i>	X		
<i>G. johannae</i>	X		
<i>G. kombuchae</i>	X		
<i>G. liquefaciens</i>	X		
<i>G. oboediens</i>	X		
<i>G. rhaeticus</i>	X		
<i>G. sacchari</i>	X		
<i>G. sacharivorans</i>	X		
<i>G. sucrofermentans</i>	X		
<i>G. swingsii</i>	X		
<i>Gluconobacter</i>			
<i>G. albidus</i>	X		GULITZ et al., 2013
<i>G. cerinus</i>	X		
<i>G. frateurii</i>	X		
<i>G. japonicus</i>	X		
<i>G. kanchanburiensis</i>	X		
<i>G. oxydans</i>	X		
<i>G. roseus</i>	X		
<i>G. sphaericus</i>	X		
<i>G. thailandicus</i>	X		

Tabela 1 - Continuação

BAL		
<i>Lactobacillus</i>		
<i>L. acidophilus</i>		X
<i>L. amylovorus</i>		X
<i>L. animalis</i>		X
<i>L. apis</i>		X
<i>L. aquaticus</i>	X	
<i>L. brevis</i>	X	X
<i>L. buchneri</i>		X
<i>L. casei</i>	X	X
<i>L. crispatus</i>		X
<i>L. delbrueckii</i>	X	X
<i>L. diolivorans</i>	X	
<i>L. faeni</i>		X
<i>L. gallinarum</i>		x
<i>L. gasseri</i>		X
<i>L. gigeriorum</i>		X
<i>L. harbinensis</i>	X	
<i>L. helveticus</i>	X	X
<i>L. hilgardii</i>	X	X
<i>L. hordei</i>	X	
<i>L. intestinalis</i>		X
<i>L. johnsonii</i>		X
<i>L. kefiranoferiens</i>	X	X
<i>L. kefiri</i>	X	X
<i>L. lactis</i>		X
<i>L. mali</i>	X	X
<i>L. nagelii</i>	X	X
<i>L. parabuchneri</i>	X	X
<i>L. paracasei</i>	X	X
<i>L. parakefiri</i>	X	X
<i>L. pentosus</i>		X
<i>L. plantarum</i>		X
<i>L. reuteri</i>		X
<i>L. rhamnosus</i>	X	X
<i>L. sakei</i>		X
<i>L. salivarius</i>		X
<i>L. satsumensis</i>	X	X
<i>L. sucicola</i>	X	
<i>L. taiwanensis</i>		X
<i>L. thailandensis</i>		X
<i>L. uvarum</i>	X	
<i>L. zeae</i>	X	

CHEN, WANG E CHEN, 2008;
MAGALHÃES et al., 2010; DOBSON
et al., 2011; MIGUEL et al., 2011;
LEITE et al., 2012; GAO et al., 2013;
GULITZ, et al., 2013; MARSH et al.,
2013a; MARSH et al., 2013b;
LAUREYS e VUYST, 2014;
NALBANTOGLU et al., 2014;
ZANIRATI et al., 2014; GAO et al.,
2015; GAROFALO et al., 2015;
ZAMBERI et al., 2016

Tabela 1 - Continuação

Lactococcus			MAGALHÃES et al., 2010;
<i>L. lactis</i>	X	X	NALBANTOGLU et al., 2014;
<i>L. garvieae</i>		X	GAROFALO et al., 2015
Leuconostoc			
<i>L. citreum</i>	X		
<i>L. holzapfeli</i>	X		
<i>L. holzapfelii</i>	X		MAGALHÃES et al., 2010; GAO et
<i>L. kimchii</i>	X		al., 2013; GULITZ et al., 2013;
<i>L. lactis</i>	X		MARSH et al., 2013a; MARSH et al.,
<i>L. mesenteroides</i>	X	X	2013b; NALBANTOGLU et al., 2014
<i>L. palmae</i>	X		
<i>L. pseudomesenteroides</i>	X		
Bifidobacterium			
<i>B. aquikefiri</i>	X		
<i>B. breve</i>		X	
<i>B. choerinum</i>		X	DOBSON et al., 2011; HSIEH et al.,
<i>B. crudilactis</i>	X		2012; LEITE et al., 2012; HSIEH et
<i>B. indicum</i>		X	al., 2012; GULITZ et al., 2013;
<i>B. longum</i>		X	LAUREYS e DE VUYST, 2014
<i>B. pseudolongum</i>		X	
<i>B. psychraerophilum</i>	X	X	
Oenococcus			
<i>O. oeni</i>	X	X	NALBANTOGLU et al., 2014;
<i>O. kitaharae</i>	X	X	ZANIRATI et al., 2014
Pediococcus			
<i>P. clausenii</i>		X	
<i>P. damnosus</i>		X	
<i>P. halophilus</i>		X	NALBANTOGLU et al., 2014;
<i>P. pentosaceus</i>		X	ZAMBERI et al., 2016
<i>P. argentinicus</i>		X	
<i>P. cellicola</i>		X	
Streptococcus			
<i>Streptococcus thermophilus</i>		X	GAO et al., 2015; ZAMBERI et al., 2016
Outras			
<i>Clostridium arbusti</i>	X		
<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	X		GULITZ et al., 2013; MARSH et al.,
<i>Sphingomonas sp.</i>		X	2013a; ZAMBERI et al., 2016
<i>Sporolactobacillus sp.</i>	X	X	
<i>Zymomonas sp.</i>	X		HSIEH et al., 2012

Tabela 1 - Continuação

LEVEDURAS			
Candida			
C. parapsilosis	X	X	MIGUEL et al., 2013
C. valdiviana	X	X	
Dekkera			
D. anomala	X	X	MIGUEL et al., 2013; GAROFALO et al., 2015; LAUREYS e DE VUYST, 2014
D. bruxelensis	X	X	
Hanseniaspora			
H. guillermonti		X	GAROFALO et al., 2015
H. valbyensis		X	
H. vineae		X	
Kazachstania			
K. aerobia		X	GAO et al., 2015; GAROFALO et al., 2015
K. exigua		X	
K. servazzii		X	
K. turicensis		X	
K. unispora		X	
K.solicola		X	
Kluyveromyces			
K. lactis	X		MAGALHÃES et al., 2010; MIGUEL et al., 2011
K. marxianus	X		
Lachancea			
L. fermentati	X		MIGUEL et al., 2011; GULITZ et al., 2013; MARSH et al., 2013a
L. meyersii	X		
Pichia			
P. anomala	X	X	MIGUEL et al., 2011; WANG et al., 2008; MIGUEL et al., 2013
P. fermentans	X	X	
P. guilliermondii	X	X	
Saccharomyces			
S. cerevisiae	X	X	MARSH et al., 2013a; MARSH et al., 2013b; LAUREYS e DE VUYST, 2014; GAO et al., 2015; GAROFALO et al., 2015;
S. eubayanus		X	
S. turicensis		X	
Zygosaccharomyces			
Z. fermentati	X	X	MARSH et al., 2013a; MIGUEL et al., 2011; MIGUEL et al., 2013
Z. lentus	X	X	
Z. mellis	X	X	

Normalmente uma grande diversidade de *Lactobacillus* é identificada, algumas das quais são relacionadas com kefir de água e de leite, como *L. kefir*, *L. kefirianofaciens* e *L. parakefir*. BAL são bactérias gram-positivas, em forma de cocos ou bacilos, microaerófilas, que excretam ácido láctico como o principal produto de fermentação. Além de serem essenciais na indústria alimentícia, na produção e

conservação de alimentos, são as bactérias de maior importância dentro do grupo das bactérias fermentadoras e são excelentes produtoras de bacteriocinas. Dentre os principais gêneros incluídos nesta classificação estão: *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Oeneococcus*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus* e *Bifidobacterium* (KLAENHAMMER, 1988; HAMMES e HERTEL, 1996; KLEIN et al., 1998; MAKAROVA et al., 2006).

Também importantes para a indústria de fermentação, na produção de vinagre, gluconato e papel de celulose, BAA produzem ácido acético a partir de etanol, sendo ainda capaz de oxidar vários açúcares, como glicose. São em geral bacilos gram-negativos, ocasionalmente gram variáveis, aeróbios estritos, tendo como principais representantes os gêneros *Glucanobacter* e *Acetobacter* (MATSUSHITA, TOYAMA e ADACHI, 1994; RUIZ et al., 2000).

O papel das leveduras no preparo de produtos fermentados é bastante consolidado. Elas têm a capacidade de fermentar carboidratos, produzindo CO₂ e etanol. Algumas leveduras presentes no kefir metabolizam o ácido láctico, principal produto de fermentação das BAL, aumentando o pH, mantendo o ambiente favorável para as BAL. Por serem as principais produtoras de CO₂ e etanol, são responsáveis por algumas características sensoriais da bebida fermentada pelo kefir (LATORRE-GARCÍA, DEL CASTILLO-AGUDO e POLAINA, 2007; WANG et al., 2008; BAI et al., 2010; WANG et al., 2012).

Alguns estudos avaliaram a distribuição dos micro-organismos nos grãos de kefir através de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Bottazzi e Blanchl (1980) identificaram apenas bastões curtos e poucas leveduras no exterior dos grãos de kefir de leite, e um aumento na proporção de leveduras à medida que as análises adentravam os grãos, sendo seu interior dominado por leveduras.

Guzel-Seydim et al. (2005) observaram que a porção exterior de grãos de leite foi formada por bacilos curtos, longos e curvos, leveduras e material fibrilar, que, possivelmente, é exopolissacarídeo (EPS). Penetrando nos grãos, observaram que a proporção de leveduras diminuiu e, no centro dos grãos, as leveduras não eram evidentes, não sendo observadas bactérias em forma de cocos em nenhuma parte do grão. Zhou et al. (2009) e Magalhães et al. (2011) observaram presença de células bacilares e leveduras na parte externa dos grãos de kefir de leite, e uma diminuição na densidade microbiana no interior dos grãos.

Wang et al. (2012) encontraram a superfície externa de grãos de kefir de leite bastante povoada por bacilos, cocos e leveduras e o interior dos grãos com menor densidade microbiana, composta basicamente por células de leveduras e bacilos maiores, o que foi semelhante à análise de grãos de kefir, realizada por Magalhães et al. (2010) em kefir de água. Nela foi visualizada uma porção externa dominada por leveduras em associação com bacilos longos e curtos e uma porção interna com menor quantidade de micro-organismos, havendo essencialmente células de leveduras.

Garofalo et al (2015) avaliaram a parte externa de grãos de kefir de leite de seis diferentes regiões da Itália, através de MEV. Nos grãos de Trentino Alto Ádige, observaram bacilos curtos cercando poucas leveduras; no kefir de Marche-Recanati havia leveduras cobrindo quase completamente a população bacteriana; nos grãos de Marche-Ascoli Piceno e Emília Romanha foram vistos maior quantidade de bacilos curtos e longos com algumas células de leveduras; no kefir da Sicília havia uma camada quase homogênea de bacilos curtos e longos e nos grãos da Úmbria, leveduras e bacilos longos foram observados, mostrando que todos os grãos eram diferentes na distribuição e abundância microbianas.

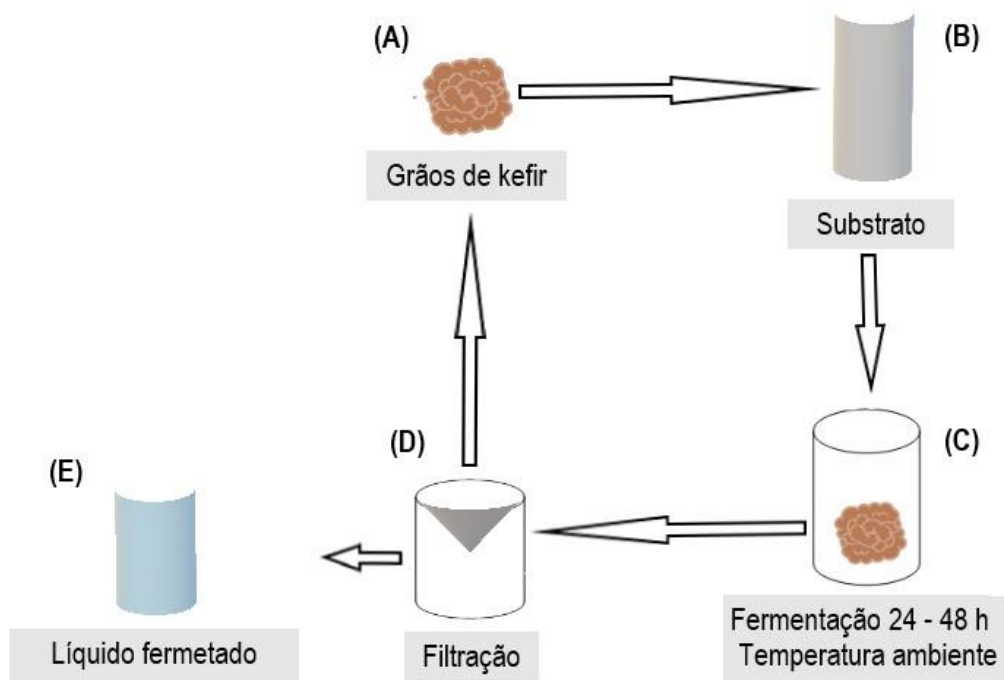
Hsieh et al. (2012) investigaram a importância do substrato na formação dos grãos de kefir. Para isso, grãos foram cultivados em solução de açúcar mascavo, leite de vaca e leite de cabra. Na superfície dos grãos de açúcar, houve alta densidade de leveduras, bacilos e alguns cocos. Já na superfície dos grãos cultivados nos leites, a composição foi diferente, sendo observado maior número de células bacterianas em comparação às de leveduras, com maior quantidade de cocos em relação aos grãos de água.

Tudo isso demonstrou uma grande variação, na diversidade de bactérias e leveduras, e como elas estão distribuídas em diferentes grãos de kefir. Estas diferenças observadas podem ser devido às variações de oxigênio e pH em diferentes partes dos grãos, e em diferentes substratos, favorecendo ou prejudicando o crescimento de determinados micro-organismos (GUZEL-SEYDIM et al., 2005; CHEN, WANG et al., 2009).

3.1.3 Bioquímica e propriedades terapêuticas

Os grãos de kefir, ao serem inseridos em um substrato rico em açúcar (leite, solução de açúcar mascavo, suco de frutas), realizam fermentação, formando uma bebida probiótica que contém compostos aromáticos, ácido láctico, ácido acético, CO₂ e pequena porcentagem de álcool (OTLES e CAGINDI, 2003; LOPITZ-OTSOA et al., 2003; WANG et al., 2008). Durante a fermentação, os grãos se multiplicam, aumentando de volume, transferindo suas propriedades às gerações seguintes, que servem como novo inóculo (**Figura 2**) (GARROTE, ABRAHAM e DE ANTONI, 2001). Já foram feitas tentativas de produzir grãos de kefir, a partir da combinação de culturas puras ou mistas normalmente presentes nos grãos, ainda sem sucesso. Isto se deve provavelmente ao pouco conhecimento sobre o mecanismo de formação dos grãos de kefir e a influência da combinação de diversos fatores no seu crescimento, como a troca do substrato em intervalos regulares, temperatura de cultivo e presença da concentração correta de nutrientes no meio (CHEN et al., 2009).

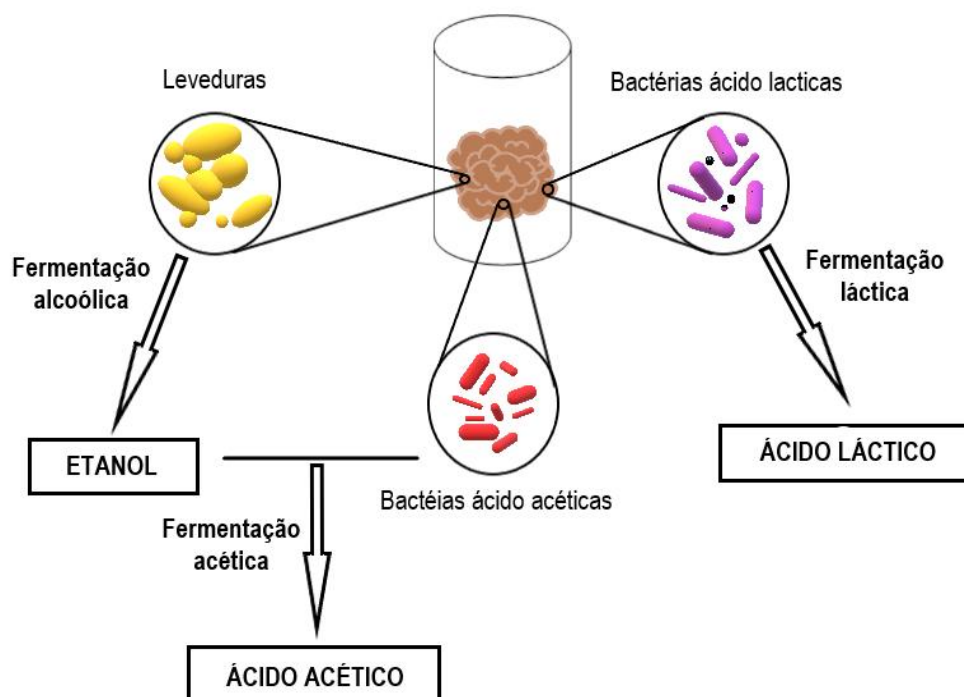
Figura 2 - Representação esquemática das etapas de cultivo do kefir. Os grãos de kefir (A) são adicionados ao substrato (B) e mantidos para a fermentação a temperatura ambiente por 24-48 h (C); após fermentação é feita a filtração (D), se obtendo o líquido fermentado (E). Um novo ciclo é então iniciado com os grãos.



Fonte: O autor (2018).

No kefir ocorrem três processos fermentativos. BAL convertem os carboidratos, como sacarose e lactose, em açúcares simples e ácido láctico. As leveduras fermentam os açúcares simples, como glicose e frutose, transformando-os em etanol. A partir do etanol, as BAA produzem ácido acético (**Figura 3**) (FIORDA et al., 2016).

Figura 3 - Diferentes processos de fermentação no kefir: leveduras realizam fermentação alcoólica, produzindo etanol; BAA utilizam o etanol para realizar fermentação acética, produzindo ácido acético; BAL realizam fermentação láctica, produzindo ácido láctico.



Fonte: O autor (2018).

Laureys e De Vuyst (2014) estudaram a cinética dos metabólitos de fermentação de kefir de água, utilizando a sacarose como substrato no início da fermentação. Ao final de 24 horas houve grande diminuição na quantidade de sacarose e glicose e essa diminuição de sacarose levou ao aumento da frutose, possivelmente devido à ação das BAL. Após 72 horas praticamente todo carboidrato havia sido consumido. A concentração de etanol aumentou linearmente até 72 horas, certamente pela ação das leveduras, que fermentaram a frutose, produzindo etanol. Ao longo do tempo, as concentrações de ácido láctico e ácido acético aumentaram, sendo este último devido à ação das BAA, na presença do etanol.

A composição final do líquido fermentado está sujeita a variações de acordo com alguns fatores, como tipo e qualidade do substrato utilizado (quantidade de

gordura do leite ou teor de carboidrato da solução de açúcar), composição microbiológica do grão e ainda método de cultivo utilizado (OTLES e CAGINDI, 2003). A *World Health Organization* (2003) preconiza a composição essencial de leite fermentado por grãos de kefir como um mínimo de 2,7% de proteínas, menos de 10% de gordura e um mínimo de 0,6% de ácido láctico. Laureys e De Vuyst (2014) mostraram a produção de metabólitos em kefir de água e Chen et al. (2009) fizeram análise química do leite fermentado por grãos de kefir (**Tabela 2**).

Tabela 2 - Comparação entre pH e composição de ácidos e etanol em kefir de água e leite.

PARÂMETROS	KEFIR ÁGUA ¹	KEFIR LEITE ²
pH	3,8	4,3
Ácido láctico (g.L ⁻¹)	2,3	4,7
Ácido acético (g.L ⁻¹)	0,8	Não relatado
Etanol (%)	0,6	0,05

Fonte: Laureys e De Vuyst (2014)¹; Chen et al. (2009)².

O líquido fermentado a partir de grãos de kefir também é rico em vitamina B1, vitamina B12, vitamina K, aminoácidos essenciais, ácido fólico, cálcio e outros minerais. Além disso, os níveis de lactose, na bebida de leite, diminuem e os da enzima β -galactosidase aumentam no processo fermentativo (OTLES e CAGINDI, 2003). A grande diversidade de micro-organismos que compõem o kefir torna-o um alimento funcional, pois auxiliam na ação contra patógenos, na manutenção da microbiota do trato gastro intestinal e no processo de digestão, conferindo benefícios à saúde humana, sendo considerado excelente probiótico (OTLES e CAGINDI, 2003).

Efeitos benéficos das bebidas fermentadas de kefir de água e leite, como ação anti-inflamatória (RODRIGUES, CARVALHO e SCHNEEDORF, 2005), antioxidante e antimutagênica (LIU, CHEN e LIN, 2005; ALSAYADI et al., 2013), antimicrobiana (GARROTE, ABRAHAM e DE ANTONI, 2000; CZAMANSKI, 2003, SILVA, RODRIGUES, et al., 2009), redução de intolerância à lactose (ALM, 1982) são relatados na literatura.

Grãos de kefir contêm em média, em sua composição, $82,5 \pm 1,8$ % de água, $5,6 \pm 1$ % de proteínas e $10,1 \pm 2,5$ % de carboidratos. Além disso, são formados pelos micro-organismos do consórcio envoltos pela matriz exopolissacarídica (ABRAHAM e DE ANTONI, 1999; GARROTE, ABRAHAM e DE ANTONI, 2001). Ao

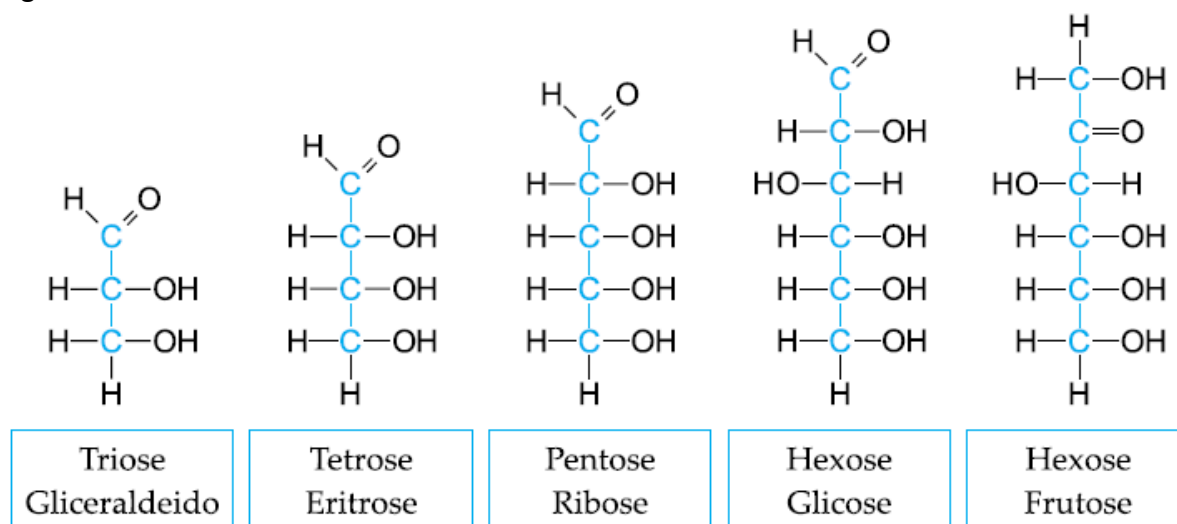
avaliar grãos de kefir por MEV, Hsieh et al. (2012) observaram uma camada de EPS, que auxiliou na adesão das leveduras e bactérias. Os EPS produzidos pelos micro-organismos do kefir envolvem a microbiota, mantendo sua estabilidade, sendo assim um fator importante na preservação (WANG et al., 2012).

3.2 CARBOIDRATOS

Carboidratos são biomoléculas essenciais em todos os organismos vivos. Estruturalmente são poli-hidroxialdeídos, poli-hidroxicetonas ou substâncias que hidrolisadas liberam estes compostos. Suas moléculas são constituídas, em geral, de átomos de carbono, hidrogênio e oxigênio, mas podem conter também nitrogênio, fósforo ou enxofre. Os carboidratos podem ser classificados, segundo o número de unidades componentes, como monossacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeo (NELSON e COX, 2017).

Os monossacarídeos, tipos mais simples de carboidratos, são formados por apenas uma unidade de poli-hidroxialdeídos (aldoses) ou poli-hidroxicetonas (cetoses). São nomeados trioses, tetroses, pentoses, hexoses ou heptoses, de acordo com seu número de átomos de carbono (**Figura 4**) (CORSINO, 2009).

Figura 4 - Monossacarídeos de três a seis carbonos.



Fonte: Corsino, 2009.

As hexoses, como glicose, manose, frutose e galactose são os carboidratos mais comumente encontrados na natureza. Todos os monossacarídeos, exceto a di-

hidroxiacetona, contêm um ou mais carbonos assimétricos e, deste modo, originam dois isômeros: D e L (**Figura 5**) (NELSON e COX, 2017).

Figura 5 - Dois isômeros de gliceraldeído: D-Gliceraldeído e L-Gliceraldeído. As linhas sólidas se projetam para fora do plano do papel, em direção ao leitor; linhas tracejadas se projetam atrás do plano do papel, longe do leitor.

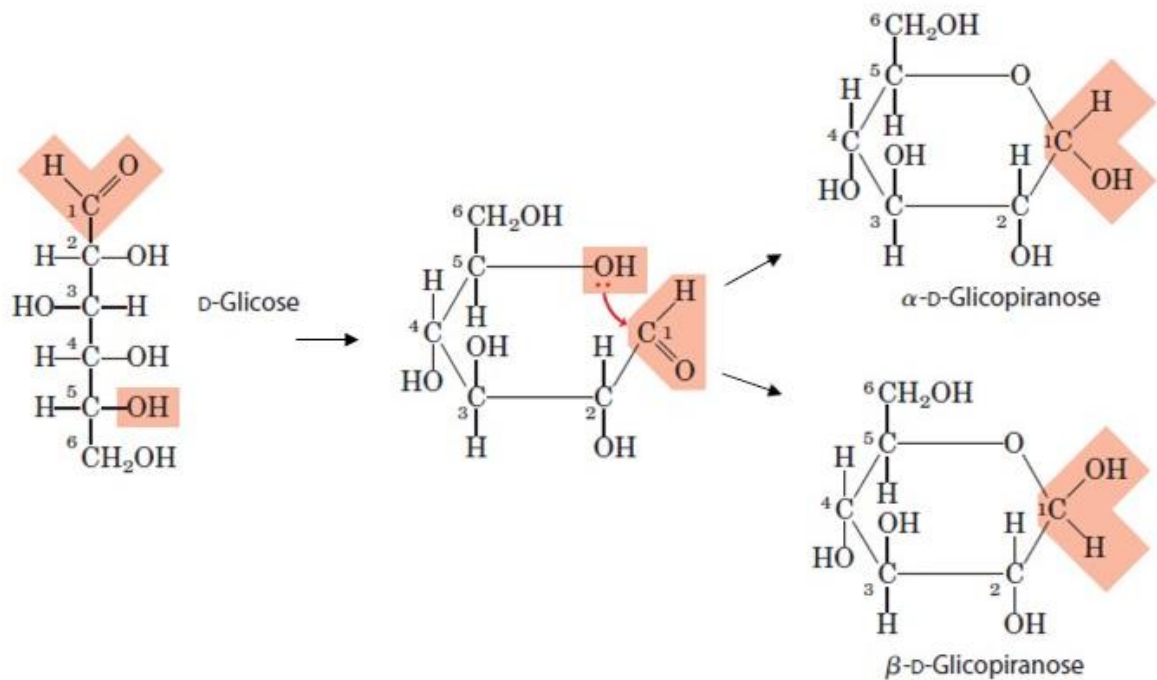


Fonte: Adaptado de Nelson e Cox, 2017.

As hexoses D-glicose, D-galactose, D-manose, D-frutose possuem a mesma fórmula molecular (C₆H₁₂O₆) e apesar disso, cada carboidrato é uma substância diferente. D-frutose é uma ceto-hexose e, portanto isômero de função das aldohexoses D-glicose, D-manose e D-galactose. Isômeros de função possuem mesma fórmula molecular, com diferença no grupo funcional. Glicose, manose e galactose são estereoisômeros, ou seja, possuem mesmas fórmulas moleculares e ligações químicas, com diferentes configurações. Por não serem imagens especulares uns dos outros, são considerados diastereoisômeros (NELSON e COX, 2017).

Monossacarídeos com quatro ou mais átomos de carbono tendem a formar estruturas cíclicas (MARZZOCO e TORRES, 2007). Esta forma cíclica se dá devido à reação entre o grupamento funcional (C1 nas aldoses e C2 nas cetoses) e um dos carbonos hidroxilados do restante da molécula, ocorrendo nas formas anoméricas α e β , conforme a posição da hidroxila do C1 (CORSINO, 2009). Quando, no anel, a hidroxila anomérica estiver do lado oposto que o grupo hidroxil ligado ao centro quiral mais distante, a estrutura é α ; quando estiver no mesmo lado a estrutura é β (**Figura 6**) (NELSON e COX, 2017).

Figura 6 - Formação de α -D-glicopirranose e β -D-glicopirranose, duas formas cíclicas da D-glicose.

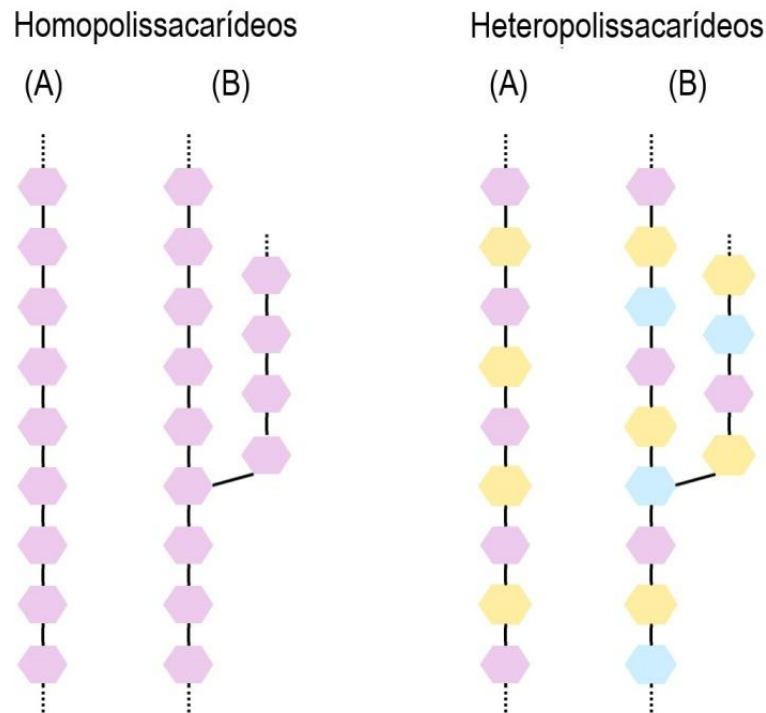


Fonte: Adaptado de Nelson e Cox, 2017.

Oligossacarídeos são polímeros curtos formados por poucas unidades de monossacarídeos, unidos por ligações glicosídicas. Os oligossacarídeos mais presentes na natureza são dissacarídeos, formados por duas unidades de monossacarídeos, como, por exemplo a sacarose, formada por monômeros de glicose e frutose (NELSON e COX, 2017).

Polissacarídeos são formados por mais de 20 unidades de monossacarídeos, podendo chegar a centenas ou milhares de unidades. Este tipo de carboidrato é o mais abundante na natureza. Os polissacarídeos podem possuir cadeias lineares, como a celulose ou ramificadas, como o amido (MARZZOCO e TORRES, 2007; NELSON e COX, 2017). Polissacarídeos podem conter somente um tipo de monômero, sendo classificados como homopolissacarídeos ou conter dois ou mais tipos de unidades monoméricas, sendo então heteropolissacarídeos (**Figura 7**) (NELSON e COX, 2017).

Figura 7 - Representação de homopolissacarídeos e heteropolissacarídeos (A) simples (B) ramificados.



Fonte: Adaptado de Nelson e Cox (2017).

Os polissacarídeos possuem diversas funções nos organismos vivos, tais como reserva energética (amido nos vegetais e glicogênio nos animais), função estrutural (celulose nos vegetais e quitina em exoesqueletos de animais). Eles podem formar ainda componentes de membranas quando ligados a lipídeos e proteínas (NELSON e COX, 2017).

Além de estar presentes em vegetais e animais, os polissacarídeos também apresentam funções importantes em bactérias. Algumas células procariontes produzem e excretam polissacarídeos, formando uma camada superficial externa (cápsula ou camada limosa). Estes são chamados exopolissacarídeos.

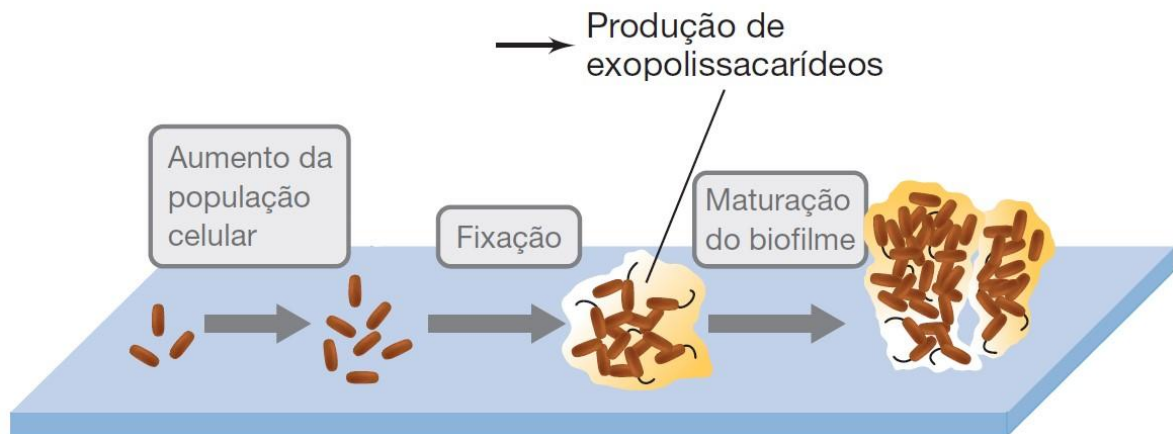
3.2.1 Exopolissacarídeos

EPS são polímeros de origem natural, sintetizados não apenas por micro-organismos, mas também por plantas e algas. Polímeros naturais têm se destacado, principalmente por serem biossustentáveis, utilizando recursos renováveis no seu processo de produção, por serem biodegradáveis e, muitas vezes, biocompatíveis

(DE VUYST et al., 2001; VU et al., 2009; REHM, 2010; DONOT et al., 2012; RUSSO et al., 2012; SCHMID, SIEBER e REHM, 2015).

EPS microbianos são secretados por micro-organismos, com principal função de proteção, sendo importante fator de virulência. As funções incluem também adaptação a condições extremas, prevenção contra desidratação das células, reserva de nutrientes e adesão a superfícies sólidas, formando biofilmes (**Figura 8**). *Pseudomonas aeruginosa*, por exemplo, através da excreção de EPS, forma um biofilme, que impede a penetração de antibióticos (MADIGAN et al., 2016).

Figura 8 - Representação esquemática das etapas de formação de biofilme bacteriano. À medida que a população celular aumenta, o mesmo acontece com a produção de EPS, necessário para a formação do biofilme.



Fonte: Adaptado de Madigan et al., 2016.

EPS microbianos possui a grande vantagem de ter sua produção em questão de dias, em comparação com meses no caso de plantas. Além disso, sua produção independe de condições climáticas (SOUZA e GARCIA-CRUZ, 2004). Estes EPS já são aplicados na indústria em diversas áreas (**Tabela 3**).

Tabela 3 - Algumas aplicações para EPS.

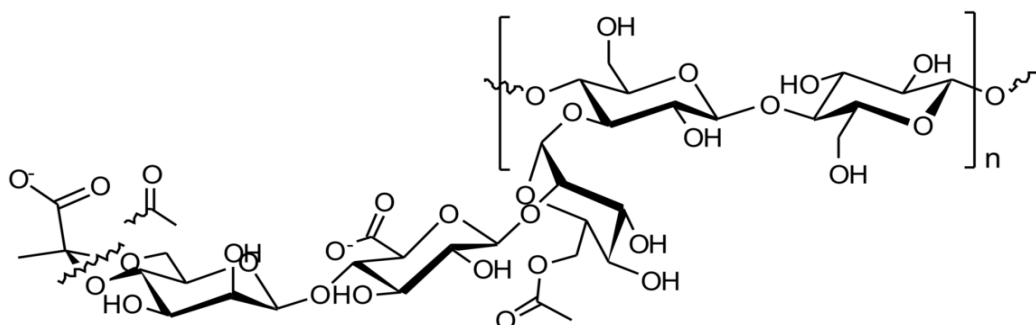
ÁREA	APLICAÇÃO
Alimentícia	Texturizante
	Estabilizante
	Espessante
	Agente gelificante
	Fibras dietéticas
	Produtos alimentares de baixa caloria
Farmacêutica	Sistema de entrega de drogas
	Sistema de liberação controlada de drogas
	Revestimento de drogas
Biomédica	Engenharia de tecidos
	Expansores de volume sanguíneo
	Aditivo em vacinas
	Suturas cirúrgicas
	Curativos para feridas
	Meios de cultura
Cosmética	Meios de cromatografia
	Agente hidratante
	Aditivos em loções
Outros	Indústria de papel
	Matriz imobilizadora de fertilizantes, nutrientes e pesticidas.

Fonte: De Vuyst et al. (2001); Fan et al. (2008); Liu e Chan-Park (2009); Rehm (2010); Nwodo, Green e Okoh (2012); Bajpai et al. (2016).

3.2.2 Principais EPS microbianos

Alguns EPS microbianos importantes são xantana, gelana e glucanas em geral (BOHN e BEMILLER, 1995; RAHAR et al., 2011; SCHMID, SIEBER e REHM 2015). A goma xantana é um polissacarídeo solúvel em água, muito utilizado em diversas áreas industriais, como indústria alimentícia, farmacêutica, cosmética, entre outras. Sua cadeia principal é constituída de 1-4- β -D-glicose com ramificações a cada dois anéis, em posição 3-1 de unidades de α -D-manose-6-acetilada, β -D-ácido glicurônico e β -D-ácido-4-6-manosil-pirúvico (**Figura 9**) (JANSSON, KENNE e LINDBERG, 1975; GARCÍA-OCHOA et al., 2000; LOPES et al., 2015; SCHMID, SIEBER e REHM 2015).

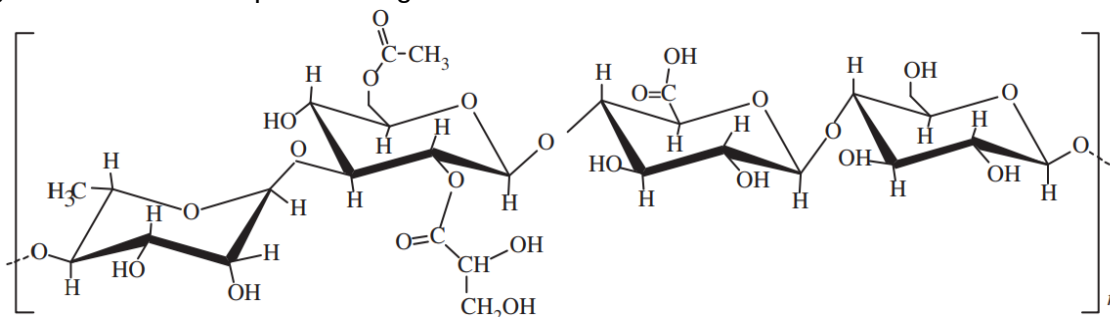
Figura 9 - Estrutura química de xantana



Fonte: Schmid, Sieber e Rehm (2015).

Gelana é um heteropolissacarídeo linear, formado por segmentos de 1,3-β-D-glicose, 1,4-β-D-ácido glicurônico, 1,4-β-D-glicose e 1,4-β-D-ramnose (**Figura 10**). *Pseudomonas* e *Sphingomonas* estão entre os gêneros produtores de gelana. É um poderoso agente gelificante, empregado na indústria alimentícia e também utilizado na indústria farmacêutica como excipiente no transporte de drogas (POLLOCK, 1993; MIYOSHI, TAKAYA e NISHINARI, 1998; VU et al., 2009, CORREIA et al., 2018).

Figura 10 - Estrutura química de gelana.



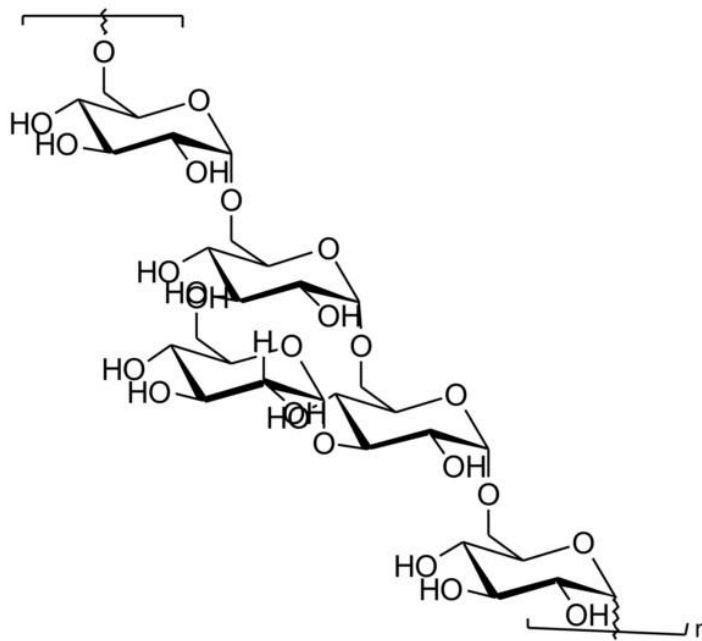
Fonte: Correia et al., 2018.

Glucanas microbianas são uma classe de EPS que podem ser isoladas de bactérias ou fungos, sendo bastante estudadas devido a suas ações biológicas. São polímeros de glicose, unidas por ligações glicosídicas, com configurações α ou β na cadeia principal. A α-glucana mais conhecida é dextrana. Dentre as β-glucanas mais estudadas estão curdlana e celulose bacteriana (BOHN e BEMILLER, 1995; RAHAR et al., 2011).

Dextranas são homopolissacarídeos de alto peso molecular, compostos por cadeias homogêneas de unidades de α-D-glicose, unidas por ligações α-1-6. Apresenta diversas ramificações nos pontos α-1,2, α-1,3 ou α-1,4 (**Figura 11**), apresentando assim, grande diversidade no comprimento da cadeia e em suas

propriedades. São produzidas principalmente por espécies dos gêneros *Leuconostoc* e *Streptococcus* (KHALIKOVA, SUSI e KORPELA, 2005; SCHMID, SIEBER e REHM, 2015).

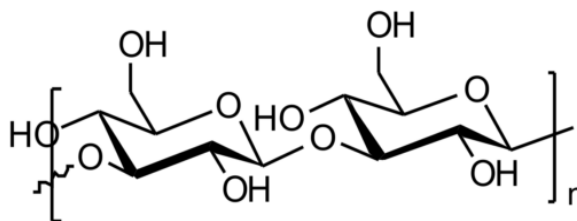
Figura 11 - Estrutura química de dextrana.



Fonte: Schmid, Sieber e Rehm (2015).

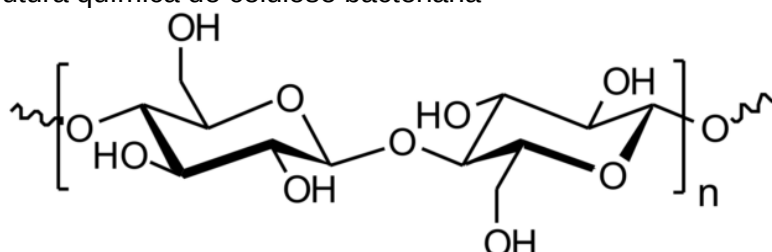
As β -glucanas são prebióticos, considerados alimentos funcionais (AHMAD et al., 2012). Alimentos funcionais são aqueles que produzem, além de suas funções nutricionais básicas, efeitos benéficos à saúde (BRASIL, 1999). Além disso, são compostos fisiologicamente ativos, chamados de modificadores da resposta biológica, que funcionam como imunoestimuladores (NOVAK, 2009).

Curdiana é um homopolissacarídeo linear de baixo peso molecular, formado principalmente de ligações 1,3- β -D-glicose (**Figura 12**). Produzidos principalmente por bactérias dos gêneros *Agrobacterium* e *Rhizobium*, possui a propriedade única de, numa suspensão aquosa aquecida a uma temperatura superior a 80 °C, formar um gel firme, resiliente e termo irreversível. O gel formado não derrete, mesmo em temperaturas superiores a 100 °C, sendo ainda estável contra congelamento e descongelamento (MIWA, NAKAO e NARA, 1994; KALYANASUNDARAM, DOBLE e GUMMADI, 2012; SCHMID, SIEBER e REHM, 2015).

Figura 12 - Estrutura química de curdlana

Fonte: Schmid, Sieber e Rehm (2015).

A celulose bacteriana é um polímero linear constituído exclusivamente de 1-4- β -D-glicose (**Figura 13**). Pode ser produzida por Alfaproteobacterias, Betaproteobactérias e Gamaproteobacterias, além de leveduras, entretanto, sua principal produção vem do gênero *Acetobacter*. É um componente importante em diversos biofilmes bacterianos. Já é aplicada na indústria alimentícia, como fibras insolúveis, e vem sendo estudada e aplicada como biomateriais, na cicatrização de feridas e engenharia de tecidos (KLEMM et al., 2001; REHM, 2010; NWODO, GREEN e OKOH, 2012; SCHMID, SIEBER e REHM, 2015).

Figura 13 - Estrutura química de celulose bacteriana

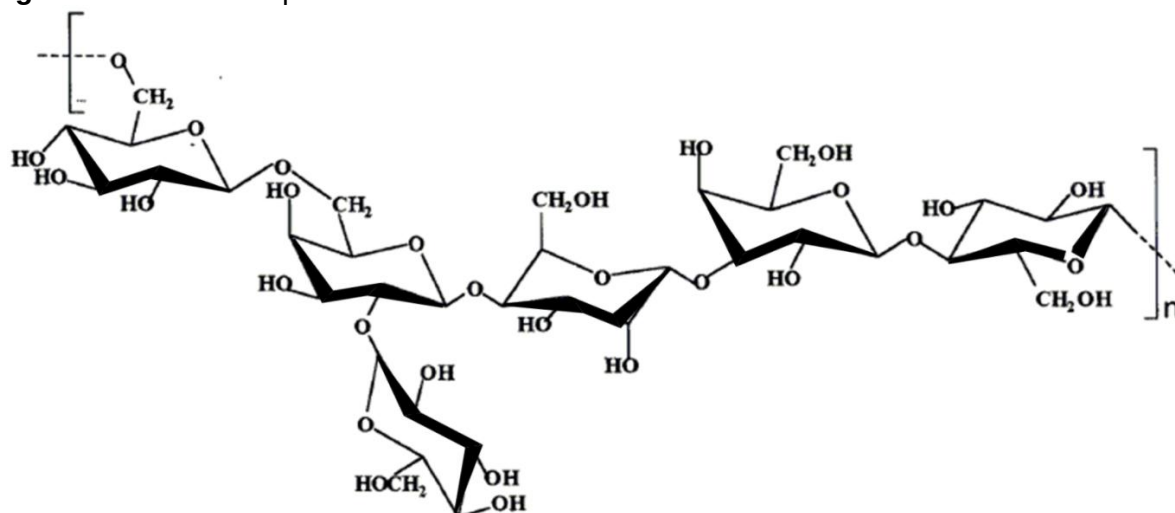
Fonte: Schmid, Sieber e Rehm (2015).

1,6- β -glucanas são normalmente encontradas na parede celular de fungos ascomicetos e basidiomicetos, como compostos insolúveis (VASCONCELOS et al., 2008; CUNHA et al., 2012). Vasconcelos et al. (2008) descreveram uma 1,6- β -glucana, chamada de lasiodiplodana, excretada por *Lasiodiplodia theobromae*. As ações da lasiodiplodana foram avaliadas em ratos, sendo observadas ausência de sinais de toxicidade e presença de atividade hipoglicemiante e redução das transaminases (TÚRMINA et al., 2012). Lasiodiplodana também apresentou atividade frente a linhagens de células de adenocarcinoma de mama humano (MCF-7) (CUNHA et al., 2012) e atividade anticoagulante (VASCONCELOS et al., 2013).

3.2.3 EPS produzidos por kefir

A composição química do EPS produzido pode variar, dependendo das condições de cultura dos micro-organismos produtores. O consórcio kefir também produz polissacarídeos, através de suas bactérias e leveduras. O EPS produzido pelo kefir de leite mais conhecido é a kefirana (**Figura 14**), um heteropolissacarídeo solúvel em água, formado por monômeros de glicose e galactose (glucogalactana) em proporções aproximadamente iguais (LA RIVIÈRE e KOOIMAN, 1967; FRENGOVA, BESHKOVA e SIMOV, 2002; MAEDA et al., 2004; SALAZAR et al., 2009; VU et al., 2009).

Figura 14 - Estrutura química de kefirana.



Fonte: Vu et al. (2009)

Estudos sobre atividades biológicas da kefirana já vem sendo realizados, mostrando sua ação anti-tumoral (MUROFUSHI, SHIOMI e AIBARA, 1983), anti-inflamatória (KWON et al., 2008), imunomoduladora (VINDEROLA et al., 2006), redutora da pressão arterial, colesterol e glicemia (MAEDA et al., 2004), antimicrobiana e cicatrizante (RODRIGUES et al., 2005), podendo ser usado como aditivo alimentar (PIERMARIA, LA CANALA e ABRAHAM, 2008) e na produção de embalagens comestíveis para alimentos (GHASEMLOU et al., 2011).

O kefir de água, entretanto, produz um homopolissacarídeo formado por monômeros repetidos de glicose unidos por ligações glicosídicas α -1-6, caracterizando uma α -D-dextrana (**Figura 11**) (HORISBERGER, 1969). Dextranas microbianas possuem ação anti-inflamatória e imunomodulatória (RIZOLI et al.,

2006) e são aplicadas em indústria alimentícia, farmacêutica e como meio cromatográfico (NWODO, GREEN e OKOH, 2012).

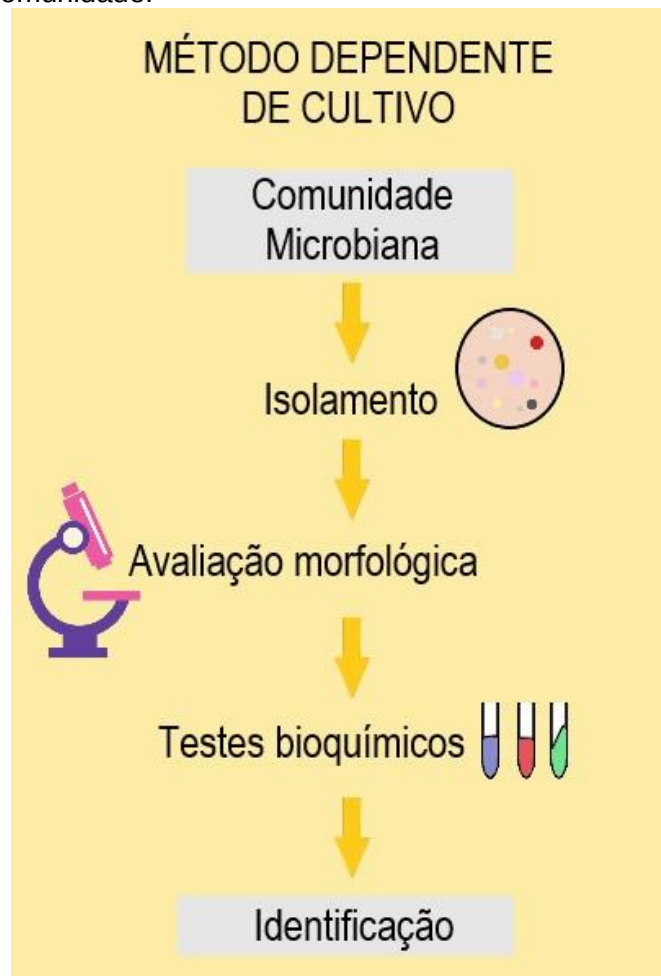
Nascimento (2017) extraiu EPS a partir do consórcio de Kefir BIONAT-I, entretanto este EPS não foi caracterizado. Já que o tipo e as propriedades do EPS dependem do micro-organismo que o produz, para compreender o real funcionamento do processo de produção de EPS pelo kefir, a elucidação de sua microbiota também é de extrema importância.

3.3 MICROBIOLOGIA CLÁSSICA E O SURGIMENTO DE MÉTODOS MOLECULARES

Durante muito tempo, a identificação microbiana e avaliação de sua diversidade dependiam dos métodos convencionais da microbiologia, que envolvem o isolamento dos microrganismos em culturas puras, cultivo em meios apropriados e sua caracterização morfofisiológica e bioquímica, com testes de detecção de enzimas e fermentação (**Figura 15**). (VANDAMME et al., 1996; GUARRO, GENÉ e STCHIGEL, 1999; GARRIDO-CARDENAS e MANZANO-AGUGLIARO, 2017).

Entretanto, sabe-se que maior parte da microbiota não é cultivável através das técnicas tradicionais de cultivo em laboratório; isso ocorre devido a requisitos de crescimento especializados (LORENZ e SCHLEPER, 2002; STREIT e SCHMITZ, 2004; LEE, 2005; GARRIDO-CARDENAS e MANZANO-AGUGLIARO, 2017). Determinados micro-organismos podem exigir condições de manejo e crescimento difíceis de mimetizar no laboratório e alguns podem não ser cultiváveis por sua interdependência rigorosa com outros micro-organismos. Ademais, nas técnicas de isolamento tradicionais, espécies que se apresentam em menor número competem pelo crescimento com espécies mais abundantes (HUGENHOLTZ, GOEBEL e PACE, 1998; LORENZ e SCHLEPER, 2002).

Figura 15 - Método dependente de cultivo (microbiologia clássica) na identificação da microbiota de uma comunidade.



Fonte: O autor (2018).

Por esses motivos, a pesquisa em microbiologia era muito limitada e grande parte da diversidade não podia ser estudada. No final da década de 1980 este cenário começou a mudar, com o início do uso de métodos moleculares, resultando em uma grande revolução no estudo da taxonomia, filogenia e ecologia de bactérias e fungos. A partir desse momento, o acesso à diversidade dos micro-organismos presentes em diferentes ambientes foi cada vez mais facilitado, dando suporte à teoria de que, a maior parte da microbiota do planeta é formada por micro-organismos não cultiváveis (HANDELSMAN, 2004).

3.4 GENES RIBOSSOMAIS

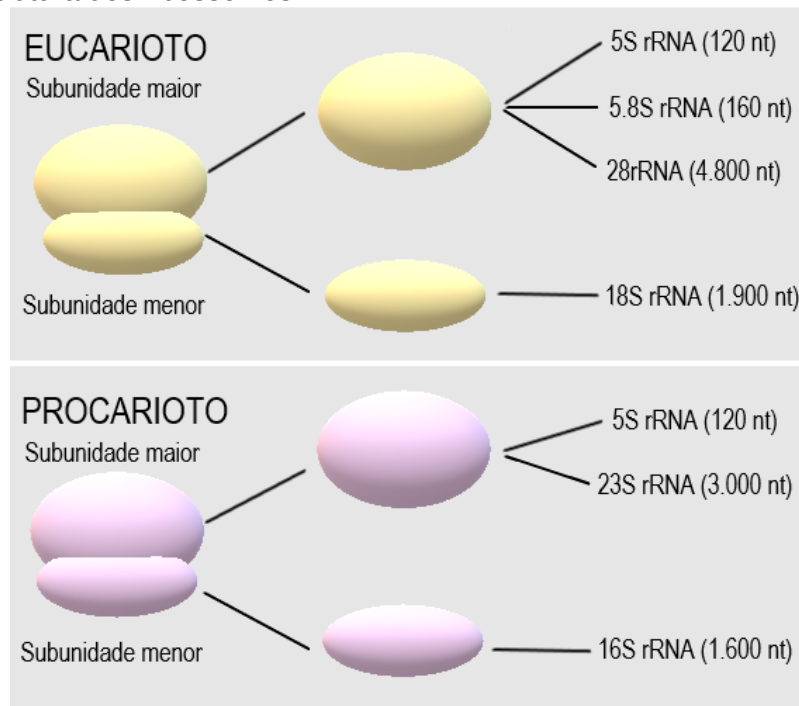
Com a descoberta de que os genes do RNA ribossomal (rRNA) carregavam informações preciosas em nível de evolução, foram feitas pesquisas que analisavam

diretamente sequências desses genes no meio ambiente, para descrever a microbiota de amostras ambientais livre de procedimento de cultivo.

Desde então, o rRNA é o melhor alvo para estudar taxonomia e relações filogenéticas, já que está presente em todos os organismos e possui domínios altamente conservados. Estes domínios são importantes para a definição de iniciadores universais e consequente alinhamento correto das sequências destas regiões. Estas regiões evoluem em taxas diferentes, o que permite a formação de relações filogenéticas, sejam elas mais próximas ou mais distantes (WOESE, 1987; PACE, 1997; DUNBAR et al., 1999).

Ribossomos são organelas formadas por uma subunidade maior e uma subunidade menor. Em eucariotos, a subunidade maior contém os rRNA 5S, com 120 nucleotídeos (nt), 5,8S, com 160 nt e 28S, com 4.800 nt; a subunidade menor contém o rRNA 18S, que apresenta 1.900 nt. Em procariotos, a subunidade maior é composta por rRNA 5S, com 120 nt e 23S, com aproximadamente 3.000 nt e a subunidade menor tem o rRNA 16S, com aproximadamente 1600 nt (**Figura 16**) (PACE, 1997; OLSEN et al., 1986; DOUDNA e RATH, 2002; HENRAS et al., 2008; TAYLOR et al., 2009; BEN-SHEM et al., 2010).

Figura 16 - Estrutura dos ribossomos.

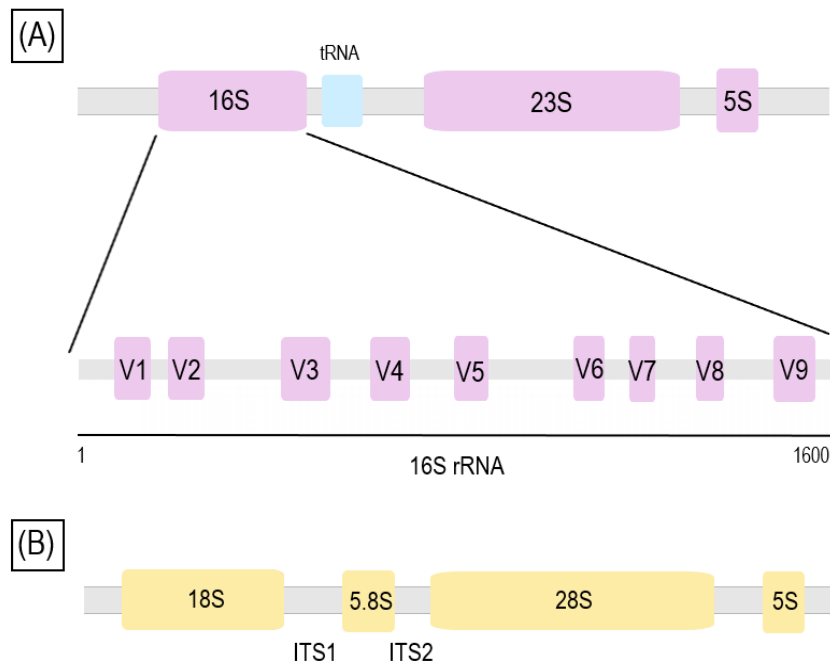


Fonte: O autor (2018).

O gene 16S de procariotos contém regiões conservadas, que estão presentes em todas as bactérias, e regiões hipervariáveis (V1 – V9), que funcionam como um “código de barras taxonômico” para determinados grupos ou espécies (**Figura 17A**). Este gene é amplamente utilizado para estimar taxonomia e relações filogenéticas de procariotos. O gene 23S também pode ser utilizado, inclusive como ferramenta complementar (STACKEBRANDT e GOEBEL, 1994; CAI, ARCHAMBAULT e PRESCOTT, 2003; GHOSH et al., 2012).

Já em fungos, as regiões 18S, 5,8S e 28S do rRNA são separadas por regiões espaçadoras internas transcritas (ITS) (**Figura 17B**). As ITS1 e ITS2 possuem sequências variáveis, sendo muito utilizadas para análises de diferenciação ou identificação de gêneros e espécies. O gene 18S também é aplicado em análises de taxonomia para fungos (DUDHAGARA et al., 2015; ABDELFATTAH et al., 2016; AHMED, 2016).

Figura 17 - Esquema representativo do rRNA procarioto e das regiões hipervariáveis do gene 16S rRNA (A), rRNA eucarioto (B).



Fonte: O autor (2018).

3.5 METAGENÔMICA E TÉCNICAS DE SEQUENCIAMENTO

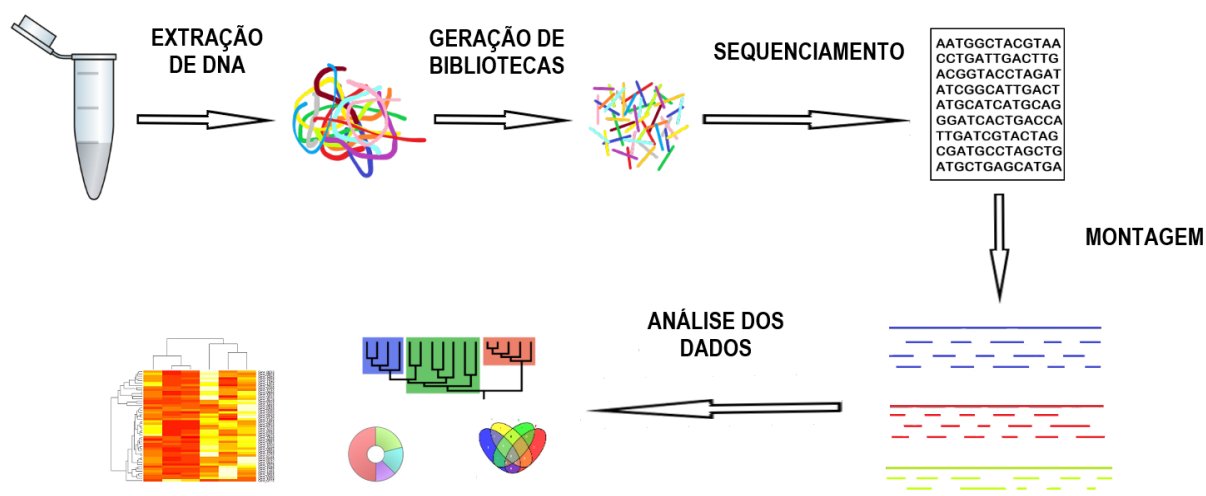
A possibilidade de analisar a população microbiana de um determinado ambiente em nível genômico gerou novas estratégias de pesquisa. Com avanços

tecnológicos em sequenciamento e o uso dos genes do rRNA como marcadores taxonômicos, diversas técnicas foram desenvolvidas, incluindo a metagenômica, que foi criada no início do século XXI (GARRIDO-CARDENAS e MANZANO-AGUGLIARO, 2017).

Metagenômica é uma análise genômica com o principal objetivo de determinação da população de uma comunidade microbiana, livre de procedimentos de cultivo. A ideia básica inicial da técnica era a extração de DNA de toda a microbiota, contendo informações genéticas sobre todos os micro-organismos, cultiváveis e não cultiváveis, da amostra (LORENZ e SCHLEPER, 2002; SCHLOSS e HANDELSMAN, 2003; HANDELSMAN, 2004; STREIT e SCHMITZ, 2004; LEE, 2005; GARRIDO-CARDENAS e MANZANO-AGUGLIARO, 2017).

Estudos de metagenômica incluem a extração direta de DNA de amostras complexas, construção de bibliotecas genômicas do rDNA, amplificação dos genes de interesse, sequenciamento, montagem das sequências e análise dos dados por bioinformática. Estas bibliotecas podem ser usadas tanto para avaliação de relações filogenéticas e de diversidade microbiana, como na investigação de novos genes e metabólitos. As sequencias genômicas geradas são exploradas em novas estratégias de bioprospecção de produtos bioativos, como antibióticos, enzimas, polissacarídeos, entre outros com diversas aplicações biotecnológicas (SCHLOSS e HANDELSMAN, 2003; STREIT e SCHMITZ, 2004; KUNIN et al., 2008).

Figura 18 - Fluxograma das etapas de uma análise metagenômica.



Fonte: O autor (2018).

Sequenciamento Sanger abriu os horizontes para as tecnologias em metagenômica. Neste sequenciamento, baseado no método de terminação da cadeia, os fragmentos gerados são utilizados como DNA molde, que são combinados com iniciadores, DNA polimerase, desoxinucleotídeos (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) e didesoxinucleotídeos (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP) marcados com diferentes fluoróforos (WOOLEY, GODZIK e FRIEDBERG, 2010).

Os didesoxinucleotídeos agem como terminadores de cadeia, impedindo a continuação da reação após sua inserção na fita de DNA. Esse processo gera fragmentos de DNA de tamanhos diferentes, que são separados por eletroforese. Os fluoróforos ligados aos terminadores são estimulados, sendo possível detectar em qual base cada fragmento termina. Conhecendo a última base de cada fragmento, a montagem das sequências é possível já que os fragmentos estão separados por tamanho (SANGER, NICKLEN e COULSON, 1977; SHENDURE e JI, 2008; WOOLEY, GODZIK e FRIEDBERG, 2010).

Com o rápido avanço das tecnologias de sequenciamento, as técnicas de segunda geração passaram a ser muito utilizadas. Algumas características, como o sequenciamento direto, sem processo de clonagem, em menor tempo e com menor custo e geração de grande quantidade de sequências de menor comprimento por corrida as diferenciam do sequenciamento Sanger. Dentre as plataformas de sequenciamento de segunda geração estão Roche - GS FLX 454, SOLiD™ system, Ion Torrent e Illumina HiSeq, todas consideradas tecnologias de alto rendimento, tendo em comum a capacidade de produzir milhares de sequências, apresentando assim, uma maior cobertura na diversidade de comunidades complexas em relação à técnica de Sanger (GOODWIN, MCPHERSON, MCCOMBIE, 2016; KAMPS et al., 2017). A **Tabela 4** mostra uma comparação das principais tecnologias de sequenciamento de segunda geração.

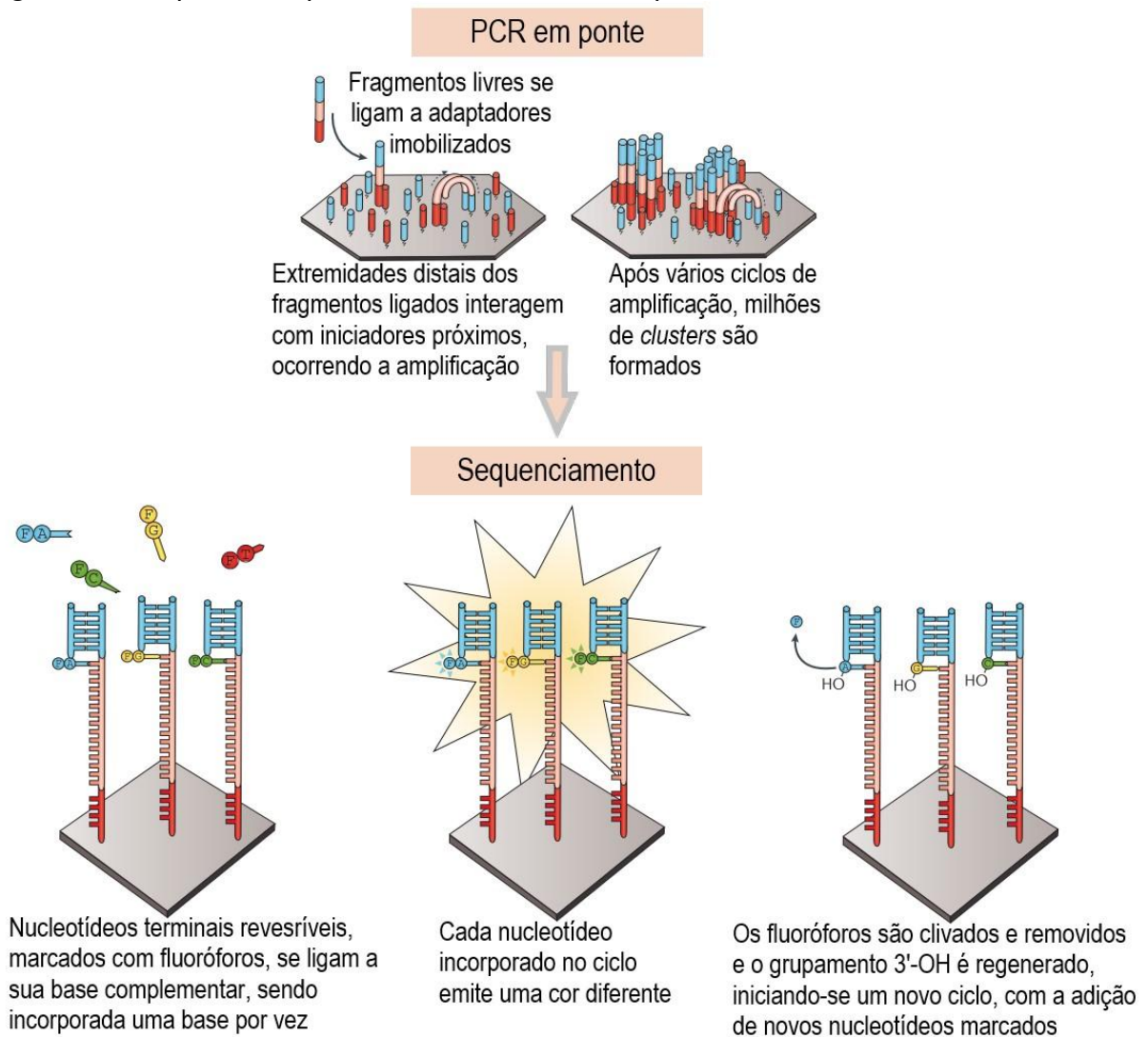
Tabela 4 - Comparação de diferentes tecnologias de sequenciamento de segunda geração.

PLATAFORMA	TIPO DE SEQUENCIAMENTO	TEMPO DE CORRIDA	COMPRIMENTO MÁXIMO	RENDIMENTO POR CORRIDA
Roche - GS FLX 454	Pirosequenciamento	10 horas	400 pb	0,5 - 1 Gb
Illumina - HiSeq	Síntese com terminadores de cadeia reversível	10 horas - 11 dias	2 x 150 pb	15 - 500 Gb
SOLiD	Sequenciamento por ligação	6 - 10 dias	75 pb	80 - 320 Gb
Ion Torrent - Proton	Sequenciamento por semicondutor	4 - 6 horas	500 pb	12 - 88 Gb

Fonte: Adaptado de Goodwin, McPherson, McCombie (2016); Kamps et al. (2017).

Na plataforma Illumina HiSeq, fitas de DNA são ligadas a adaptadores imobilizados em uma fase sólida, sendo amplificados por PCR em ponte (*bridge PCR*), de modo a formar colônias (*clusters*). Cada *cluster* contém milhões de cópias do fragmento original, sendo suficiente para produção da intensidade de sinal detectável durante o sequenciamento. A técnica se baseia em um sequenciamento de terminação de cadeia reversível, onde o grupamento 3'-OH da pentose é bloqueado quimicamente de forma reversível, impedindo temporariamente o alongamento da cadeia. Desoxinucleotídeos (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) marcados com fluoróforos quimicamente cliváveis e 3' bloqueados são adicionados à placa, sendo polimerizado um nucleotídeo por vez. A fluorescência do nucleotídeo adicionado é captada e então o terminal de bloqueio, junto com o marcador fluorescente, é removido, permitindo um novo ciclo (**Figura 19**) (MARDIS, 2008; SHENDURE e JI, 2008; GOODWIN, MCPHERSON e MCCOMBIE, 2016).

Figura 19 - Etapas do sequenciamento Illumina HiSeq.



Fonte: Adaptado de Goodwin, McPherson e McCombie (2016).

Após o sequenciamento alguns passos como montagem, anotação e análise de dados, são realizados por ferramentas de bioinformática. Ao utilizar sequências de rDNA como marcador molecular para a identificação de organismos, uma busca de sequências similares às obtidas na análise de metagenômica, em bancos de dados de nucleotídeos, de domínio público, deve ser realizada (CHUN et al., 2007; SCHOLZ, LO e CHAIN, 2012).

Uma grande vantagem da metagenômica, além de não necessitar de procedimentos de cultivo, é a possibilidade de estudar e entender os micro-organismos em seu ambiente natural, explorando como as comunidades complexas funcionam e como os micro-organismos interagem entre si e com o ambiente, de maneira complexa (GARRIDO-CARDENAS e MANZANO-AGUGLIARO, 2017).

3.5.1 Metagenômica do kefir

A natureza simbiótica da microbiota do kefir torna difícil a identificação e o estudo de sua composição microbiana, já que grande parte dos micro-organismos constituintes do consórcio, quando isolados, não crescem ou tem atividade bioquímica diminuída (VARDJAN et al., 2013). Pesquisas utilizando ferramentas moleculares foram realizadas, levando a um melhor entendimento da diversidade microbiana que compõe o kefir (FARNWORTH, 2005; VARDJAN et al., 2013; POGAČLČ et al., 2013). O primeiro estudo da microbiota do kefir por metagenômica foi realizado por Dobson et al. (2011) utilizando pirosequenciamento para avaliar a constituição de bactérias presentes em kefir de leite originário da Irlanda, sendo encontradas nove famílias diferentes na composição, sendo Lactobacillaceae a mais abundante. Um ano mais tarde, Leite et al. (2012) analisaram, também por pirosequenciamento, as bactérias presentes em grãos de kefir de leite de três diferentes localidades do Brasil, obtendo também Lactobacillaceae como a principal família presente no kefir.

Marsh et al., (2013b) foram os primeiros a estudar, além das bactérias, a composição de leveduras de kefir de leite, utilizando, para isso, pirosequenciamento em grãos originários da Irlanda, Reino Unido, Estados Unidos, Espanha, França, Itália, Canadá e Alemanha. Eles observaram que a composição bacteriana dos grãos era formada predominantemente pelos gêneros *Lactobacillus* e *Acetobacter*. Já a composição de leveduras tinha como gêneros predominantes *Kazachstania* e *Naumovozyma*. Além de pirosequenciamento, a microbiota do kefir de leite, de diversos países do mundo, também já foi estudado por outros métodos de sequenciamento, como as plataformas Sanger e Illumina (GAO et al., 2013; NALBANTOGLU et al., 2014; ZANIRATI et al., 2015; GAROFALO et al., 2015; ZAMBERI et al., 2016; WALSH et al., 2016; DERTLI e ÇON, 2017).

Pesquisas sobre a elucidação da microbiota de kefir de água por metagenômica são menos frequentes. Em 2013, Gultiz et al. realizaram a análise metagenômica de bactérias presentes em grãos de kefir de água de quatro diferentes regiões da Alemanha por pirosequenciamento, encontrando alta frequência da família Lactobacillaceae. Marsh et al. (2013a) encontrou Sphingomonadaceae como a família mais frequente em seu estudo de

metagenômica, também utilizando pirosequenciamento, em kefir de água do Canadá, Reino Unido e Estados Unidos. A plataforma Sanger também foi utilizada para avaliar a composição de BAL em kefir de água de dois estados Brasil, mostrando *Lactobacillus* e *Lactococcus* como os principais gêneros de BAL presentes (ZANIRATI et al., 2015).

Os resultados de estudos realizados, utilizando diversas abordagens, com o objetivo de identificar a composição microbiana de grãos de kefir mostram que, além de complexa, a microbiota é bastante variável. A metagenômica é uma boa ferramenta, que permite a elucidação da microbiota cultivável e não cultivável presente em culturas de kefir. Portanto, este trabalho se justifica por elucidar, através de metagenômica, a microbiota que compõe o kefir BIONAT-I, ao mesmo tempo que caracteriza o EPS obtido a partir dos seus grãos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CULTIVO DOS GRÃOS DE KEFIR

Os grãos de kefir foram obtidos de consumidores no estado do Paraná, Brasil e mantidos à temperatura ambiente usando uma solução aquosa a 50% (p / v) de açúcar mascavo como substrato, que foi trocado a cada 48 horas. A cultura foi selecionada para produção de biomassa, resultando no consórcio BIONAT-I.

4.2 EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DO EPS

4.2.1 Extração e purificação do EPS do consórcio BIONAT-I

Para extração do EPS, grãos consórcio de kefir BIONAT-I foram clareados e moídos. Foi então realizada uma extração a partir de um extrator alcalino e posterior precipitação com etanol. O teste de Molisch foi utilizado para a detecção de carboidratos. Para avaliar a pureza do EPS extraído foi feita a análise de açúcar total pelo método fenol ácido sulfúrico e a detecção de proteínas contaminantes pelo método de Bradford.

4.2.2 Caracterização estrutural do EPS

A caracterização estrutural do EPS foi realizada através de análises de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), análise termogravimétrica (TGA), análise de composição de monossacarídeos e análise de metilação através de cromatografia gas-líquido/ espectrometria de massa (GCMS) e espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN).

4.2.3 Atividade Biológica do EPS

Para avaliar a atividade biológica do EPS foi feito o isolamento de células mononucleares do sangue periférico (PBMC), cultura de linfócitos e estimulação in vitro com o EPS, análise da viabilidade celular e medição da produção de citocinas usando o kit Cytometric Bead Array (CBA).

4.2.4 Análise estatística

Os dados foram analisados por meio de testes não paramétricos. Antes da análise, os dados das amostras foram avaliados utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnov para indicar se as amostras apresentavam distribuição gaussiana. Para detectar as diferenças entre os grupos, foi utilizado o teste de Wilcoxon. Todos os resultados foram expressos como média $\pm$ DP e um valor de $p \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Todos os gráficos e resultados foram realizados no software GraphPad Prism (versão 8.0).

4.3 ANÁLISE METAGENÔMICA DO CONSÓRCIO BIONAT-I

4.3.1 Extração do DNA total

DNA foi extraído com o kit Gentra® Puregene® Yeast / Bact (Qiagen®, EUA), seguindo as instruções do fabricante e purificado utilizando a técnica de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico. O DNA purificado foi quantificado e sua pureza analisada usando um espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, USA).

4.3.2 Amplificação dos genes 16S do rDNA bacteriano e ITS2 do rDNA fúngico

Para a amplificação por PCR da região V3-V4 do gene bacteriano 16S do rDNA, os iniciadores 341F (5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-3') e 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') foram utilizados, e para a amplificação da região espaçadora interna transcrita (ITS2) de fungos, os iniciadores ITS3 (5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') foram aplicados. As reações de PCR foram realizadas utilizando o kit High-Fidelity Phusion® (New England Biolabs, Ipswich, EUA). Os produtos de PCR foram observados em gel de agarose a 2% (p / v) e purificados com o kit Qiagen Gel Extraction (Qiagen, Alemanha).

4.3.3 Preparo, sequenciamento e análise das bibliotecas

Foram geradas duas réplicas biológicas de cada biblioteca de sequenciamento, utilizando o kit TruSeq® DNA PCR-Free Sample Preparation (Illumina, USA), seguindo as recomendações do fabricante. A qualidade das bibliotecas foi avaliada com o Fluorômetro Qubit @ 2.0 (Thermo Scientific) e o sistema Agilent Bioanalyzer 2100. As bibliotecas foram sequenciadas em uma plataforma Illumina 2500 HiSeq (GenOne Biotechnologies, Brasil). Os softwares FLASH, QIIME™ (V1.7.0), UCHIME e Uparse (V7.0.1001) foram utilizados no tratamento das sequências geradas, dando origem às unidades taxonômicas operacionais (OTUs). O número de OTUs compartilhadas entre as réplicas foi comparado usando a ferramenta Venny 2.1.0. As OTUs foram anotadas com base em bancos de dados NCBI (RefSeq Targeted Loci Projects: RNA ribossomal 16S bacteriano, PRJNA33175; RNA espaçador interno fúngico transcrito (ITS), PRJNA224725). Alinhamentos múltiplos baseados nas seqüências "Core Set" do banco de dados NCBI foram realizados com o software MEGA6 para gerar árvores taxonômicas.

Os dados normalizados foram utilizados para realizar análises de diversidade alfa, através dos índices, de riqueza da comunidade [Chao1 e estimador de cobertura baseados em abundância (ACE)], índices de diversidade da comunidade (índices de Shannon e Simpson) e o estimador Good's Coverage. Todos os índices foram calculados com QIIME™ (V1.7.0) [17] e exibidos com o software R (V2.15.3). As curvas de rarefação foram geradas com base nesses índices.

4.4 ISOLAMENTO E DIFERENCIAÇÃO POR RESTRIÇÃO ENZIMÁTICA DE MICRO-ORGANISMOS ISOLADOS DO CONSÓRCIO BIONAT-I

4.4.1 Isolamento de micro-organismos

O isolamento de micro-organismos foi feito através de plaqueamento de diluições seriadas (10^{-5} a 10^{-8}), em triplicata, em três diferentes meios de cultura: Tryptic Soy Agar (TSA) (HIMEDIA), não seletivo; De Man, Rogosa and Sharpe Agar (MRS) (HIMEDIA) para bactérias ácido-láticas, sendo estas culturas incubadas em jarros de anaerobiose e Chloramphenicol Yeast Glucose Agar (CYG) (HIMEDIA), seletivo para leveduras. As placas foram incubadas e foi realizada a contagem de

Unidades Formadoras de Colônias (UFC). Os isolados foram purificados através de semeio por esgotamento e armazenados.

4.4.2 Caracterização morfológica, coloração diferencial e teste de catalase

As colônias isoladas foram classificadas em diferentes morfotipos e caracterizadas através de coloração de Gram e teste de catalase.

4.4.3 Diferenciação das colônias isoladas por restrição enzimática

Inicialmente foi feita a extração de DNA das colônias isoladas, utilizando o kit Gentra® Puregene Yeast/Bact (Qiagen®, USA), seguido de amplificação por PCR. Para o gene 16S de bactérias foi utilizando o par de iniciadores 16S *forward* (5'-CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 16S *reverse* (5'-CCCGGGATCCAAGCTTACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'). O programa de amplificação usado foi: 1 x (94 °C por 3 minutos), 30 x (94 °C por 30 segundos, 56 °C por 30 segundos e 72 °C por 2 minutos) e 1 x (72 °C por 5 minutos). Para o gene ITS de leveduras foi utilizando o par de iniciadores ITS1 (5'-CTTGTTCAATTTAGAGGAAGTAA-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), com o programa de amplificação de: 1 x (95 °C por 5 minutos), 30 x (94 °C por 30 segundos, 50 °C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos) e 1 x (72 °C por 7 minutos).

Os fragmentos amplificados nas reações foram clivados com enzima *TaqI*. Os produtos de clivagem foram analisados em géis de poliacrilamida a 3,5 %. Os padrões de clivagem obtidos foram comparados entre si, a fim de serem diferenciados os morfotipos de bactérias e leveduras isoladas. A partir da utilização de uma matriz de presença e ausência foi gerado um dendograma com o método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean*), utilizando o software DARwin 6.0.15.

5 RESULTADOS

5.1 STRUCTURAL CHARACTERIZATION AND IMMUNOMODULATORY ACTIVITY OF CONSORTIAN, A NOVEL EXOPOLYSACCHARIDE EXTRACTED FROM KEFIR CONSORTIUM GRAINS.

Rafael J. S. A. Padilha^a, Natália Almeida Onofre-Cordeiro^b, Regina S. Picasso^a, Paulo A. G. Soares^c, Paulo A. S. Mourão^c, Cristiane M. L. Melo^d, Virgínia M. B. Lorena^d, Ederson Akio Kido^b, Cláudia S. A. Lima^a, Ricardo Yara^{e,*}.

^aLaboratório de Biofísica Química, Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Professor Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, 50670-901, Recife, PE, Brazil. E-mail address (Regina): pisire@gmail.com. E-mail address (Rafael): rafaeljsap2@gmail.com. E-mail address (Claudia): claudia.salima@gmail.com.

^bLaboratório de Genética Molecular, Departamento de Genética, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Professor Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, 50670-901, Recife, PE, Brazil. E-mail address (Natália): natiaonofre@gmail.com. E-mail address (Ederson): kido.ufpe@gmail.com.

^cLaboratório de Tecido Conjuntivo, Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Av. Professor Rodolpho Paulo Rocco, 255, 21941-913, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. E-mail address (Paulo Soares): paulogsoares@hucff.ufrj.br. E-mail address (Paulo Mourão): pmourao@hucff.ufrj.br.

^dLaboratório de Imunoparasitologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM, Fiocruz-PE), Av. Professor Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, 50670-420, Recife, PE, Brazil. E-mail address (Claudia) cristianemout@gmail.com. E-mail address (Virgínia): lorena@cpqam.fiocruz.br.

^eDepartamento de Engenharia Biomédica, Centro de Tecnologia e Geocências, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Professor Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, 50670-901, Recife, PE, Brazil.

*Corresponding author at: Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Engenharia Biomédica, Av. Professor Moraes Rego, s/n, 50670-901, Recife, PE, Brazil. Tel.: +55 81 21267818. E-mail address: ricardo.yara@gmail.com.

ABSTRACT

Microbial exopolysaccharides have been the source of several studies, since they are renewable and frequently present bioactivity. The microbial biofilm from kefir produces exopolysaccharides traditionally extracted in aqueous medium under heat and have already shown in previous studies antimicrobial, antioxidant and antitumor activities. Recognizing the benefits of kefir, this study aimed to characterize a purified

exopolysaccharide obtained by alkaline extraction from kefir BIONAT-I consortium using structural elucidation, cytotoxicity and its immunomodulatory potential against peripheral blood human mononuclear cells activity. The results of FTIR, TGA, acetylation, methylation and NMR analyses allowed to determine the polymer structure. It is a branched homopolysaccharide containing mainly β -D glucose residues with (β 1 $\rightarrow$ 6) bonds, named consortian. The exopolysaccharide demonstrated be an immunomodulatory agent stimulating the production of TNF- α and IL-6. Owing to biological potential of this exopolysaccharide, it can also be applied as raw material for synthesis of biomaterials.

Key words: microbial consortium, exopolysaccharide, β -glucan, NMR, immunomodulatory.

1 INTRODUCTION

Polysaccharides are macromolecules composed of several monosaccharide units and inside of the living organisms are synthesized at distinct stages of the life cycle (Mahapatra & Banerjee, 2013). These molecules play a wide variety of functions, including energy, structure, transmission and transduction of signals (information carrier). High molecular weight polysaccharides that are located on the surface of bacterial cells, most often produced by lactic acid bacteria, are excreted in the extracellular environment and called exopolysaccharides (EPS) (Pachekrepapol, Lucey, Gong, Naran & Azadi, 2017).

EPS is also synthesized by some species of yeast, and its production depends on many factors such as structure, physicochemical properties and secondary metabolism of the microorganism (Gientka, Bzducha-Wróbel, Stasiak-Różańska, Bednarska & Błażej, 2016). Because they are non-toxic and biodegradable, many EPS of microorganisms can be used in the production of biomaterials by biotechnology industries, vaccines by pharmaceutical industry and thickening agents (fibers and probiotics) in the food industry (Freitas et al., 2009; Polak-Bereckaa et al., 2015).

Kefir is a probiotic produced by a microbial consortium composed of several bacteria and yeasts (Lopitz-Otsoa, Rementeria, Elguezabal & Garaizar, 2006). Kefir grains can be grown using different sources of carbon, such as lactose present in

cow's milk (Gul, Mortal, Atalar, Dervisoglu & Kahyaoglu, 2015), sucrose present in brown sugar (Miguel, Cardoso, Magalhães & Schwan, 2011) and soymilk (Hesenkas, Dinkçi, Seçkin, Kinik & Gonç, 2011). Depending of the carbon source used in the culture medium, the probiotic can produce different types of EPS (Ahmed et al., 2013; Jeong et al., 2017).

Among the EPS produced by milk kefir grains are the branched glucogalactans, better known as kefiran, which are water soluble and have equivalent amounts of D-glucose and D-galactose residues. The EPS produced by kefir grains are traditionally extracted in hot aqueous media followed by ethanol precipitation (Micheli, Uccelletti, Palleschi & Crescenzi, 1999; Moreira et al., 2008). Kefiran have various biologic applications, including antimicrobial, anti-inflammatory, antioxidant and antitumor activity (LeBlanc, Matar, Farworth & Perdigon, 2007; Medrano, Pérez & Abraham, 2008; Micheli, Uccelletti, Palleschi & Crescenzi, 1999; Yilmaz-Ersan, Ozcan, Akpinar-Bayazit & Sahin, 2016).

From water kefir grains is extracted Dextrana, a homopolysaccharide composed of glucose monomers with α -1-6 glycoside bonds, branching at the 2, 3 or 4 positions. Dextrana is a water-soluble EPS that is used in the industry in several areas such as medical, pharmaceutical, food, textile and chemical (Davidovic, MilijkoVIC, Antonovic, Rajilic-Stojanovic & Dimitrijevic-Brankovic, 2015). In addition it has anti-inflammatory and immunomodulatory action (Rizoli et al., 2006).

EPS have attracted attention because they have low toxicity to normal cells and high toxicity against tumor cells (Wang et al., 2015a). Shiomi, Sasaki, Murofushi & Aibara, in 1982 published the first work about *in vivo* antitumor activity against Ehrlich carcinoma and Sarcoma 180 in rats treated with an EPS (KGF-C) extracted from kefir grains. The authors concluded that the solid tumors were inhibited by about 40-59% and 21-81%, respectively, by oral administration.

Therefore, the aim of this work was to study an EPS produced by kefir BIONAT-I, consortium growing on brown sugar solution, using an alkaline extraction method and determinate its structural characterization. In addition, we evaluate *in vitro* cytotoxic activity of this EPS against peripheral blood human mononuclear cells (PBMC) and its immunomodulatory effect.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 CULTIVATION OF KEFIR GRAINS

The kefir grains were obtained from diverse consumers of Brazil and were kept in 50 mL of brown sugar solution (50 g.L^{-1}) at room temperature ($25 \pm 3 \text{ }^{\circ}\text{C}$). The maintenance of the kefir culture was performed every 48 h. Over time cultures were selected for biomass production, one of them results in the BIONAT-I consortium. After cultivation, 350 g of kefir grains were whitening by washing with distilled water (15 times). The grains were frozen for further extraction process.

2.2 EXTRACTION AND PURIFICATION OF EPS FROM BIONAT-I CONSORTIUM

After whitening, the consortium grains were ground and mixed with ultrapure water until it acquired a gelatinous consistency. Then, the crushed grains were added to a 1.0 M NaOH solution (1:2 grains:NaOH) and the mixture was kept under stirring at $80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ for 1 h. After this process, the solution was centrifuged (6,100 g) for 5 min and precipitated impurities were discarded. Thereafter, the supernatant was precipitated with two volumes of cold absolute ethanol and placed in a refrigerator at $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ overnight. The solution was centrifuged and the precipitate was reserved. This process was repeated three more times. Afterwards the precipitate was solubilized in 200 mL of ultrapure water and the solution was kept under stirring at $80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ for 1 h. The solution was then neutralized with 1.0 M of HCl solution. After neutralization, the EPS was again precipitated with two volumes of cold absolute ethanol and placed in a refrigerator at $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ overnight. The mixture was centrifuged (6,100 g) for 5 min. Approximately 200 mL of ultrapure water was added to the precipitate and the solution was stirred at $80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ for 1 h until partially dissolved. The final solution was dried at room temperature ($25 \pm 3 \text{ }^{\circ}\text{C}$). The dried material was ground to powder and was reserved at room temperature ($25 \pm 3 \text{ }^{\circ}\text{C}$) for further analysis (ITCBIO, 2017).

Total sugar was performed using the phenol and sulfuric acid method (DuBois, Gilles, Hamilton, Rebers & Smith, 1956) and detection of contaminating proteins in the EPS was done using the method described by Bradford (1976). The results were used to calculate the total yield of extraction (Y%):

$$Y(\%): \frac{m_{EPS}}{m_{ki}} \times 100$$

Where, m_{ki} is the initial kefir grains mass and the m_{EPS} is the EPS mass obtained in the final of the extraction process.

2.3 STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF EPS

2.3.1 Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)

Identification of functional groups of the EPS extracted from BIONAT-I consortium was performed using a Fourier Transform Infrared Spectrophotometer (Agilent Technologies Cary 630 FITR) with ATR module. The sample (10 mg) was pressed against the diamond using a pressure clip of the apparatus. The transmission spectra were collected by resolution of 8.4 scans, with a scan of 4000 to 750 cm^{-1} under infrared radiation.

2.3.2 Thermogravimetric analysis (TGA)

The test for the TGA was performed with 30 mg of the EPS in a simultaneous thermal analyzer model STA 6000 (PerkinElmer). The experiment was carried out in a nitrogen atmosphere with a flow of $50\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ at $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ up to $800\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.3.3 Monosaccharide composition

After acid hydrolysis of the EPS (5 mg in $5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ trifluoroacetic acid for 4 h at $100\text{ }^{\circ}\text{C}$), the alditol acetate derivatives were analyzed by gas-liquid chromatography/mass spectrometry (GC-MS-QP2010 Shimadzu, Japan) (Kircher, 1960).

2.3.4 Methylation analysis

The EPS (5 mg) was subjected to two rounds of methylation (Ciucanu & Kerek, 1984). The methylated polysaccharide was hydrolyzed with $5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ trifluoroacetic acid for 4 h at $100\text{ }^{\circ}\text{C}$, reduced with borohydride, and the alditols were acetylated with acetic anhydride:pyridine (1:1 v/v). The alditol acetates of the methylated sugars were dissolved in chloroform and analyzed in a gas

chromatography/mass spectrometry unit (GC-MS-QP2010 Shimadzu, Japan) with a Restek column RTX-5MS. The sample was analyzed using a split ratio of 30. The carrier gas was helium and a temperature gradient of 110 °C to 250 °C, with variation of 2 °C min⁻¹. The temperatures of the injector, ion source and interface were 260 °C, 200 °C and 230 °C, respectively.

2.3.5 Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy

One (1D) and two-dimensional (2D) spectra of the EPS were recorded using a Bruker DRX 900 MHz apparatus with a triple resonance probe. Approximately 20 mg of sample was dissolved in 0.5 mL of 99.9% deuterated DMSO-d₆ (Cambridge Isotope Laboratory, Cambridge, MA, USA) due to the poor solubility of this EPS in H₂O. All spectra were recorded at 50 °C with HOD (deuterated DMSO exhibiting a peak due to exchange with residual H₂O) suppression by presaturation. For 1D ¹H NMR spectra, 32 scans were recorded, using an inter-scan delay equal to 1 s. Two-dimensional ¹H/¹³C Multiplicity-Edited HSQC spectra were recorded at 50 °C with HOD suppression by presaturation, with 256 scans. The increment number setup was set to 64, and states-TPPI were used for quadrature detection in the indirect dimension and run with 1024 × 256 points with globally optimized alternating phase rectangular pulses (GARP) for decoupling. Chemical shifts were displayed relative to external trimethyl-silylpropionic acid at 0 ppm for ¹H and relative to methanol for ¹³C.

2.4 BIOLOGICAL ACTIVITY OF EPS

2.4.1 Isolation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC)

Blood (4 mL) from 6 young healthy volunteers (23 to 38 years old), without recent infectious disease, immunosuppression and/or autoimmune disease were collected in heparin tubes (Vacuette) to obtain the PBMC through a concentration gradient technique (Ficoll-PaqueTM Plus, GE Healthcare Life Sciences, Sweden). Cells were washed twice with sterile PBS and after centrifugation (400 g, 30 min, 20°C), a ring of PBMC was obtained, collected and cells were counted in a Neubauer chamber. Cell viability was evaluated by the trypan blue (Sigma-Aldrich, USA) exclusion method. Cells were only used when viability was > 98%. Samples were

collected after all of voluntaries signed the “Term of Free and Informed Consent” and experimental protocols were approved by Federal University of Pernambuco Research Ethics Committee (UFPE, Brazil nº 1.870.360/2016).

2.4.2 Culture of lymphocytes and in vitro stimulation with EPS

Lymphocytes were cultured in RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich, USA) with 10% (w/v) fetal bovine serum (Sigma-Aldrich, USA) in 24-well plates (TPP Techno Plastic Products, Switzerland) at a density of 10^6 cells/well. Lymphocytes supernatant cultures were used in assays to evaluate cell viability, cytokine production and nitric oxide release. All cultures were treated with 50, 25, 12.5, 6 and 3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ of EPS and remained with this stimulus for 24 h in assays for analysis of cell viability. Other assays were performed using 12.5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ of EPS in 24 h of incubation time. Controls were performed using untreated cells in culture medium.

2.4.3 Analysis of cell viability

Lymphocytes treated with EPS for 24 h of incubation as well as untreated cells and were centrifuged at 450 g and 4°C for 10 min. After discarding the supernatant, 1 mL of PBS (1X) was added to the precipitate and after resuspension, the cells were centrifuged again (450 g, 4°C, 10 min). The pellet was resuspended in 300 μL of binding buffer (10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl_2 and 1.8 mM CaCl_2), transferred to a labelled cytometer tube, and annexin V conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC) (1:500) and propidium iodide (PI, 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) were added. Flow cytometry was performed in a FACSCalibur platform (BD Biosciences, San Jose, USA) and the results were analyzed using CellQuest Pro software (BD Biosciences). Annexin-FITC negative/PI positive cells were considered as necrotic and Annexin-FITC positive/PI negative cells were considered in the early stage of apoptosis. Double negatives were considered viable cells.

2.4.4 Measurement of cytokine production using cytometric bead array (CBA) Kit

Supernatants of cultures treated with EPS for 24 h as well as untreated cells were collected to quantify cytokines and nitric oxide assays. Cytokine assessment was carried out using human Th1/Th2 cytokine kit II (Becton Dickinson Biosciences, USA) for simultaneous detection of the cytokines IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), and interferon-gamma (IFN- γ). The cytokine measurement was based on the principle of cytometric bead array (CBA) technology and all data were acquired on FACSCalibur platform. CBA utilizes microparticles or beads labeled with discrete fluorescence intensity. The capture beads were labeled with allophycocyanin and were read at 650 nm. The detection antibody specific for cytokines was labeled with phycoerythrin fluorochrome which emits at 585 nm on yellow parameters. The intensity of fluorescence of the yellow parameter is proportional to the amount of cytokine present in test samples. Briefly, test samples (50 μ L) and phycoerythrin detection antibody were incubated with capture bead reagent for 3 h in the dark at room temperature. All unbound antibodies were washed (1.0 mL kit wash buffer) and resuspended in 300 μ L kit fixing buffer before acquisition of data on FACSCalibur platform. Each cytokine had a single and well separated peak and six individual cytokine standard curves (0–5000 pg.mL^{-1}) were run in each assay. The range of detection was between 3000 pg.mL^{-1} and 5000 pg.mL^{-1} in accordance with the manufacturer's instructions.

2.5 STATISTICAL ANALYSIS

Data were analyzed using non-parametric tests. Before analysis, samples data were evaluated using Kolmogorov-Smirnov test for indicates if samples showed Gaussian distribution. To detect the differences between groups, the Wilcoxon test was used. All results were expressed as mean $\pm$ SD and a value of $p \leq 0.05$ was considered as statistically significant. All the graph and results were performed in GraphPad Prism (version 8.0) software.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 EXTRACTION AND PURIFICATION OF EPS FROM BIONAT-I CONSORTIUM

From 350 g of bleached grains of BIONAT-I consortium, after extraction in alkaline solution, 28.28 g of EPS (8.08 %) were obtained. Moreira et al. (2008), using hot water for extraction of the EPS, obtained a yield of 0.1%. Several authors have obtained the EPS from the isolation of the microorganisms contained in kefir grains and in culture-specific sowing (Maeda, Zhu, Omura, Suzuki, & Kitamura, 2004; Wang et al., 2015b), but in this work the EPS was extracted from microbial association.

3.2 STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF EPS

3.2.1 FTIR analysis

The FTIR spectrum of the EPS extracted from the BIONAT-I consortium (Fig. 1) showed a broadened draw rounded at 3300 cm^{-1} indicative of hydroxyl groups with hydrogen bonds common to all carbohydrates. The stretch at 2951 cm^{-1} is attributed to typical C-H bonds of methylated groups. Bands between 1660 and 1220 cm^{-1} , approximately, make asymmetric and symmetric connections of C-O bonds (Botelho et al., 2014). The fingerprint region for carbohydrates is between 1200 - 900 cm^{-1} , that associate with the rings (cyclic) and side groups (C-O-C, C-OH and C-H). Stretching at 1100 cm^{-1} is characteristic for all carbohydrates (Esnaashari et al., 2014). This anomeric region contains bands corresponding to the backbone of glucose residues (950 - 750 cm^{-1}), characteristic of glucans (Synytsya & Novak, 2014). Botelho et al. (2014) isolating EPS from kefir grains grown in soymilk found some similar results, however, others authors didn't find similar results working on FTIR analysis (Davidovic, Milijkovic, Antonovic, Rajilic-Stojanovic & Dimitrijevic-Brankovic, 2015; Wang et al., 2010). Besides, considering the FTIR analysis, it is notice that a polysaccharide containing glucose residues was isolated using the alkaline extraction method.

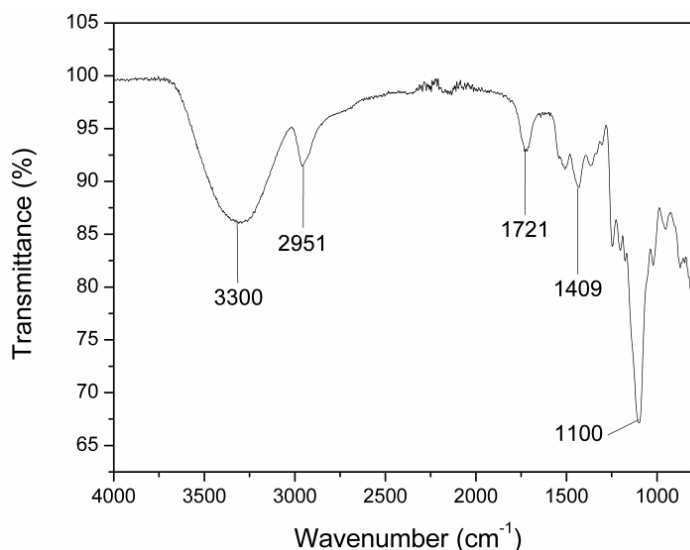


Fig. 1 - FTIR spectrum of the EPS extracted from the BIONAT-I consortium of kefir.

3.2.2 TGA analysis

In TGA thermal spectrum (Fig. 2), about 14.3% of mass loss was observed in the temperature range of 30 to 255 °C, attributed to the loss of water present in the EPS. The degradation of the EPS starts at about 255 °C and continues rapidly with the temperature increasing, exhibiting a total mass loss of about 71.43% at 400 °C. Due to the slow rate of the residues decomposition, the mass loss from 400 to 900 °C it was only 16.6%. Similar results were found by Botelho et al. (2014).

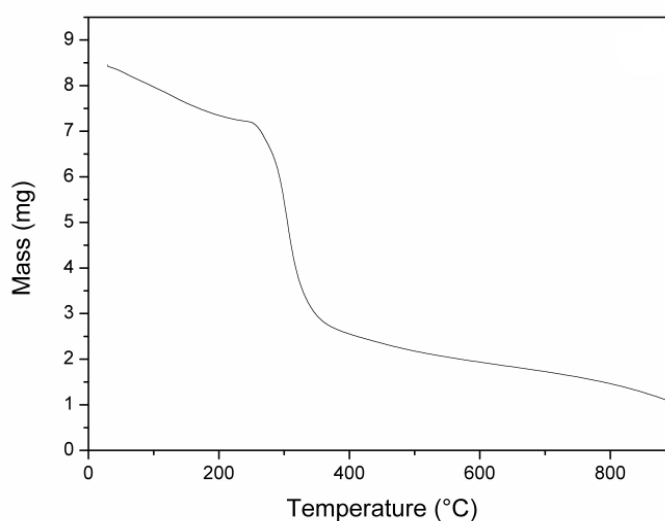


Fig. 2 - TGA thermal spectra of the EPS extracted from the BIONAT-I consortium of kefir.

3.2.3 Monosaccharide composition and methylation analysis

The monosaccharide composition of the EPS was determined based on gas-liquid chromatography/mass spectrometry analysis of the alditol acetates formed after acid hydrolysis, yielding 100% (%w/w) of glucose (Fig. 3).

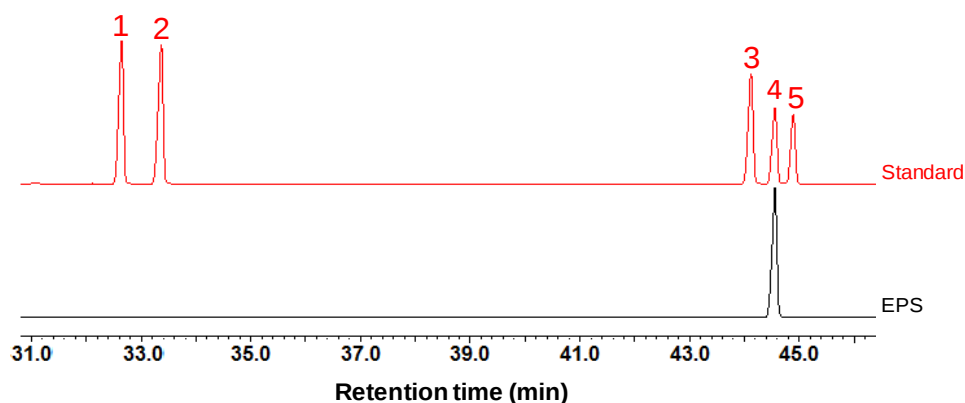


Fig. 3 - Gas chromatograms of alditol derivatives of standard monosaccharides (1-rhamnose; 2-arabnose; 3-mannose; 4-glucose; 5-galactose) and hydrolyzed EPS.

Although it was detected only glucose residues in the EPS extracted from the fermentation of grains of BIONAT-I consortium grown in brown sugar solution. It is known that the EPS obtained from milk kefir grains is mainly composed by glucose and galactose residues with a relative molar ratio of 1.0:1.1, as proposed by Mukai, Toba, Itoh & Adachi (1988) for kefiran EPS. However, it already has been reported in other EPS obtained from kefir grains that the presence of mannose, xylose and arabnose residues as also detected (Ahmed et al., 2013; Jeong et al., 2017; Wang et al., 2010). This heterogeneity of EPS extracted from kefir grains could be attributed to the different food materials used in the fermentation process (Wang & Bi, 2008). In this work, it was used brown sugar as fermentation media for the consortium grains, as well an uncommon protocol for the extraction kefir EPS, besides the BIONAT-I was a unique consortium selected for biomass production, all these factors could explain the fact that this infrequent EPS has only glucose residues.

The substitution of hydroxyl free radical by methyl is accomplished in methylation analysis, where different O-methyl derivatives are obtained after hydrolysis and acetylation. The methylation of this EPS followed by acid hydrolysis and acetylation of the alditols yields the derivatives units shown Table 1. The structure proposed for the polysaccharide was based on experimental data

(methylation analysis) and on literature information (Ghasemlou, Khodaiyan, Jahanbin, Gharibzahedi & Taheril 2012) as summarized in Fig. 4.

Table 1 - Retention times and the proportions of the methylated derivatives obtained from the EPS after acid hydrolysis.

Peak number	Retention time (min)	Relative retention time	Proportion (% of total)	Methyl derivative ^a	Units ^b
1	28.26	1.00	11.42	2,3,4,6-tetra-Me-Glcp	I
2	32.89	1.16	4.17	2,4,6-tri-Me-Glcp	II
3	34.44	1.21	64.92	2,3,4-tri-Me-Glcp	III
4	38.93	1.37	12.42	2,4-di-Me-Glcp	IV
5	41.66	1.47	7.07	2-Me-Glcp	V

^a The type of methyl derivative was identified by the typical fragmentation spectrum.

^b See Fig. 4.

The types of units found in the EPS are shown in Fig. 4 and confirmed in Table 1. Clearly the preponderance of 2,3,4-tri-O-methyl and 2,4-di-O-methyl derivatives from glucose indicates that the preponderant structure is composed by a central core of 6-linked (unit III) with branches 3,6-substituted units (unit IV) in this polymer of glucose. The presence of 2,3,4-tri-O-methyl derivative was also observed in a kefir isolated from kefir grains grown in cheese whey, confirming 6-linked glucose residues in the EPS backbone (Ghasemlou, Khodaiyan, Jahanbin, Gharibzahedi, & Taheril 2012). Besides this, glucose occurs as 2,3,4,6-tetra-O-methyl derivative, indicating that this residue is at non-reducing terminal (unit I). The minor proportions of glucose residues occur as 2,4,6-tri-O-methyl and 2-O-methyl derivatives, meaning that the structure also presents 3-linked glucose units (unit II) and 3,4,6-substitute units (unit V).

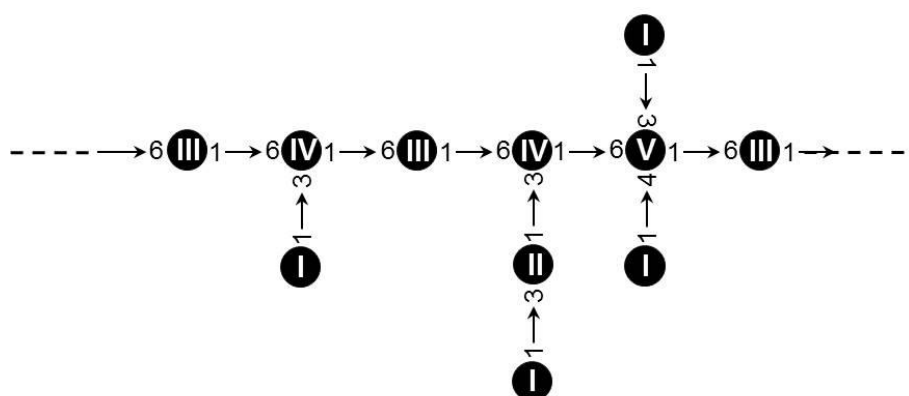


Fig. 4 - Proposed structure for the EPS obtained from the BIONAT-I consortium of kefir.

3.2.4 NMR spectroscopy

The structure of the EPS from the BIONAT-I consortium of kefir was investigated using one-dimensional (1D) and two-dimensional (2D) NMR spectra. The 1D ^1H -NMR spectrum (Fig. 5a) showed two majority signals in the anomeric region: one at 5.07 ppm, ascribed to α -glucose units and the signal at 4.72 ppm, which correspond to the β -glucose residues. See Table 2 (supplementary material) for further information on ^1H -chemical shifts of α - and β -glucose residues (A and B) of EPS.

The edited ^{13}C - ^1H HSQC spectrum (Fig. 5b) allowed us to distinguish the anomeric signals from α -glucose (99.85 and 5.07 $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ ppm, unit A) and β -glucose (98.40 and 4.71 $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ ppm, unit B), which were coincident in the proton spectra. Signals from CH occur in phase (positive peaks in black) while those from CH_2 occur as anti-phase (negative peaks in red). The presence of β -glucose signal in HSQC spectrum was ten times higher than the α -glucose signals, which permitted us to characterize this polymer containing a proportion of 1:9 of α - β -glucose residues. This spectrum allowed us to identify signals from A6/H6# (61.23/3.62 ppm) were ascribed to α -glucose C6-linked residues and those from A6/H6* (61.26/3.51 ppm) to α -glucose C6-free residues. The signals from B6/H6# (66.22/3.76 ppm) and B6/H6* (66.27/3.52 ppm) were ascribed to β -glucose C6-linked and -free residues, respectively.

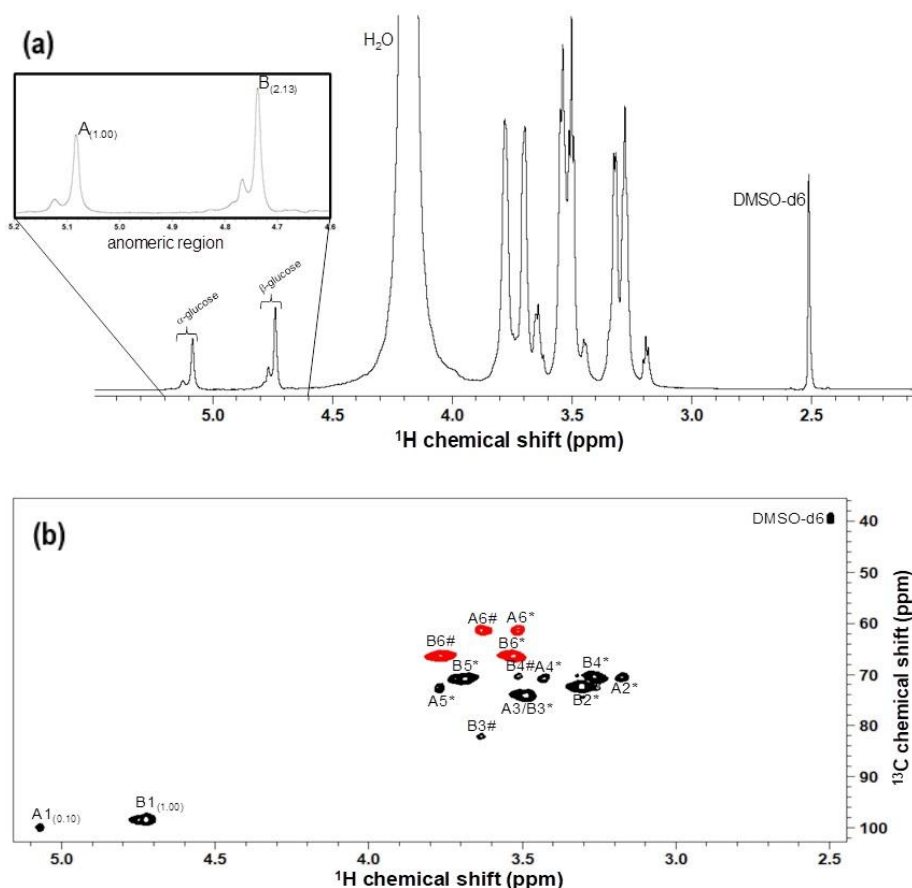


Fig. 5 - (a) 1D ^1H NMR spectra at 900 MHz of EPS. A: signal of anomeric protons of α -glucose; B: signal of anomeric protons of β -glucose. Region of the anomeric fucose signals was highlighted in greater magnification to observe their proportions in EPS (integral numbers in parenthesis). (b) 2D $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ edited HSQC at 900 MHz of the EPS. Black: phase signals (CH carbon/proton); Red: antiphase signals (CH_2); A: α -D-Glucp residues; B: β -D-Glucp residues; C/H* carbon in free state; C/H# carbon in bounded state by glycosidic linkage.

The C3/H3# and C4/H4# were shifted downfield compared with its free state C3/H3* and C4/H4* and confirm the presence of the 3-linked glucose units [$\rightarrow 3$]- β -D-Glucp-(1 $\rightarrow$] and the 3,4,6-substitute units [$\rightarrow 3,4,6$]- β -D-Glucp-(1 $\rightarrow$), respectively, which were detected by methylation analysis. Due to the heterogeneity of glycosidic bonds in the EPS structure and the overlapping of signals, it was possible indicate only the two major residues of each α - and β -anomeric glucose residues. The reported EPS produced by bacterial microorganisms are commonly dextran (3,6-linked α -D-glucan), curdlan (3-linked β -D-glucan) and cellulose like polysaccharides (4-linked β -D-glucan). The backbone formed by 6-linked α , β -D-glucan branched with 3,6-substitute units is rare and was detected only in the wall components of some fungi and never as a EPS (Synytsya & Novak, 2014).

Therefore, the ^1H and ^{13}C chemical shifts (see Table 2 in supplementary material) were like those reported for an α , β -D-glucan composed of a central backbone, containing mainly 6-linked β -D-glucose units (unit III), partially branched at position 3 (unit IV) (Olennikov, Agafonova, Rokhin, Penzina, & Borovskii, 2012). The EPS also containing D-Glucp residues as non-reducing terminal units (unit I). Furthermore, residues of 3-linked D-Glucp and 3,4,6-substituted D-Glucp are also found as intermediated residues in the branches (unit II and V, respectively). These results indicate that the EPS obtained by alkaline extraction from the BIONAT-I consortium of kefir have a novel structure that differs from known EPS obtained by other kefir grains. Thus, we proposed call this new EPS consortian since it has been isolated from a microbial consortium.

3.3 BIOLOGICAL ACTIVITY OF EPS

When tested against the human peripheral blood cell lineage (PBMC), the consortian showed dose dependent cytotoxicity, inducing apoptosis and significant necrosis at $50\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$. The apoptotic and necrotic values found for cells treated with the consortian were similar to control cells (cells + medium) at 12.5, 6 and $3\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Fig. 6). However, although the EPS has promoted cytotoxic action against the normal cells, the cell survival profile was equivalent to 88%.

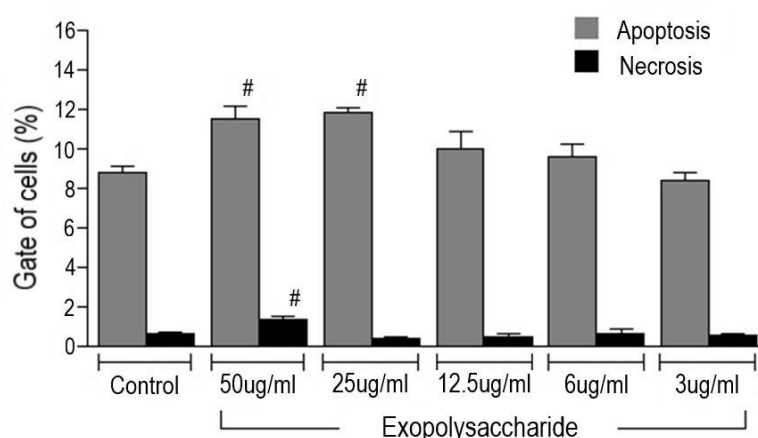


Fig. 6 - Effects of cell viability of human PBMC treated with consortian at different concentrations.

The safety dosage used with the exopolysaccharides is less than $25\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$. The horizontal bars represent the average of six independent experiments performed in duplicate. # $P = 0.03$.

After the cytotoxic assay against normal cells, a low concentration of consortian, sufficient to not inducing any type of cell death in PBMC cells, was used to investigate its possible immunomodulatory mechanism. The results demonstrated that the consortian, at $12.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, induced the production of two cytokines very important for the inflammatory process in the repair of lesions, the cytokines TNF- α and IL-6 (Figure 7a and b). The EPS was able to induce higher TNF- α production in relation to the control cells (Fig. 7a). Significant values of IL-6 production were also observed in cultures treated with the EPS (Fig. 7b). These results showed that it is possible that consortian could induce healing activity *in vivo* models.

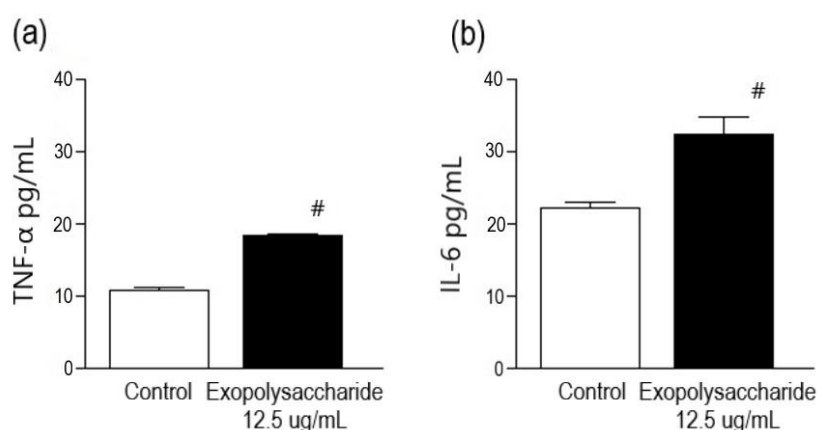


Fig. 7 - Immunomodulatory profile of consortian on production of (a) TNF- α and (b) IL-6 by human PBMC cultures in 24 h assay. The horizontal bars represent the mean of six independent experiments performed in duplicate. # $P = 0.03$.

As has been reported, glucose polymers exhibit a great ability to modulate the immune system and are conventionally classified in the pharmaceutical industry as biological response modifiers (MRBs) (Soltanian, Stuyven, Cox, Sorgeloos & Bossier, 2009). Initially the effects of β -glucans were observed in mice (Kournikakis, Mandeville, Brousseau & Ostroff, 2003; Suzuki et al. 1990), but many other biological models using shrimp (Duvic & Söderhäll 1990), fish (Anderson 1992), rats (Feletti, De Bernardi di Valserra, Contos, Mataboni & Gemogli, 1992), rabbits (Kennedy, Bates, Wheatley & Rohrbach 1995), pigs (Hiss & Sauerwein, 2003; Stuyven et al. 2009) and humans (Kougias et al. 2001) consolidated the concepts of immunoregulation.

The consortian showed to exert immunomodulatory activity with the stimulation of TNF- α and IL-6. The cytokine IL-6 influences immune responses, being

one of the main mediators in the acute phase of inflammation, whereas the main biological activity of TNF- α is mediator in malignant neoplasms (Varela & Forte, 2014). Several studies have pointed out the immunomodulatory capacity promoted by glucans. Joo-Son et al. (2007) reporting the importance of cytokines in the repair of lesions, especially in the inflammatory phase where the polymorphonuclear infiltrate is seen in a higher percentage, obtained satisfactory results in tests with fibroblasts and macrophages treated with β -glucan extracted from the fungus *Aureobasidium* sp. The authors verified that the polysaccharide was able to promote fibroblast migration and TNF- α production in activated macrophages. Similar results were found by Lee et al. (2001) using a β -glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae*. The polysaccharide improved the phagocytosis function in stimulated macrophages and promoted an increase in the production of TNF- α .

Another β -glucan extracted from *Grifola frondosa* mycelium, called grifolan also induced the production of important cytokines in the repair process of lesions such as IL-1 β , IL-6 and TNF- α in lineages of RAW 264.7 macrophages stimulated with the polysaccharide and LPS (Adachi, Okazaki, Ohno & Yadomae, 1994). Studies with innate immune cell lineages were also performed by F rland, Johnson, Tryggestad, Lyberg & Hetland (2010). The authors stimulated dendritic cells with mushroom *Agaricus blazei* Murill extract, rich in β -glucans, and their results pointed to high production of Th1 response in stimulated cells, with a prevalence of cytokines and growth factors IL-8, G-CSF, TNF- α , IL-1- β , IL-6 and MIP-1 β .

4. CONCLUSION

In this study, was obtained the consortian, a new EPS from BIONAT-I consortium of kefir grains using brown sugar as unique carbon source, through extraction in alkaline solution. The structure of consortian was analyzed by FTIR, DSC, TGA, NMR spectroscopy, acetylation and methylation analysis. The results indicated that consortian have a novel structure consisting of branched homopolysaccharide of α/β -D-glucose residues (1:9) bound mainly through β -(1 $\rightarrow$ 6) bonds. The EPS consorsian also induced the formation of TNF- α and IL-6, indicating that it has an immunomodulator in low doses that do not affect blood cells. This

action suggested that consortian has potential in Pharmaceutical and Biomedical industrial applications.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the support from Technological Institute for Biosustainable Chains (ITCBio), from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), from the Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) and from the Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FAPERJ). The authors are grateful to Mineo Nakazawa and to Plataforma Tecnológica (NPT-1) do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/FIOCRUZ), Pernambuco and to Centro Nacional de Biologia Estrutural e Bioimagem (CENABIO) from Universidade Federal do Rio de Janeiro for the technical assistance.

REFERENCES

- Adachi, Y., Okazaki, M., Ohno, N. & Yadomae, T. (1994). Enhancement of cytokine production by macrophages stimulated with (1→3)β-D-Glucan, Grifolan (GRN), isolated from *Grifolia frondosa*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 17, 1554-1560.
- Ahmed, Z., Wang, Y., Anjum, N., Ahmad, H., Ahmad, A. & Raza, M. (2013). Characterization of new exopolysaccharides produced by coculturing of *L. kefiranofaciens* with yoghurt strains. *International Journal of Biological Macromolecules*, 59, 377-383.
- Anderson, D. P. (1992). Immunostimulants, adjuvants and vaccine carriers in fish: applications to aquaculture. *Annual Review of Fish Diseases*, 2, 281–307.
- Botelho, P. S., Maciel, M. I. S., Bueno, L. A., Marques, M. F. F., Marques, D. N. & Silva, T. M. S. (2014). Characterisation of a new exopolysaccharide obtained from of fermented kefir grains in soymilk. *Carbohydrate Polymers*, 107, 1–6.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Ciucanu, I. & Kerek, F. (1984). A simple and rapid method for the permethylation on of Carbohydrates. *Carbohydrate Research*, 131, 209-217.

Davidovic, S. Z., Miljkovic, M. G., Antonovic, D. G., Rajilic-Stojanovic, M. D. & Dimitrijevic-Brankovic, S. I. (2015). Water Kefir grain as a source of potent dextran producing lactic acid bacteria. *Hemijaska industrija*, 69, 595–604.

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, 350 – 356.

Duvic, B. & Söderhäll, K. (1990). Purification and characterization of a β -1,3 glucans binding protein from the plasma of the crayfish *Pacifastacus lenieusculus*. *Journal of Biological Chemistry*, 265, 9333–9337.

Esnaashari, S. S., Rezaei, S., Mirzaei, E., Afshari, H., Rezayat, S. M. & Faridi-Majidi R. (2014). Preparation and characterization of kefiran electrospun nanofibers. *International Journal of Biological Macromolecules*, 70, 50–56.

Feletti, F., De Bernardi di Valserra M., Contos, S., Mattaboni, P. & Gemogli, R. (1992), Chronic study on a new glucan extracted from *Candida albicans* in rats, *Arzneimittel-forschung*, 42, 1363–1367.

Førland, D.T., Johnson, E. , Tryggestad, A.M.A. , Lyberg, T. & Hetland G. (2010). An extract based on the medicinal mushroom *Agaricus blazei* Murill stimulates monocyte-derived dendritic cells to cytokine and chemokine production in vitro. *Cytokine*, 49, 245–250.

Freitas, F., Alves, V. D., Pais, J., Costa, N., Oliveira, C., Mafra, L., Hilliou, L., Oliveira, R. E. & Reis, M. A. M. (2009). Characterization of an extracellular polysaccharide produced by a *Pseudomonas* strain grown on glycerol. *Bioresource Technology*, 100, 859–865.

Ghasemlou, M., Khodaiyan, F., Jahanbin, K., Gharibzahedi, S. M. T. & Taheril S. (2012). Structural investigation and response surface optimisation for improvement of kefiran production yield from a low-cost culture medium. *Food Chemistry*, 133, 383–389.

Gientka, I., Bzducha-Wróbel, A., Stasiak-Różańska, L., Bednarska, A. A. & Błażej, S. (2016). The exopolysaccharides biosynthesis by *Candida* yeast depends on carbon sources. *Electronic Journal of Biotechnology*, 22, 31-37.

Gul, O., Mortas, M., Atalar, I., Dervisoglu, M. & Kahyaoglu, T. (2015). Manufacture and characterization of kefir made from cow and buffalo milk, using kefir grain and starter culture. *Journal of Dairy Science*, 98, 1517–1525.

Hesencas, H., Dinkçi, N., Seçkin, K., Kinik, O. & Gonç, S. (2011). Antioxidant Properties of Kefir Produced from Different Cow and Soy Milk Mixtures. *Journal of agricultural sciences*, 17, 253-259.

Hiss, S. & Sauerwein, H. (2003). Influence of dietary beta-glucan on growth performance, lymphocyte proliferation, specific immune response and haptoglobin plasma concentration in pigs, *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 87, 2–11.

ITCBIO - INSTITUTO TECNOLÓGICO DAS CADEIAS BIOCIENTÍFICAS (Recife-PE). Processo de obtenção de exopolissacarídeo tipo beta-glucana, extraído de consórcio microbiano do kefir, com características de hidrogel superabsorvente, ação citotóxica para linhagens neoplásicas, ação imunomoduladora e matéria-prima para filme polimérico bioativo. n. BR 102017025627-8, 29 nov. 2017.

Jeong, D., Kim, D., Kang, H.-B., Kim, H., Song, K., Kim, H. & Seo, K. (2017). Characterization and antibacterial activity of a novel exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefirianofaciens* DN1 isolated from kefir. *Food Control*, 78, 436-442.

Joo-Son, H., Han, D.-W., Baek, H. S., Lim, H. R., Lee, M. H., Woo, Y. I. & Park J.-C. (2007). Stimulated TNF- α release in macrophage and enhanced migration of dermal fibroblast by β -glucan. *Current Applied Physics*, 7, 33-36.

Kennedy, M.T., Bates, P.J., Wheatley, C.L. & Rohrbach, M.S. (1995). Discrete pathways for arachidonic acid release from tannin versus β -glucan-stimulated rabbit alveolar macrophages, *Journal of leukocyte biology*, 58, 241–248.

Kircher, H. W. (1960). Gas-liquid partition chromatography of methylated sugars. *Analytical chemistry*, 32, 1103-1106.

Kougiass, P., Wei, D., Rice, P.J., Ensley, H.E., Kalbfleisch, J., Williams, D.L. & Browder, I.W. (2001). Normal human fibroblasts express pattern recognition receptors for fungal (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucans. *Infection and Immunity*, 69, 3933–3938.

Kournikakis, B., Mandeville, R., Brousseau, P. & Ostroff, G. (2003). Anthraxprotective effects of yeast β 1,3 glucans. *Medscape General Medicine*, 5, 1.

LeBlanc, A. M., Matar, C., Farnworth, E. & Perdigo'n G. (2007). Study of Immune Cells Involved in the Antitumor Effect of Kefir in a Murine Breast Cancer Model. *Journal of Dairy Science*, 90, 1920–1928.

Lee, J.-N., Lee, D.-Y., Ji, I.-H., Kim, G.-E., Kim, H.-N., Sohn, J., Kim, S. & Kim, C.-W. (2001). Purification of soluble β -Glucan with Immune-enhancing activity from the cell wall of yeast. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 65, 837-841.

Lopitz-Otsoa, F., Rementeria, A., Elguezabal, N. & Garaizar, J. (2006). Kefir: a symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. *Revista Iberoamericana de Micología*, 23, 67–74.

Maeda, H., Zhu, X., Omura, K., Suzuki, S. & Kitamura, S. (2004). Structural Characterization and Biological Activities of an Exopolysaccharide Kefiran Produced by *Lactobacillus kefirianofaciens* WT-2B^T. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 5533-5538.

Mahapatra, S. & Banerjee D. (2013). Fungal Exopolysaccharide: Production, Composition and Applications. *Microbiology Insights*, 6, 1-16.

Medrano, M., Pérez, P. F. & Abraham, A. G. (2008). Kefiran antagonizes cytopathic effects of *Bacillus cereus* extracellular factors. *International Journal of Food Microbiology*, 122, 1–7.

- Micheli, L., Uccelletti, D., Palleschi, C. & Crescenzi, V. (1999). Isolation and characterisation of a rosy *Lactobacillus* strain producing the exopolysaccharide kefiran. *Applied and Environmental Microbiology*, 53, 69-74.
- Miguel, M. G. C. P., Cardoso, P. G., Magalhães, K. T. & Schwan, R. F. (2011). Profile of microbial communities present in tibico (sugary kefir) grains from different Brazilian States. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27, 1875–1884.
- Moreira, M. E. C., Santos, M. H., Pereira, I. O., Ferraz, V., Barbosa, L. C. A. & Schneedorf, J. M. (2008). Atividade antiinflamatória de carboidrato produzido por fermentação aquosa de grãos de quefir. *Química Nova*, 31, 1738-1742.
- Mukai, T., Toba, T., Itoh, T. & Adachi, S. (1988). Structural microheterogeneity of kefiran from kefir grains. *Japanese Journal of Zootechnical Science*, 59, 167–176.
- Olennikov, D. N., Agafonova, S. V., Rokhin, A. V., Penzina, T. A. & Borovskii, G. B. (2012). Branched Glucan from the Fruiting Bodies of *Piptoporus betulinus* (Bull.:Fr) Karst. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 48, 65–70.
- Pachekrepapol, U., Lucey, J. A., Gong, Y., Naran, R. & Azadi, P. (2017). Characterization of the chemical structures and physical properties of exopolysaccharides produced by various *Streptococcus thermophilus* strains. *Journal of Dairy Science*, 100, 1-12.
- Polak-Bereckaa, M., Choma, A., Wasko, A., Górska, S., Gamiand, A. & Cybulska J. (2015). Physicochemical characterization of exopolysaccharides produced by *Lactobacillus rhamnosus* on various carbon sources. *Carbohydrate Polymers*, 117, 501-509.
- Shiomi, M., Sasaki, K., Murofushi, M. & Aibara, K. (1982). Antitumor activity in mice of orally administered polysaccharide from Kefir grain. *Japanese Journal of Medical Science and Biology*, 35, 75-80.
- Soltanian, S., Stuyven, E., Cox, E., Sorgeloos, P. & Bossier P. (2009). Beta-glucans as immunostimulant in vertebrates and invertebrates. *Critical Reviews in Microbiology*, 37, 109–138.
- Stuyven, E., Cox, E., Vancaeneghem, S., Arnouts, S., Deprez, P. & Goddeeris, B.M. (2009). Effect of beta-glucans on an ETEC infection in piglets. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 128, 60–66.
- Suzuki, I., Tanaka, H., Kinoshita, A., Oikawa, S., Osawa, M. & Yadomae, T. (1990). Effect of orally administered beta-glucan on macrophage function in mice. *International Journal of Immunopharmacol*, 12, 675–684.
- Synytsya, A. & Novak, M. (2014). Structural analysis of glucans. *Annals of Translational Medicine*, 2, 17.
- Varella, P. P. V. & Forte, W. C. N. (2014). Citocinas: revisão. *Revista Brasileira de Alergia e imunopatologia*, 24, 146-154.

Wang, J., Zhao, X., Tian, Z., He, C., Yang, Y. & Yang, Z. (2015b). Isolation and Characterization of Exopolysaccharide-Producing *Lactobacillus plantarum* SKT109 from Tibet Kefir. *Polish Journal of Food And Nutrition Sciences*, 65, 269–279.

Wang, L., Jiang, R., Song, S. D., Hua, Z. S., Wang, J. W. & Wang, Y. P. (2015a). *Angelica sinensis* polysaccharide induces erythroid differentiation of human chronic myelogenous leukemia k562 cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16, 3715-3721.

Wang, M. & Bi, J. (2008). Modification of characteristics of kefiran by changing the carbon source of *Lactobacillus kefiranofaciens*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88, 763–769.

Wang, Y., Liu, C. Li, P., Ahmed, Z., Xiao, P. & Bai, X. (2010). Physical characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* KF5 isolated from Tibet Kefir. *Carbohydrate Polymers*, 82, 895–903.

Yilmaz-Ersan, L., Ozcan, T., Akpınar-Bayazit, A. & Sahin, S. (2016). The Antioxidative Capacity of Kefir Produced from Goat Milk. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, 7, 22-26.

**Structural characterization and Immunomodulatory activity of Consorcia, a
new exopolysaccharide extracted from grains of a consortium of kefir**

Supplementary material

Table 2 - ^1H and ^{13}C chemical shifts of the units founded in the EPS obtained from fermentation of kefir grains in brown sugar.

Structure/ chemical shifts (ppm)	Unity*	C1/H1	C2/H2	C3/H3	C4/H4	C5/H5	C6/H6
α -D-Glup	A	99.85/ 5.07	70.39/ 3.17	74.09/ 3.48	70.71/ 3.42	72.64/ 3.76	61.26/ 3.51
β -D-Glup	B	98.40/ 4.72	72.16/ 3.30	74.09/ 3.48	70.39/ 3.26	70.71/ 3.68	66.27/ 3.52

* See Fig. 6.

5.2 METAGENOMIC ANALYSIS OF MICROBIAL DIVERSITY OF A CONSORTIUM OF KEFIR PRODUCER CONSORTIAN

Natália Almeida Onofre-Cordeiro¹; José Antônio Santos Junior²; Rodrigo Juan Martins Cardozo², Marília Alves de Lima², Alice Conceição Moraes Florêncio², Bruna Corina Silva de Lima², Cláudia Sampaio de Andrade Lima³; Ricardo Yara²; Ederson Akio Kido^{1*}.

¹Department of Genetics, Bioscience Center, Federal University of Pernambuco

² Department of Biomedical Engineering, Technology and Geocencias Center, Federal University of Pernambuco

³ Department of Biophysics and Radiobiology, Bioscience Center, Federal University of Pernambuco

* Corresponding author

e-mail: kido.ufpe@gmail.com (EAK)

ABSTRACT

The microbial diversity of Brazilian grains of BIONAT-I consortium of kefir, producer of consortian exopolysaccharide (EPS), was investigated by metagenomic analysis, an independent culture method. To this end, the V3-V4 region of the bacterial 16S rDNA gene and the second internal transcription spacer (ITS2) in the fungal rDNA gene were sequenced and applied for taxonomic and diversity analyses. The bacterial composition of the BIONAT-I consortium was dominated by *Zymomonas mobilis*. The other abundant species were *Ethanoligenens harbinense*, *Clostridium tyrobutyricum*, *Bifidobacterium aquikefiri*, but the genus with the highest species richness was *Lactobacillus*. The most abundant observed yeast species were *Saccharomyces cerevisiae*, *Dekkera bruxellensis*, *Torulaspora quercuum*, and *Lachancea fermentati*. The rarefaction curve tended to an asymptote, suggesting success in the effort of sampling the current diversity. The research showed that it is feasible to establish the microbial composition pattern of the kefir grains under study, which will allow a better understanding and further investigation of potential biotechnological processes.

Keywords: kefir, microbial community, 16S rDNA, ITS, *Zymomonas*, *Saccharomyces*.

INTRODUCTION

Kefir is a microbial association of several microorganisms that through the fermentation process produce a liquid for *in natura* consumption, with beneficial health properties, besides exopolysaccharides (EPS) [1-3]. The best known kefir EPS is kefiran, a water-soluble glucogalactan produced by *Lactobacillus* that make up the microbiota of the milk grains. Kefiran is extracted from kefir grains using hot water and precipitation with ethanol. Kefiran has immunomodulation and anti-inflammatory properties and has already been used in the food industry as a texturing and gelling agent [4,5].

The EPS obtained from kefir of water is a dextran, homopolysaccharide formed by monomers of glucose with α -1-6 bonds [6]. Other genera of bacteria and yeasts present in kefir grains have the potential to produce EPS. In recent years, interest in identification and isolation of microbial EPS has been increasing, and its production is an alternative to plant polysaccharides.

Generally, kefir grains are formed by bacteria and yeasts, in a symbiotic relationship. However, this microbial composition can undergo variations, according to the origin of the grains, the method, and the substrate used for cultivation, which can result in differentiated products with distinct characteristics [7,8].

Thus, the identification of the specific microbiota of a particular kefir culture has multiple scientific and technical purposes, for example by facilitating the development of starter cultures for kefir production on industrial scale, as well as in the isolation of microorganisms with potential for EPS production [9]. Also, the possibility of combining microorganisms producing EPS, allowing novel blends of polymers, may result in improving the quantities and qualities of the polymers produced, or in obtaining compositions with different properties, enhancing or standardizing a biotechnological production.

Biotechnology is based on the demand and development of biological resources that can be exploited industrially, and microbial diversity is an excellent mechanism for the development of biotechnology. Thus, microorganisms can be used in biotechnological processes in segments such as pharmaceutical, food,

environmental, chemical, agro-industrial, and energy industries. In this way, the advances in molecular biology, genomics, and bioinformatics allow investigation of microorganisms regardless of the techniques of isolation and cultivation, providing discoveries of new biotechnological products [10-12].

Culture-dependent techniques and traditional molecular methods have been used to characterize the kefir microbiota [9]. However, much of the diversity may not be recovered in culture media just because some microorganisms cannot be grown outside their environment [13,14]. Among the approaches to the study of microbial communities, metagenomics appears as a genomic analysis to elucidate the microbiota of complex samples, such as the environmental ones, free of culture procedures [14].

BIONAT-I is a consortium of kefir grown in brown sugar solution (water kefir) that produces consortian. Consortian is a polymer formed by glucose monomers with β -1-6 bonds, being characterized as a β -glucan. The structure of the consortian is different from the known EPS obtained from kefir grains. The process of obtaining these EPS with characteristics unpublished for kefir consortium is the subject of patent protection with registration BR 102017025627-8 [15]. Due to the production of this new EPS, it is important to investigate the microbial composition of the BIONAT-I consortium.

Therefore, the objective of this study was to elucidate the microbial composition of the community present in kefir BIONAT-I consortium by independent culture method, sequencing through an Illumina HiSeq 2500 platform, the V3-V4 region of the bacterial 16S rDNA and the fungal region ITS2 of the rDNA. The diversity analyses allowed the taxonomic classifications of the microorganisms present, providing the theoretical basis for a better biotechnological use of these grains.

MATERIALS AND METHODS

THE KEFIR BIONAT-I

The kefir grains were obtained from consumers in the state of Paraná, Brazil. These grains were kept at room temperature using a 50% (w/v) aqueous brown sugar solution as the substrate, which was changed every 48 hours. The culture was

selected for biomass production, resulting in the BIONAT-I consortium. Long-term storage of the grains was done by keeping samples in ultra-freezer (-80 ° C).

EXTRACTION OF TOTAL MICROBIAL DNA

From the microbial community to extract the total DNA, 1 g of the grains were added in 1 mL of sterilized distilled water and mechanically homogenized in a vortex tube shaker (Uni-Vortex - Uniscience) for 3 minutes. Then, 1 mL of the sample was transferred to a microtube, and the DNA was extracted with Gentra® Puregene® Yeast / Bact kit (Qiagen®, USA), following the manufacturer's instructions. After that, an equal volume of the phenol-chloroform-isoamyl alcohol mixture (10: 10: 1 v/v) was added to the resulting solution to purify the DNA, which was homogenized and centrifuged (16,000 g for 5 minutes). Thereafter, the supernatant was transferred to a new tube, and added to it, a 10-fold volume of 5 M NaCl solution. For DNA precipitation, two volumes of absolute ice-cold ethanol (-20 °C) were added and the tube kept in a freezer (-20 °C) for 30 minutes. Subsequently, the tube was centrifuged, under the conditions described before, and the precipitate washed with 70 % ethanol. The ethanol was discarded, and the pellet was dried at room temperature and then dissolved in 50 µL of TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4 and 1 mM EDTA, pH 8.0) and kept at -20 °C. The purified DNA was quantified, and its purity analyzed using a Nanodrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, USA). The DNA was then diluted to 1 ng/µL using sterile water.

PCR AMPLIFICATION OF THE BACTERIAL 16S RDNA AND THE FUNGAL ITS2 RDNA GENES

To the PCR amplification of the V3-V4 region of the bacterial 16S rDNA gene, the primers 341F (5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-3') and 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') were used, and for the amplification of the transcribed internal spacer region (ITS2) for fungi, the primers ITS3 (5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') were applied. All PCR reactions were performed with Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix (New England Biolabs, Ipswich, EUA). PCR products were observed in 2 % (w/v) agarose gel and samples with amplicons between 400-450 bp were chosen

for further analysis. The PCR products were mixed in equivalent proportions and purified with the Qiagen Gel Extraction kit (Qiagen, Germany).

PREPARATION, SEQUENCING, AND ANALYSIS OF LIBRARIES

Two sequencing libraries (biological replicates) were generated using TruSeq® DNA PCR-Free Sample Preparation Kit (Illumina, USA), following the manufacturer's recommendations. The quality of the libraries was evaluated with Qubit® 2.0 Fluorometer (Thermo Scientific) and Agilent Bioanalyzer 2100 system. Finally, the libraries were sequenced on an Illumina 2500 HiSeq platform (GenOne Biotechnologies, Brazil), and 250-bp paired-end reads were generated. Based on the barcode sequences, the raw data was split and then merged using FLASH software [16], generating the raw tags. Through filtering, high-quality clean tags have been developed according to QIIME™ quality control process (V1.7.0) [17]. These tags were then compared with those of the Gold database reference, using the UCHIME algorithm [18] to detect chimeric sequences, which were removed and the effective tags were obtained. Subsequently, the tags were analyzed using Uparse software (V7.0.1001) [19], where sequences with $\geq 97\%$ similarity were assigned to the same operational taxonomic unit (OTU). The number of shared OTUs between the replicates was compared by Venn diagrams using the Venny 2.1.0 tool. The OTUs were annotated based on NCBI (RefSeq Targeted Loci Projects: bacterial 16S Ribosomal RNA, PRJNA33175; Fungal Internal Transcribed Spacer RNA (ITS), PRJNA224725) databases. In the annotation to BLASTn (e-value cut-off $< e^{-20}$) were considered the best hit. Multiple sequence alignments based on the "Core Set" sequences from the NCBI database was performed with the MEGA6 software [20] to generate the neighbour-joining tree with bootstrap (10000 replications) covering the different OTUs.

The data were also normalized and used to perform alpha diversity analyses. The alpha diversity was applied to analyze the complexity of the sample species through five indexes, including community richness indexes [Chao1 and abundance-based coverage estimators (ACE)], community diversity indexes (Shannon and Simpson indices) and the Good's Coverage estimator, analyzing the depth of sequencing. All indexes were calculated with QIIME™ (V1.7.0) [17] and displayed

with R software (V2.15.3). The rarefaction curves were generated based on these indices.

RESULTS AND DISCUSSION

Culture-dependent methods have already been used to investigate the microbiota of kefir samples from diverse origins and grown on different substrates [8,21-23]. However, some of the microorganisms present in the grains are strongly related and difficult to isolate and identify [13,24,25]. Thus, the metagenomic approach emerges as an efficient resource to elucidate this microbiota. In this study, an analysis of tags covering the bacterial V3-V4 region of the 16S rDNA gene and the fungal ITS2 rDNA gene, sequenced by Illumina 2500 HiSeq, which is an efficient and sensitive platform to characterize microbial communities [26] served to elucidate the microbiota of bacteria and yeasts presented in the grains of BIONAT-I consortium. The sequence variation in the bacterial 16S rDNA gene is widely used to characterize the taxonomic diversity of microbial communities [17,27,28]. On the other hand, the comparison of sequences covering the ITS region is quite applied in the fungi taxonomy, since it presents a high degree of variation even among closely related species [29]. Also, the metagenomics approach is adequate to characterize the uncultured microorganisms. It is used to study the diversity of complex microbial communities, such as kefir, where the metabolic product of one microorganism may be critical to the development of another one [30].

In this way, the sequencing of the V3-V4 hypervariable region of the bacterial 16S Rdna extracted from grain of BIONAT-I consortium of kefir, performed with two biological replicates (16S-1 and 16S-2) generated 64,783 and 79,829 raw sequence data respectively. After removal of possible chimeric sequences, 43,296 and 53,887 tags remained, and of these 99.68% and 99.44% were annotated respectively. Based on the 97 % similarity, 82 (16S-1) and 96 (16S-2) OTUs were detected composing the bacterial community (Table 1). For the evaluation of the yeast community presented in the kefir grain, the sequencing of the ITS2 region of fungal rDNA, performed with two biological replicates (ITS2-1 and ITS2-2) generated 68,133 and 67,232 raw sequence data respectively, and 59,452 and 57,818 effective tags. From this total, 99.33 % and 99.05 % tags were annotated respectively, and 53

(ITS2-1) and 52 (ITS2-2) OTUs (97 % similarity) observed composing the yeast community (Table 1).

Table1 - Sequencing data Illumina 2500 HiSeq involving biological replicates kefir grains BIONAT-I for 16S and ITS2 analysis.

Data sequencing	Bacteria (V3-V4 16S rDNA)		Yeasts (ITS2 rDNA)	
	16S-1	16S-2	ITS2-1	ITS2-2
Raw Tags	53,751	66,737	63,742	63,504
Cleaned Tags	44,441	55,468	62,236	62,025
Effective Tags	43,296	53,887	59,452	57,818
Annotated Tags	43,159	53,588	59,055	57,269
Total of Bases (nt)	17,593,770	21,886,420	20,421,841	19,535,169
Average length (nt)	406	406	344	338
Q20	97.73	97.78	98.92	98.96
Q30	95.39	95.51	97.97	98.05
GC%	51.78	51.68	41.97	42.11
OTUs	82	96	53	52

16S-1: biological replicates 1; 16S-2: biological replicates 2; ITS2-1: biological replicates 1; ITS2-2: biological replicates 2; Q20: Q score of 20; Q30: Q score of 30; GC%: GC content; OTUs: operational taxonomic units.

The microbial diversity of three different water kefir grains (AR, AD and AV) was evaluated through pyosequencing, getting 2,690 reads (AR), 2,641 reads (AD) and 8,983 reads (AV) generating 14, 18 and 46 OTUs respectively [31]. Dobson et al [32] evaluated by pyosequencing (V4 regions of 16S rRNA), interior and exterior of milk kefir grains samples and fermented milk by grains and obtained 4,883, 3,455 and 9,078 reads respectively. V4 region of the bacterial 16S rRNA of four water kefir (A, F, W and I) were analyzed by pyosequencing and the analysis generated 43,293 reads (A), 33,079 reads (F), 25,951 reads (W) and 41,404 reads (I); after quality filtration 31,795, 23,909, 18,305 and 25,319 reads were used for taxon assignments [33]. The bacterial diversity metagenomic analyzes of milk kefir grains developed resulted in quantities of OTUs ranging from 81 to 116 [34].

The venny diagram for 16S analysis showed that 16S-1 and 16S-2 shared 76 (74.5 %) OTUs, 6 (5.9 %) OTUs in 16S-1 and 20 (19.6 %) OTUs in 16S-2 were unique (Fig 1A). The venny diagram for ITS2 analysis showed that ITS2-1 and ITS2-2 shared 48 (84.2 %) OTUs, 5 (8.8 %) OTUs in ITS2-1 and 4 (7.0 %) OTUs in ITS2-2 were unique (Fig 1B).

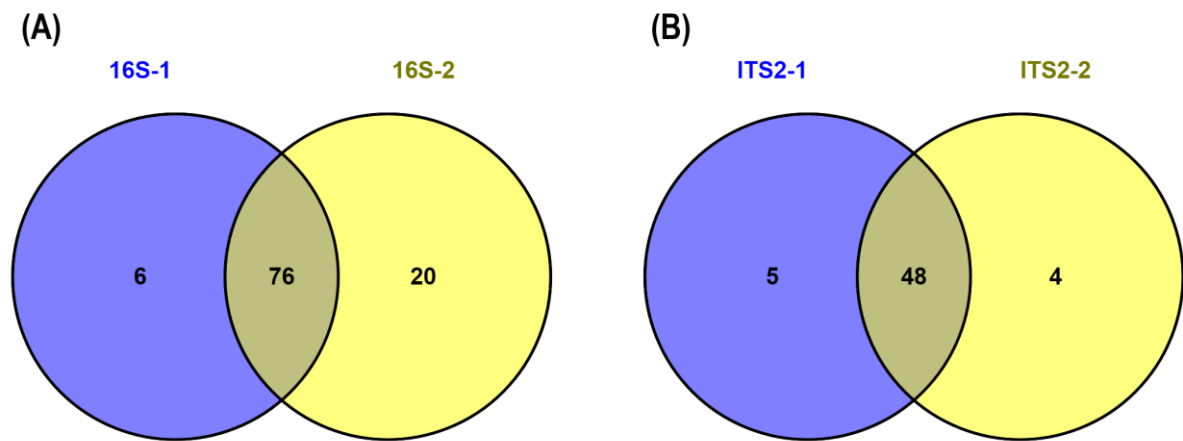


Fig 1 - Venny diagrams of the unique and shared OTUs between the two biological replicates for V3-V4 region of bacterial 16S rDNA (A) and yeast ITS2 region (B). The numbers inside the diagram are the numbers of OTUs.

The NGS surveys of bacteria and fungi presented in the kefir grains BIONAT-I considered some alpha diversity measurements, performed with the means of the biological replicates, including the rarefaction curves, species richness estimators, and community diversity indices. The rarefaction curves of the two kefir samples based on species-level OTUs (97 % similarity) showed that the species richness tended to stabilize nearby 40,000 sequences (the bacterial analysis of the 16S rDNA V3-V4 region; Fig 2A), and 50,000 sequences (for the fungi ITS2 analysis; Fig 2B).

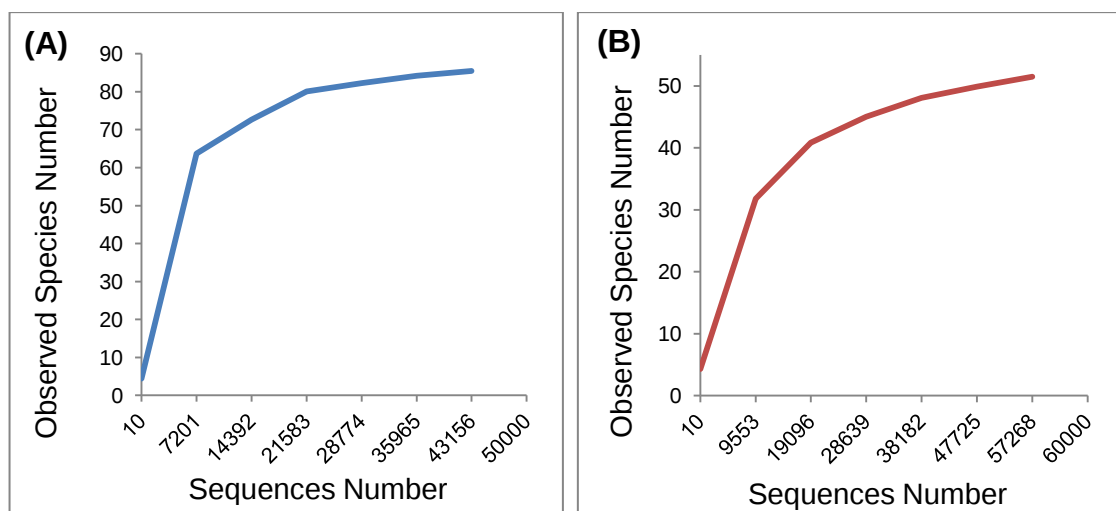


Fig 2 - Rarefaction curves considering sequences of V3-V4 region of bacterial 16S rDNA (A) and yeast ITS2 region (B). The curves were based on OTUs showing 97 % similarity.

The sequences provided by the sequencing platform comprise the raw data, which are correctly processed and filtered to identify the useful tags. Quality filtering is necessary as it improves diversity estimates since it removes possible erroneous

readings that would overestimate microbial diversity [35]. The useful tags are then assigned to OTUs, and the species are annotated. Therefore, in this kind of analysis, it is crucial that the sequencing offers good's coverage, to minimize the risks of detecting only the most abundant representatives and neglecting those present in low numbers. For this, the rarefaction curves are used, which correlate the number of sequences analyzed with the number of species added to the sampling [36]. In the present study, in both cases (bacteria and yeasts), the rarefaction curves approximated an asymptote as the number of sequences increased, suggesting that the depths of the sequencing of the kefir samples were sufficient to gather the diversity of the global microbiota.

In both analyses, the coverage estimator (Good's Coverage) was 1 (Table 2). The richness of species present in the BIONAT-I grains, considering the Chao1 and ACE estimators, presented higher indices for the analysis of bacteria compared to yeasts (Table 2). In turn, the community diversity showed similar results for bacteria and yeast based on the Shannon and Simpson indices (Table 2).

Table 2 - Some measurements of alpha diversity, including species richness estimators (Chao1 and ACE), community diversity indices (Shanon and Simpson) and Good's-coverage (97 % similarity).

Group / Index	Chao1	ACE	Shanon	Simpson	Good's-coverage
Bacteria / V3-V4 16S rDNA	87.04	88.05	2.45	0.64	1
Yeast / ITS2	56.50	56.14	2.33	0.66	1

The Chao1 index correlates singletons and doubletons; already the ACE index correlates rare OTUs and abundant OTUs. For both, the higher the index, the greater the richness of species. Typically, the Shannon diversity index ranges between 1.5 and 3.5; the higher the value of the index, the greater the diversity of species. Simpson diversity index ranges between 0 and 1; the higher the value, the lower the diversity. The richness indices (Chao1 and ACE) pointed a greater bacterial richness to the yeasts presented in the grains. On the other hand, the diversity indices of Shanon and Simpson showed that the diversity of yeast species in the community BIONAT-I is similar to that of bacterial species [37,38]. Marsh et al. [39] analyzing the microbial composition of water kefir grains presented index Chao1 of 38.83 and Shannon of 1.39. Leite et al. [31] obtained, for grains of milk kefir, ACE indexes of 76.27, Chao1 of 53 and Shannon of 0.50. This results indicating that BIONAT-I kefir has greater richness and diversity of bacterial species.

In this work, for bacteria taxonomic annotation was used NCBI (RefSeq Targeted Loci projects), database curated by the NCBI staff, reaching classification to species level at 100% of OTUs. Based on the relative abundance at the phylum level, *Proteobacteria* (62.0 %), *Firmicutes* (29.5 %) and *Actinobacteria* (8.5 %) were the three most relevant bacterial phyla (Fig 3). The phylum *Proteobacteria* was mainly composed of the class *Alphaproteobacteria* (96.9 %) and order *Sphingomonadales* (93.6 %).

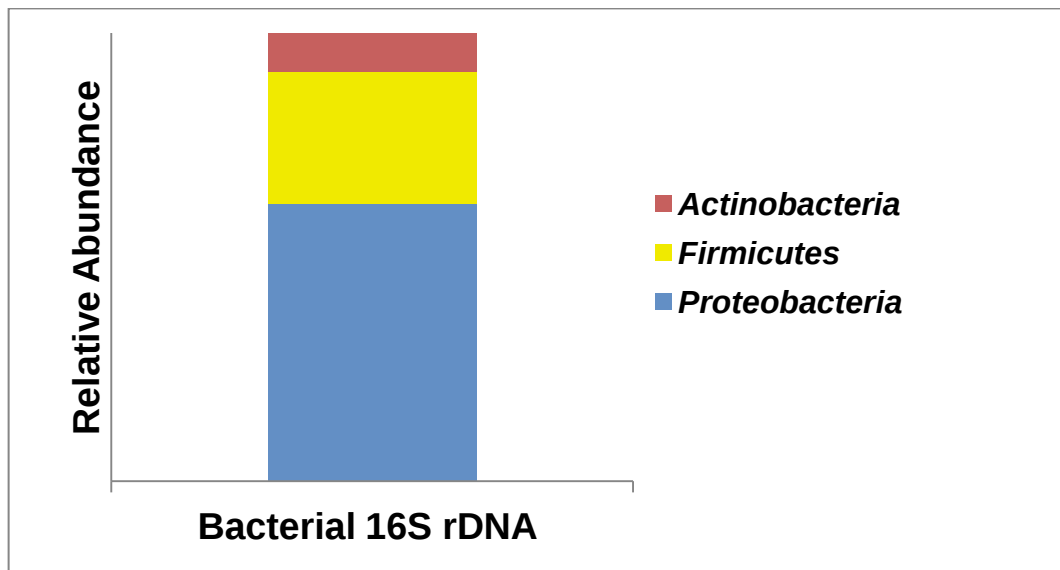


Fig 3 - Relative abundance at phylum level considering the bacterial community presented in the kefir grain BIONAT-I.

Most of the microbiota analyses of the kefir grains presented the *Firmicutes* phylum as the most abundant, having as the leading representatives the lactic acid bacteria (LAB) [31]. However, Mash, O'Sullivan, Hill, Ross and Cotter [39] evaluated the microbiota of water kefir grains from individual and commercial suppliers from Canada, the United Kingdom and the United States of America, and also found the phylum *Proteobacteria* as the most abundant in all grains.

Overall, were identified 39 families and 70 genera. The relative abundance of the main OTUs at family and genus level is presented. Concerning the family classification, *Sphingomonadaceae* was the most abundance (58.05 %), followed by *Clostridiaceae* (9.14 %), *Ruminococcaceae* (9.01 %), *Bifidobacteriaceae* (8.16 %), *Peptostreptococcaceae* (5.38 %), *Lactobacillaceae* (3.25 %), *Sporolactobacillaceae* (2.0 %), *Acetobacteraceae* (1.87 %), *Enterobacteriaceae* (0.89 %), *Helicobacteraceae* (0.74 %), *Erysipelotrichaceae* (0.35 %), *Microbacteriaceae* (0.19 %), *Campylobacteraceae* (0.18 %) (Fig 4).

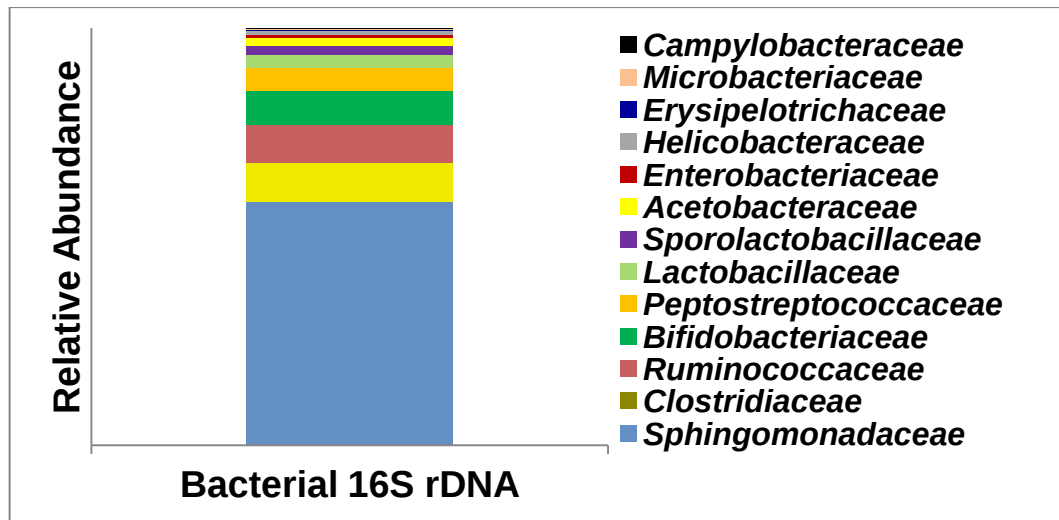


Fig 4 - Relative abundance at family level considering the bacterial community presented in the kefir grain BIONAT-I.

At genus level the most abundant were *Zymomonas* (51.78 %), *Clostridium* (8.13 %), *Ethanoligenens* (7.99 %), *Bifidobacterium* (7.28 %), *Romboutsia* (4.55 %), *Lactobacillus* (2.90 %), *Sporolactobacillus* (1.79 %), *Acetobacter* (0.91 %), *Shigella* (0.78 %), *Helicobacter* (0.66 %), *Gluconobacter* (0.45 %), *Komagataeibacter* (0.31 %), *Turicibacter* (0.31 %), *Peptoclostridium* (0.19 %), *Pseudoclavibacter* (0.17 %), *Campylobacter* (0.16 %) (Fig 5).

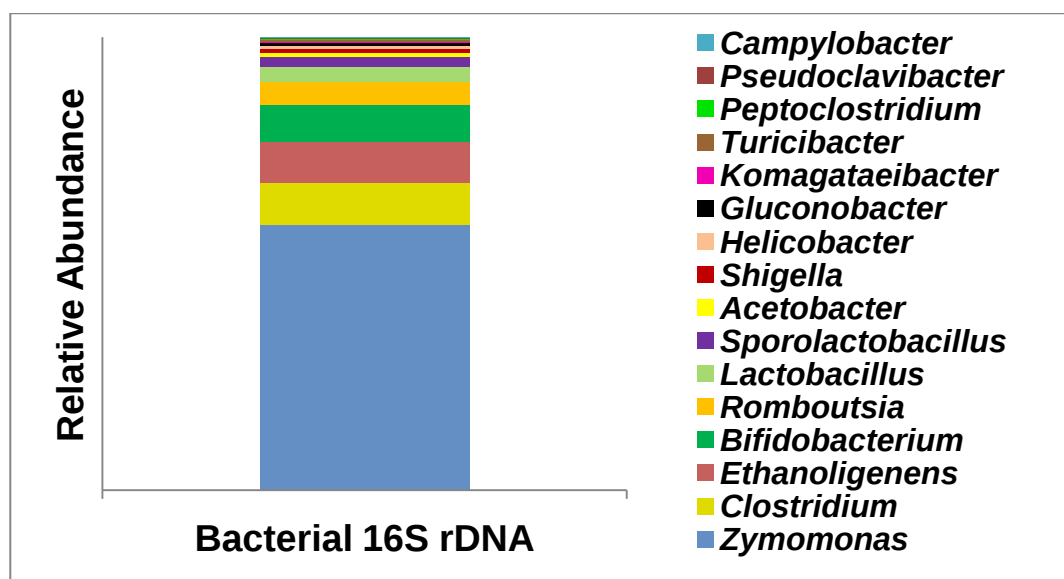


Fig 5 - Relative abundance at genus level considering the bacterial community presented in the kefir grain BIONAT-I.

Considering the species, *Zymomonas mobilis* presented the higher relative abundance (51.8 %) followed by *Ethanoligenens harbinense* (8.0 %), *Clostridium tyrobutyricum* (7.5 %) and *Bifidobacterium aquikefiri* (7.3 %). *Zymomonas mobilis*, a fermentative microorganism that makes up the microbiota of many fermented beverages such as beers and wines, was found as part of the water kefir microbiota from Taiwan [40] and has already been presented as the primary bacteria species in water kefir [39]. *C. tyrobutyricum* have already been described composing the water kefir grains from Germany [33]. This bacterium can use glucose as a carbon source producing butyric acid [41] and has already been found in milk and agricultural environments [42]. The *Bifidobacterium* genus has already been reported in kefir grains [31,32,33,39,40,43]. *B. aquikefiri*, a short Gram-positive bacillus, anaerobic facultative, primarily described in 2016, has been already isolated from water kefir grains [44].

E. harbinense had not previously been cited being part of the kefir grains. *Ethanoligenens* is a genus that uses alcoholic fermentation as the central metabolic pathway, producing ethanol, acetic acid, H₂ and CO₂ [45]. This genus has already been isolated from the sugarcane vinasse, the residual liquid after the ethanol distillation of molasses fermented by yeast, and also during H₂ production in the bioreactor with molasses [45,46]. Another genus widely found in kefir grains is *Lactobacillus*. *Lactobacilli* are primarily distributed in nature and applied in the food industry for its probiotic capacity [47]. More than 30 species of *Lactobacillus*, including *L. buchneri* [48], *L. salivarius* [48], *L. johnsonii* [48], *L. crispatus* [48,49], *L. paracasei* [33,48,50,51,52], *L. hordei* [52] and *L.harbinensis* [52], have already been cited as water kefir grains constituents.

The taxonomic tree of the bacteria species identified in the kefir grains is presented in Fig 6. In the tree it is possible to observe the presence of six groups of bacteria: *Bacilli*, *Clostridia*, *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Epsilonproteobacteria* and *Actinobacteria*. Within the *Bacilli* there are *Lactobacillales* and *Bacillales*. The group of *Alphaproteobacteria* presented greater relative abundance and *Lactobacillus* showed the most significant species richness with 18 species.

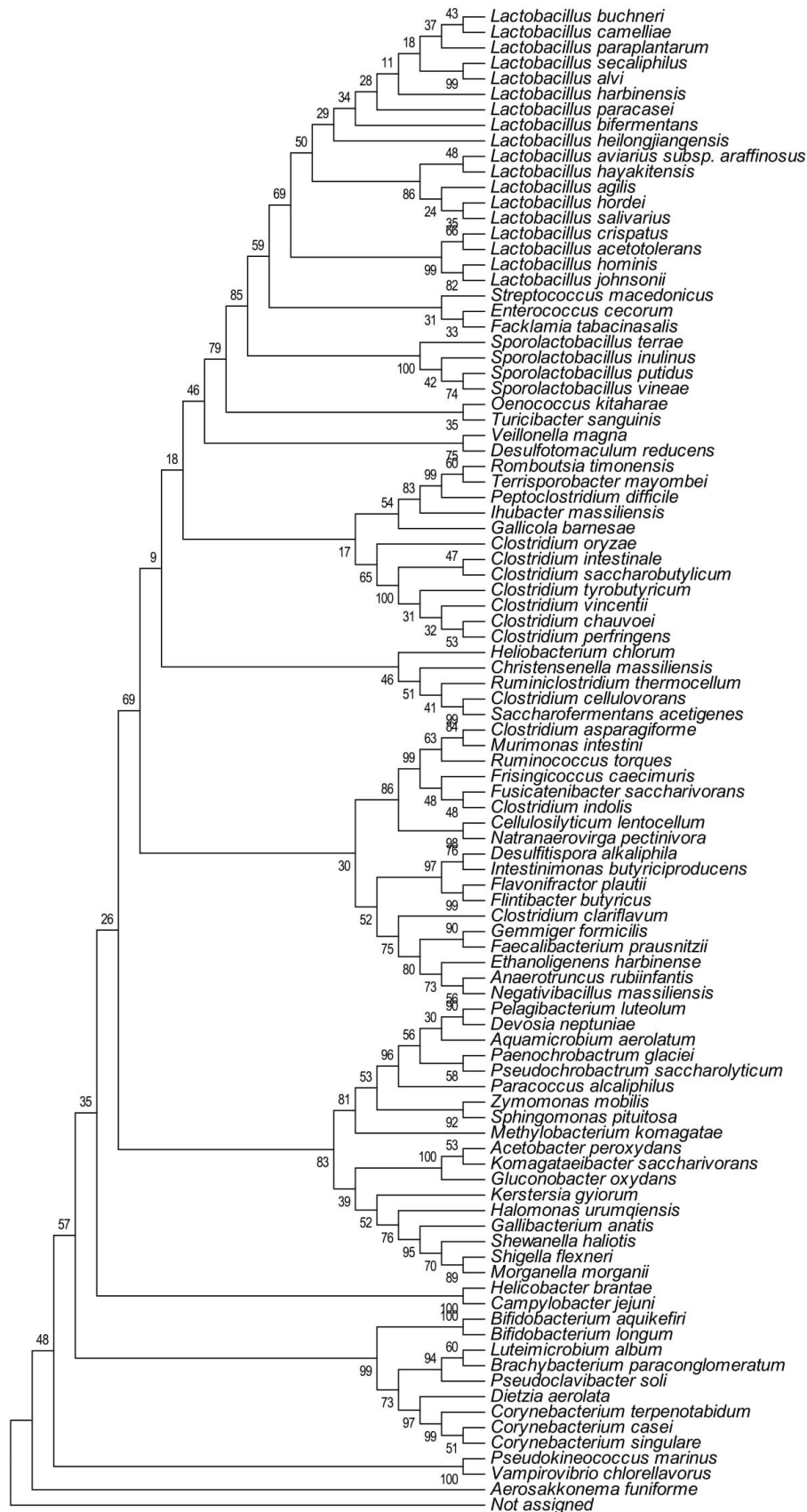


Fig 6 - Taxonomic tree at species level considering the bacterial community presented in the kefir grain BIONAT-I. Numbers at the nodes indicate bootstrap values (expressed as a percentage of 10000 replications).

Concerning the yeast analysis 83.1 % of the sequences were resolved at the species level. Based on the relative abundance to the phylum level, *Ascomycota* (99.6 %) was the predominant phylum being composed mainly by the class *Saccharomycetes* (99.6 %), order *Saccharomycetales* (99.6 %). Overall, were identified 8 families and 10 genus besides uncultured fungus. At family level the most abundant were *Saccharomycetaceae* (61.52 %), *Pichiaceae* (37.54 %), *Schizosaccharomycetaceae* (0.39 %), *Debaryomycetaceae* (0.11 %), *Trichomonascaceae* (0.01 %), *Saccharomycodaceae* (0.01 %), *Phaffomycetaceae* (0.01 %), *Malasseziaceae* (0.01 %) (Fig 7).

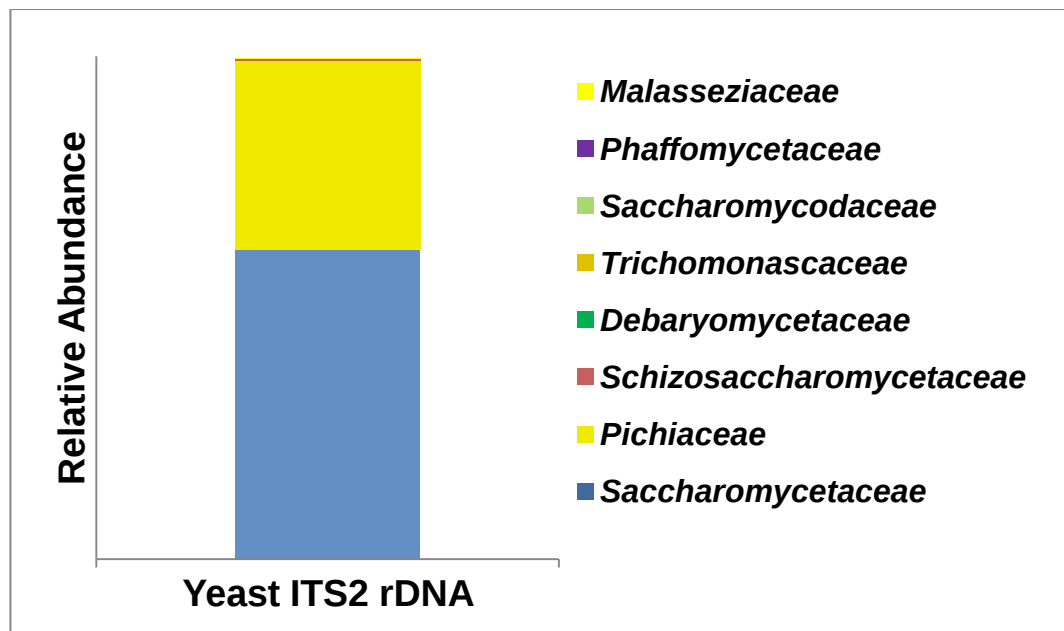


Fig 7 - Relative abundance at family level considering the yeast community presented in the kefir grain BIONAT-I.

Concerning the genus classification *Saccharomyces* (55.74 %) was the most abundance followed by *Dekkera* (37.41 %), *Torulaspora* (3.51 %), *Lachancea* (2.27 %), *Schizosaccharomyces* (0.39 %), *Candida* (0.21 %), *Pichia* (0.04 %), uncultured fungus (0.03 %), *Hanseniaspora* (0.01 %), *Cyberlindnera* (0.01 %) and *Malassezia* (0.01 %) (Fig 8).

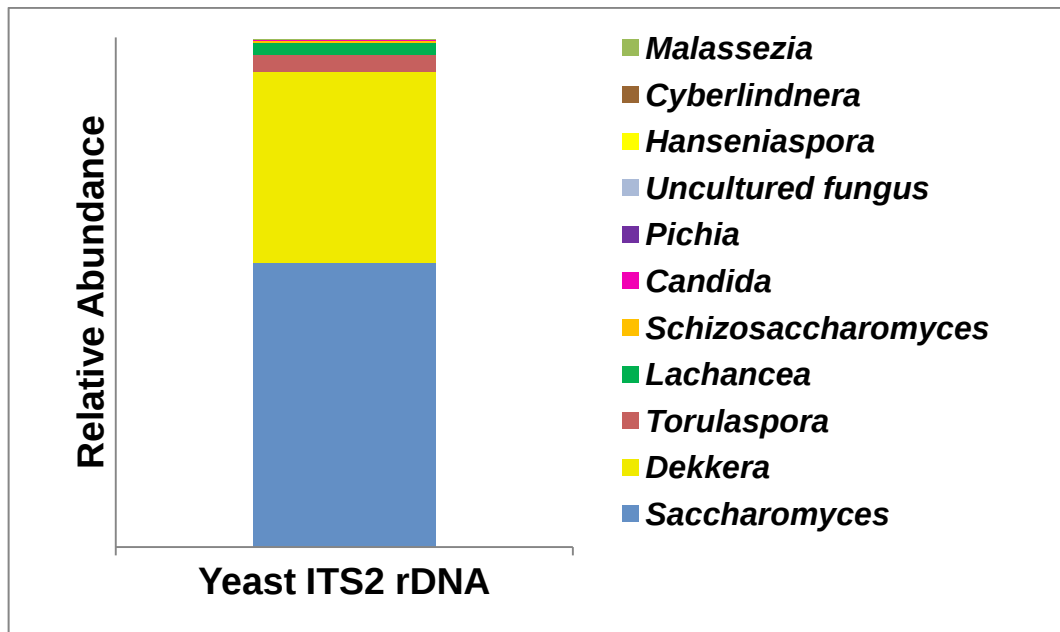


Fig 8 - Relative abundance at genus level considering the yeast community presented in the kefir grain BIONAT-I.

Saccharomyces cerevisiae was the most abundant species of yeast (55.74 %) in the kefir grain BIONAT-I. The second more abundant species was *Dekkera bruxellensis* (20.80 %) followed by *Dekkera* sp. (16.61 %), *Torulaspora quercuum* (3.51 %) and *Lachancea fermentati* (2.27 %). Fig 9 shows the taxonomic tree of the main yeast species identified in the kefir BIONAT-I, based on the NCBI (ITS2 rDNA) database annotation. In the tree it is possible to observe the presence *Pichiaceae*, *Saccharomycetaceae* and *Debaryomycetaceae* groups, besides groups formed by uncultured fungus. Within the *Pichiaceae* there are *Dekkera* and *Pichia*.

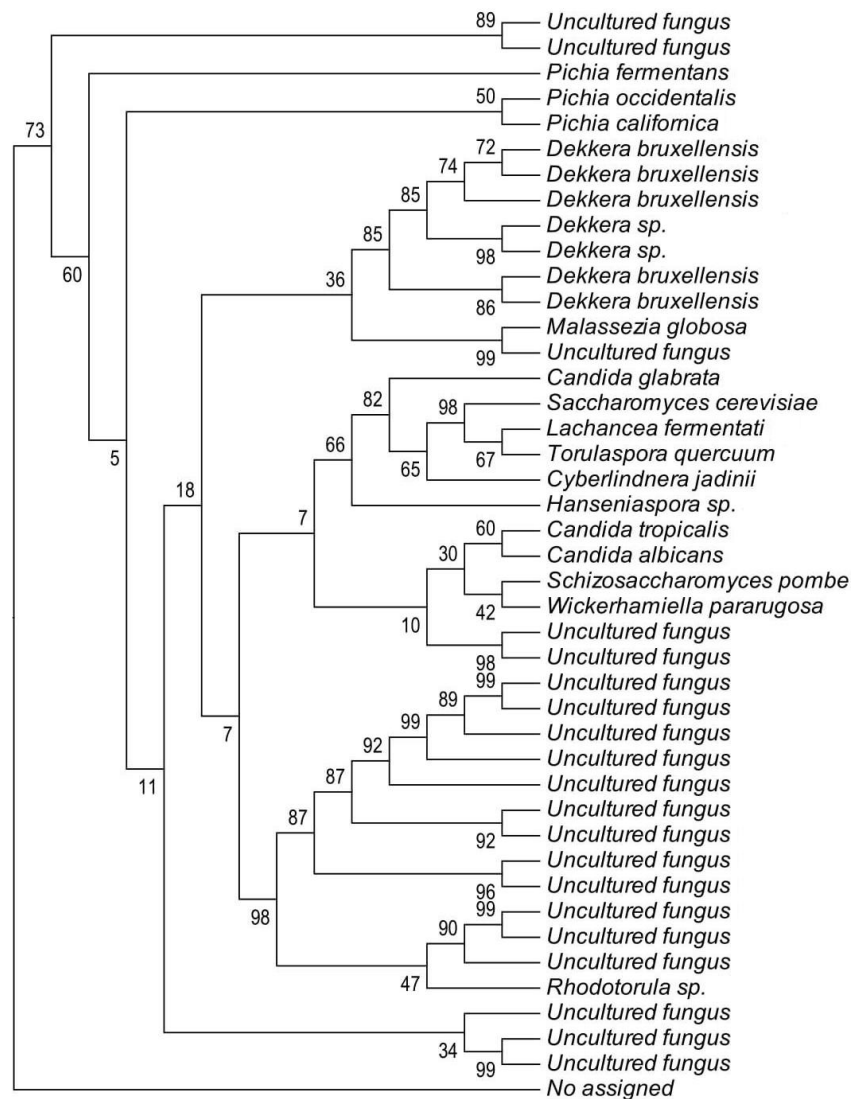


Fig 9 - Taxonomic tree at species level considering the yeast community observed in the kefir grain BIONAT-I. Numbers at the nodes indicate bootstrap values (expressed as a percentage of 10000 replications).

Ascomycota phylum is the predominant both in kefir grains growing in milk or brown sugar solution [39,43,53,54]. Among the most abundant yeast species, *S. cerevisiae* [39,49,52,55,56], *D. bruxellensis* [39,52], and *L. fermentati* [39,55,56] have been found in different kefir grains. The yeasts have a relevant role in the fermentation processes, being the *Saccharomyces* genus very applied in alcoholic fermentation processes. In the kefir grain, *S. cerevisiae* [39,49,52,55,56,58], *S. eubayanus* [55] and *S. turicensis* [25,57] are the species of the genus involved in the fermentation process.

D. bruxellensis, is used in the alcoholic beverages production [59,60]. This yeast was isolated from the sugar cane wash water, feeding sugarcane juice, and

vinasse from a distillery in the Paraíba State, Brazil [61]. However, it has also been reported that *D. bruxellensis* under industrial conditions has a higher growth potential than *S. cerevisiae* and that the ethanol yield produced by *D. bruxellensis* is comparable to the yield of *S. cerevisiae*, the main fermenting yeast [59]. The adaptability of some *D. bruxellensis* strains to high glucose concentrations suggested some tolerance to stress [62]. *D. bruxellensis* was detected in water kefir grains from Canada, the United States of America, the United Kingdom and Belgium [39,51].

L. fermentati, previously known as *Zygosaccharomyces fermentati*, initially isolated from orange and strawberry beverages [63], occurs naturally in the grape juice fermentation during the wine production, contributing to the improvement of the organoleptic properties of the wine [64]. This yeast was isolated from water kefir grains from the United Kingdom and also from Brazil [39,50]. In turn, *Torulaspora quercuum*, yeast capable of fermenting glucose, galactose, and sucrose, has been reported and isolated from the oral cavity of healthy Tibetan individuals. According to Wang et al. [65], this species was probably brought to the mouths of Tibetans by food or drink, since these people consume many vegetables and fermented beverages, which may contain such fermenting yeasts.

Thus, bacteria and yeasts presented in the kefir grains are responsible for the production of various metabolites, such as lactic acid, alcohol, CO₂, bioactive peptides, vitamins, bacteriocins, and exopolysaccharides, which give rise to important and diverse components, some of them showing biological actions, besides organoleptic characteristics [66].

CONCLUSION

The microbial diversity presented in grains of the Bionat-I kefir consortium, estimated through metagenomic analysis, encompassing the bacterial V3-V4 region of the 16S rDNA gene and the fungal ITS2 rDNA gene, presented bacteria of the genus *Zymomonas* as dominant. There was an important presence of the genus *Ethanoligenens* and *Clostridium*, which is not common for kefir communities. Lactic acid bacteria, such as *Lactobacillus*, commonly present in abundance in kefir grains are not a dominant part of the BIONAT-I consortium. All this makes it a consortium different from the others. The composition of yeasts had the genus *Saccharomyces*, *Dekkera*, *Torulaspora*, and *Lachancea* as predominant. This analysis also provided

the identification of some microorganisms not previously associated to the kefir community, as *Ethanoligenens harbinense* and *Torulaspora quercuum*, probably due to the method used (cultivation-independent method), increasing the knowledge about the microbial diversity of water kefir grains. The present results will provide the basis for understanding the complex symbiotic interactions presented in the BIONAT-I consortium, as well as the characteristics of these grains, providing conditions for the development of new biotechnological products, as consortian EPS.

ACKNOWLEDGMENT

The authors are grateful to Technological Institute for Biosustainable Chains (ITCBio) for the support.

REFERENCES

1. LA RIVIÈRE JWM, KOOIMAN F, SCHMIDT K. Kefiran, a Novel Polysaccharide Produced in the Kefir Grain by *Lactobacillus brevis*. Archiv für Mikrobiologie. 1967;59: 269-278.
2. PINTADO M, DA SILVA J, FERNANDES P, MALCATO F, HOGG T. Microbiological and rheological studies on Portuguese kefir grains. International Journal of Food Science & Technology. 1996;31: 15-26.
3. MEDRANO, M; PÉREZ, P. F.; ABRAHAM, A. G. Kefiran antagonizes cytopathic effects of *Bacillus cereus* extracellular factors. International Journal of Food Microbiology. 2008;122: 1–7.
4. PIERMARIA JA, PINOTTI A, GARCIA MA, ABRAHAM AG. Films based on kefir, an exopolysaccharide obtained from kefir grain: development and characterization. Food Hydrocolloids. 2009;23: 684–690.
5. GHASEMLOU M, KHODAIYAN F, OROMIEHIE A, YARMAND MS. Development and characterisation of a new biodegradable edible film made from kefir, an exopolysaccharide obtained from kefir grains. Food Chemistry. 2011;127: 1496–1502.
6. HORISBERGER M. Structure of the dextran of the tibi grain. Carbohydrate Research. 1969;10: 379-385.
7. ZOURARI A, ANIFANTAKIS EM. Le kéfir. Caractères physico-chimiques, microbiologiques et nutritionnels. Technologie de production. Une revue. Le Lait, INRA Editions. 1988;68: 373-392.

8. GARROTE GL, ABRAHAM AG, DE ANTONI GL. Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. *Journal of Dairy Research*. 2001;68: 639-652.
9. POGAČIĆ T, ŠINKO S, ZAMBERLIN S, SAMARŽIJA D. Microbiota of kefir grains. *Mljekarstvo*. 2013;63: 3-14.
10. REAKA-KUDLA ML, WILSON DE, WILSON EO. *Biodiversity II: Understanding and Protecting Our Biological Resources*. Joseph Henry Press, Washington, 1997.
11. BULL AT, WARD AC, GOODFELLOW M. Search and Discovery Strategies for Biotechnology: the Paradigm Shift. *Microbiology and molecular biology reviews*. 2000;64(3): 573-606.
12. GARZA DR, DUTILH BE. From cultured to uncultured genome sequences: metagenomics and modeling microbial ecosystems. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2015;72: 4287–4308.
13. PFISTER CA, MEYER F, ANTONOPOULOS DA. Metagenomic profiling of a microbial assemblage associated with the California mussel: a node in networks of carbon and nitrogen cycling. *PloS One*. 2010 May 6. e10518. doi: 10.1371/journal.pone.0010518.
14. IZARD J, RIVERA MC. *Metagenomics for Microbiology*. Elsevier/Academic Press, 1 Ed., 188p., 2015.
15. ITCBIO - INSTITUTO TECNOLÓGICO DAS CADEIAS BIOCIENTÍFICAS (Recife-PE). Processo de obtenção de exopolissacarídeo tipo beta-glucana, extraído de consórcio microbiano do kefir, com características de hidrogel superabsorvente, ação citotóxica para linhagens neoplásicas, ação imunomoduladora e matéria-prima para filme polimérico bioativo. n. BR 102017025627-8, 29 nov. 2017.
16. MAGOČ T, SALZBERG SL. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics*. 2011;27: 2957-2963.
17. CAPORASO JG, KUCZYNSKI J, STOMBAUGH J, BITTINGER K, BUSHMAN FD, COSTELLO EK, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature methods*. 2010;7(5): 335-336.
18. EDGAR RC, HAAS BJ, CLEMENTE JC, QUINCE C, KNIGHT R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*. 2011;27(16): 2194-2200.
19. EDGAR RC. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature methods*. 2013;10(10): 996-998.
20. TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, FILIPSKI A, KUMAR S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 2013;30: 2725-2729.
21. GARROTE GL, ABRAHAM AG, DE ANTONI GL. Preservation of kefir grains, a comparative study. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*. 1997;30: 77–84.

22. CHEN H, WANG S, CHEN K, LIU J, CHEN M. Microbiological and chemical properties of kefir manufactured by entrapped microorganisms isolated from kefir grains. *Journal of Dairy Science*. 2009;92: 3002–3013.
23. MAGALHÃES KT, PEREIRA GVM, CAMPOS CR, DRAGONE G, SCHWAN RF. Brazilian kefir: structure, microbial communities and chemical composition. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2011;42: 693-702.
24. VARIN T, LOVEJOY C, JUNGBLUT AD, VINCENT WF, CORBEIL J. Metagenomic analysis of stress genes in microbial Mat communities from Antarctica and the high arctic. *Applied and Environmental Microbiology*. 2012;78.
25. WANG S, CHEN H, LIU J, LIN Y, CHEN M. Identification of yeasts and evaluation of their distribution in taiwanese kefir and viili starters. *Journal of Dairy Science*. 2008;91(10): 3798-3805.
26. DEGNAN PH, OCHMAN H. Illumina-based analysis of microbial community diversity. *The ISME Journal*. 2012;6: 183–194.
27. YOUSSEF N, SHEIK CS, KRUMHOLZ LR, NAJAR FZ, ROE BA, ELSHAHED MS. Comparison of Species Richness Estimates Obtained Using Nearly Complete Fragments and Simulated Pyrosequencing-Generated Fragments in 16S rDNA Gene-Based Environmental Surveys. *Applied and Environmental microbiology*. 2009;75(16): 5227–5236.
28. HESS M, SCZYRBA A, EGAN R, KIM T, CHOKHAWALA H, SCHROTH G, et al. Metagenomic Discovery of Biomass-Degrading Genes and Genomes from Cow Rumen. *Science*. 2011;331: 463-467.
29. HORTON TR, BRUNS TD. The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black-box. *Molecular Ecology*. 2001;10:1855–1871.
30. RIESENFELD CS, SCHLOS, PD, HANDELSMAN J. Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. *Annual Review of Genetics*. 2004;38:525-552.
31. LEITE AMO, MAYO B, RACHID CTCC, PEIXOTO RS, SILVA JT, PASCHOALIN VMF et al. Assessment of the microbial diversity of Brazilian kefir grains by PCR-DGGE and pyrosequencing analysis. *Food Microbiology*. 2012; 31: 215-221.
32. DOBSON A, O'SULLIVAN O, COTTER PD, ROSS P, HILL C. High-throughput sequence-based analysis of the bacterial composition of kefir and an associated kefir grain. *FEMS Microbiology Letters*. 2011;320:56–62.
33. GULITZ A, STADIE J, EHRMANN MA, LUDWIG W, VOGEL RF. Comparative phylobiomic analysis of the bacterial community of water kefir by 16S rDNA gene amplicon sequencing and ARDRA analysis. *Journal of Applied Microbiology*. 2013;114:1082—1091.
34. GAO J, GU F, HE J, JIANZHONG X, QIHE C, HUI R, et al. Metagenome analysis of bacterial diversity in Tibetan kefir grains. *European Food Research and Technology*. 2013;236: 549-556.

35. BOKULICH NA, SUBRAMANIAN S, FAITH JJ, GEVERS D, GORDON JI, KNIGHT R, et al. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nature Methods*. 2012;10(1): 57-59.
36. WOOLEYJC, GODZIK A, FRIEDBERG I. A Primer on Metagenomics. *PLoS Computational Biology*. 2010;6: 1-13.
37. MACDONALD GM. *Biogeography: Space, Time, and Life*. New York, NY: John Wiley & Sons, Inc. 2003.
38. MAGURRAN AE. *Measuring Biological Diversity*. Blackwell. 2003.
39. MARSH AJ, O'SULLIVAN O, HILL C, ROSS RP, COTTER PD. Sequence-based analysis of the microbial composition of water kefir from multiple sources. *FEMS Microbiology Letters*. 2013;348:79–85.
40. HSIEH H, WANG S, CHEN T, HUANG Y, CHEN M. Effects of cow's and goat's milk as fermentation media on the microbial ecology of sugary kefir grains. *International Journal of Food Microbiology*. 2012;157: 73-81.
41. SJÖBLOM M, MATSAKAS L, CHRISTAKOPOULOS P, ROVA U. Production of butyric acid by *Clostridium tyrobutyricum* (ATCC25755) using sweet sorghum stalks and beet molasses. *Industrial Crops and Products*, 2015;74: 535–544.
42. KLIJN N, BOVIE C, DOMMES J, NIEUWENHOF FFJ. Identification of *Clostridium tyrobutyricum* and Related Species using Sugar Fermentation, Organic Acid Formation and DNA Probes Based on Specific 16S rDNA Sequences. *Systematic and Applied Microbiology*. 1994;17(2): 249–256.
43. MARSH AJ, O'SULLIVAN O, HILL C, ROSS RP, COTTER PD. Sequencing-based analysis of the bacterial and fungal composition of kefir grains and milks from multiple sources. *PLoS One*. 2013;8(7): 1-11.
44. LAUREYS D, CNOCKAERT M, DE VUYST L, VANDAMME P. *Bifidobacterium aquikefiri* sp. nov., isolated from water kefir. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2016;66: 1281–1286.
45. XING D, REN N, LI Q, LIN M, WANG A, ZHAO L. *Ethanoligenens harbinense* gen. nov., sp. nov., isolated from molasses wastewater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2006;56: 755–760.
46. REN N, XING D, RITTMANN BE, ZHAO L, XIE T, ZHAO X. Microbial community structure of ethanol type fermentation in bio-hydrogen production. *Environmental Microbiology*. 2007;9(5): 1112–1125.
47. ASSEFA S, AHLES K, BIGELOW S, CURTIS JT, KÖHLER GA. *Lactobacilli* with probiotic potential in the prairie vole *Microtus ochrogaster*. *Gut Pathogens*. 2015;7:53-69.
48. NALBANTOGLU, U. et al. Metagenomic analysis of the microbial community in kefir grains. *Food Microbiology*. 2014;41: 42-51.

49. GAROFALO C, OSIMANI A, MILANOVI V, AQUILANTI L, DE FILIPPS F, STELLATO G, et al. Bacteria and yeast microbiota in milk kefir grains from different Italian regions. *Food Microbiology*. 2015;49: 123-133.
50. MAGALHÃES KT, PEREIRA GVM, DIAS DR, SCHWAN RF. Microbial communities and chemical changes during fermentation of sugary Brazilian kefir. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2010;26: 1241–1250.
51. MIGUEL MGCP, CARDOSO PG, MAGALHÃES-GUEDES KT, SCHWAN RF. Profile of microbial communities present in tibico (sugary kefir grains from different Brazilian States, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2011;27: 1875–1884.
52. LAUREYS D, DE VUYST L. Microbial species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of water kefir fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*. 2014;80(8): 2564–2572.
53. LATORRE-GARCÍA L, DEL CASTILLO-AGUDO L, POLAINA J. Taxonomical classification of yeasts isolated from kefir based on the sequence of their ribosomal RNA genes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2007;23:785–791.
54. BAI M, QING M, GUO Z, ZHANG Y, CHEN X, BAO Q, et al. Occurrence and dominance of yeast species in naturally fermented milk from the Tibetan Plateau of China. *Canadian Journal of Microbiology*. 2010;56: 707–714.
55. MIGUEL MGCP, CARDOSO PG, MAGALHÃES-GUEDES KT, SCHWAN RF. Identification and assessment of kefir yeast potential for sugar/ethanol-resistance. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2013;44(1):113-118.
56. FIORDA FA, MELO GV, THOMAZ-SOCCOL V, MEDEIROS AP, RAKSHIT SK, SOCCOL CR. Development of kefir-based probiotic beverages with DNA protection and antioxidant activities using soybean hydrolyzed extract, colostrum and honey. *LWT - Food Science and Technology*, doi: 10.1016/j.lwt.2016.01.003, 2016.
57. WYDER M, MEILE L, TEUBER M. Description of *Saccharomyces turicensis* sp. nov., a new Species from Kefyr. *Systematic and Applied Microbiology*. 1999;22: 420-425.
58. GAO W, ZHANG L, FENG Z, LIU H, SHIGWEDHA N, HAN X, et al. Microbial diversity and stability during primary cultivation and subcultivation processes of Tibetan kefir. *International Journal of Food Science and Technology*, 2015;50(6): 1468-1476.
59. LIBERAL ATS, BASÍLIO ACM, RESENDE AM, BRASILEIRO BTV, SILVA-FILHO EA, MORAIS JOF, et al. Identification of *Dekkera bruxellensis* as a major contaminant yeast in continuous fuel ethanol fermentation. *Journal of Applied Microbiology*. 2006;102:538-547.
60. MENEHIN MC, BASSI AP, CODATO CB, REIS VR, CECCATO-ANTONINI S R. Fermentative and growth performances of *Dekkera bruxellensis* in different batch systems and the effect of initial low cell counts in co-cultures with *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 2013;30(8): 295-305.

61. SILVA TCD, LEITE FCB, MORAIS JR. MA. Distribution of *Dekkera bruxellensis* in a sugarcane-based fuel ethanol fermentation plant. *Letters in Applied Microbiology*. 2016;62: 354-358.
62. BASSI APG, ANTONINI SRC. Tolerância ao estresse e características fermentativas de leveduras *Dekkera bruxellensis* isoladas da fermentação alcoólica. 2011.[s.n.], Piracicaba, 2011. Disponível em:
<<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11141/tde-22112011-082855/>>.
63. JAMES SA, STRATFORD M. Spoilage yeasts with emphasis on the genus *Zygosaccharomyces*. in *Yeasts in Food. Beneficial and Detrimental Aspects*. ed. BOEKHOUT, T., ROBERT, V., B. Behr's Verlag, Hamburg, 1Ed., cap. 6, 30 p., 2003.
64. ROMANO P, SUZZI G. Higher alcohol and acetoin production by *Zygosaccharomyces* wine yeasts. *Journal of Applied Bacteriology*. 1993;75: 541-545.
65. WANG Q, XU J, WANG H, LI J, BAI F. *Torulaspora quercuum* sp. nov. and *Candida pseudohumilis* sp. nov., novel yeasts from human and forest habitats. *FEMS Yeast Research*,2009;9: 1322–1326.
66. RATTRAY FP, O'CONNELL MJ. Fermented Milks Kefir. in: *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Fukay, J. W., 2th ed. Academic Press; San Diego, 2011.

5.3 ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E DIFERENCIAÇÃO POR RESTRIÇÃO ENZIMÁTICA DE MICRO-ORGANISMOS DE GRÃOS DO CONSÓRCIO DE KEFIR BIONAT-I.

Natália Almeida Onofre-Cordeiro¹, José Antônio Santos Junior², Marília Alves de Lima², Bruna Corina S. Lima², Alice Conceição M. Florêncio², Rodrigo Juan M. Cardozo², Claudia Sampaio de Andrade Lima²; Ricardo Yara³, Ederson Akio Kido¹

1. *Laboratório de Genética Molecular - Departamento de Genética – Universidade Federal de Pernambuco.*

2. *Laboratório de Biofísica Química - Departamento de Biofísica e Radiobiologia – Universidade Federal de Pernambuco*

3. *Departamento de Engenharia Biomédica – Universidade Federal de Pernambuco.*
natiaonofre@gmail.com

RESUMO

Kefir é um consórcio microbiano, formado por bactérias e leveduras, que fermentam açúcar, produzindo um probiótico. Durante o processo de fermentação, os micro-organismos que compõe o consórcio produzem exopolissacarídeos (EPS), formando os grãos. O objetivo deste trabalho foi isolar bactérias e leveduras a partir de grãos do consórcio de kefir BIONAT-I, e agrupá-las através do perfil de digestão utilizando uma enzima de restrição. O isolamento dos micro-organismos foi feito através de cultivo em Tryptic Soy Agar (TSA), De Man, Rogosa and Sharpe Agar (MRS) utilizando condições de anaerobiose e Chloramphenicol Yeast Glucose Agar (CYG), sendo realizada a contagem de UFC/mL. Os isolados foram caracterizados morfologicamente e através de coloração de Gram e teste de catalase. Após isolamento, foi realizada a extração de DNA e amplificação por PCR das regiões 16S rDNA para bactérias e ITS para leveduras. Os fragmentos amplificados nas reações foram clivados com enzima *TaqI*. Os padrões de clivagem obtidos foram comparados entre si, a fim de serem diferenciados os isolados. Dentre 28 dos 46 morfotipos isolados, dois cresceram em CYG, 10 em MRS e 16 em TSA. Destes, três foram Gram-negativos, 25 foram Gram-positivos, 13 catalase-negativos e 15 catalase-positivos. Os produtos de PCR apresentaram tamanho entre 1.500-1.800 pb e cerca de 800 pb para os genes 16S e ITS respectivamente. A partir dos perfis de restrição obtidos, os morfotipos foram divididos em 13 grupos. Portanto, o

isolamento e agrupamento dos isolados contribuirão para a obtenção de colônias puras com potencial biotecnológico a ser explorado.

Palavras-chaves: Kefir, bactérias, leveduras, clivagem.

INTRODUÇÃO

Kefir é um consórcio microbiano simbiote, formados por bactérias ácido-láticas, ácido-acéticas e leveduras, que, através de processo fermentativo, produz líquido de consumo *in natura*, com diversas propriedades benéficas à saúde. Originário das montanhas do Cáucaso, a produção artesanal do kefir baseada na cultura alimentar de seus povos, difundiu-se a partir do final do século XX, passando a ocupar um importante lugar na alimentação humana em várias partes do mundo, principalmente em virtude de seus significativos valores terapêutico e nutricional (GARROTE, ABRAHAM e DE ANTONI, 2001; World Health Organization, 2003).

O kefir apresenta-se macroscopicamente como grãos gelatinosos, de forma irregular e tamanho variado (entre 3 a 20 mm), de coloração variável de acordo com o substrato, que pode ser leite, suco de frutas ou água com açúcar mascavo, onde ocorre naturalmente a fermentação (MARSHAL, 1993; WALDHERR et al., 2010). Durante a fermentação, os grãos se multiplicam e aumentam de volume, transferindo suas propriedades às gerações seguintes (GARROTE, ABRAHAM e DE ANTONI, 2001). A composição microbiológica do kefir sofre grande variação com o método e substrato utilizados para o cultivo (GARROTE; ABRAHAM; DE ANTONI, 2001), podendo resultar em produtos diferenciados no processo fermentativo.

Os micro-organismos presentes nos grãos de kefir, através de fermentação, produzem EPS. Kefirana é produzida por bactérias ácido lácticas (BAL) presentes em grãos de kefir cultivados em leite. Dextrana é o EPS produzido por BAL que compões os grãos de kefir cultivados em água (WANG et al., 2008; MARSH et al., 2013). O consórcio de kefir BIONAT-I, utilizado neste trabalho, é produtor de consorciana, um novo EPS extraído de consórcio de kefir, cuja obtenção está sob sigilo de patente com registro BR 102017025627-8 (ITCBIO, 2017). Entretanto, a população microbiana constituinte do consórcio BIONAT-I ainda é desconhecida e não identificada.

De acordo com Pogačić et al. (2013) a identificação da microbiota do kefir tem múltiplos propósitos científicos e produtivos, como a composição de fermentos, o isolamento do organismo com potenciais características probióticas e bioquímicas, entre outras, podendo o isolamento de micro-organismos do kefir resultar em cepas com características totalmente diferentes. Além disso, é útil para direcionar a seleção de micro-organismos que apresentem genes favoráveis para a produção do polissacarídeo.

A técnica de restrição enzimática de produtos de PCR pode ser utilizada na identificação molecular de comunidades microbianas. Neste sentido, a análise da sequência do DNA ribossomal (rDNA) é adequado para esse propósito, uma vez que os genes ribossomais apresentam estabilidade funcional no decorrer da evolução, apresentando assim rara variação intraespecífica em suas sequências ao longo de milhares de anos (AWAD et al., 2015).

Neste trabalho foram isoladas bactérias e leveduras a partir de grãos do consórcio de kefir BIONAT-I, caracterizadas morfologicamente e agrupadas através do uso de uma enzima de restrição, para obtenção e comparação de padrões de clivagem. Pretende-se, com isto, obter colônias puras para posterior estudo e exploração de seu potencial biotecnológico.

MATERIAL E MÉTODOS

MANUTENÇÃO DA CULTURA DO CONSÓRCIO BIONAT-I

Grãos de kefir foram adquiridos de consumidores, que utilizavam de forma artesanal. O consórcio de kefir BIONAT-I foi obtido através de uma seleção, utilizando como parâmetro a produção de biomassa em meio hipertônico (NASCIMENTO, 2017).

Os grãos do consórcio BIONAT-I são mantidos fermentando em solução de açúcar mascavo comercial a 50% (p/v). A solução de açúcar mascavo é filtrada para remover possíveis impurezas. As culturas são mantidas em temperatura ambiente, a partir de múltiplas repicagens a cada 48 horas.

ISOLAMENTO DE MICRO-ORGANISMOS DO CONSÓRCIO BIONAT-I

Para o isolamento dos micro-organismos, 1 g de grãos de kefir foi adicionado em 9 mL de solução salina esterilizada e homogeneizados em agitador por 1 minuto. Foram então realizadas diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-8} . Alíquotas de 0,1 mL das diluições 10^{-5} a 10^{-8} foram plaqueadas, através de método de semeadura por espalhamento, em três diferentes meios de cultura, preparados conforme instrução dos fabricantes: Tryptic Soy Agar (TSA) (HIMEDIA), não seletivo; De Man, Rogosa and Sharpe Agar (MRS) (HIMEDIA) para bactérias ácido-láticas, sendo estas culturas incubadas em jarras de anaerobiose (GARROTE, ABRAHAM e DE ANTONI, 2001; CHEN et al., 2009); e Chloramphenicol Yeast Glucose Agar (CYG) (HIMEDIA), seletivo para leveduras (GARROTE, ABRAHAM e DE ANTONI, 2001). Os meios TSA e MRS foram adicionados de 100 mg.L^{-1} de fluconazol para inibir o crescimento de leveduras.

As placas foram incubadas a $35 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 7 dias, sendo todos os ensaios realizados em triplicata. Foi realizada a contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) e o resultado foi obtido por meio da média da contagem das repetições x fator de diluição / volume inoculado, sendo expresso em UFC/mL.

Os isolados foram purificados através de semeio por esgotamento no mínimo três vezes e armazenados, em curto prazo em meio sólido contido em tubos de ensaio com repique contínuo, em médio prazo através de preservação em óleo mineral e em longo prazo em meio líquido contendo glicerol a -80°C .

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, COLORAÇÃO DIFERENCIAL E TESTE DE CATALASE

As colônias isoladas foram caracterizadas em diferentes morfotipos, através de observação de forma, tamanho, cor, borda, elevação e superfície. A coloração de Gram foi realizada com todas as colônias isoladas, conforme procedimento descrito em Madigan et al. (2016).

Para realização do teste de catalase, uma alíquota de cada colônia pura foi misturada a uma gota de peróxido de hidrogênio, em uma lâmina de microscopia. A reação positiva foi observada imediatamente pela formação de bolhas, indicando a presença da enzima.

DIFERENCIAÇÃO DAS COLÔNIAS ISOLADAS POR RESTRIÇÃO ENZIMÁTICA

Inicialmente foi feita a extração de DNA das colônias isoladas, utilizando o kit Gentra® Puregene Yeast/Bact (Qiagen®, USA), seguindo as orientações do fabricante. Em seguida, os genes foram amplificados por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando termociclador SimpliAmp™ (Applied Biosystems by Life Technologies). O gene 16S de bactérias foi amplificado, utilizando os *Primers* 16S *forward* (5'CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG3') e 16S *reverse* (5'CCCGGGATCCAAGCTTACGGCTACCTTGTACGACTT3'), sendo o tamanho do produto de PCR esperado de 1500 pb. O programa de amplificação usado foi: 1 ciclo (94 °C por 3 minutos), 30 ciclos (94 °C por 30 segundos, 56 °C por 30 segundos e 72 °C por 2 minutos) e o último ciclo (72 °C por 5 minutos).

Para Leveduras foi realizada a amplificação da região ITS, utilizando os *Primers* ITS1 (5'CTTGTTTCATTTAGAGGAAGTAA3') e ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3'), com o programa de amplificação de: 1 ciclo (95 °C por 5 minutos), 30 ciclos (94 °C por 30 segundos, 50 °C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos) e o último ciclo (72 °C por 7 minutos). O produto de PCR esperado é de 600 pb. As amplificações foram confirmadas por meio de eletroforese em gel de agarose a 1%, utilizando como padrão marcador de peso molecular de 100pb (Ludwig Biotec), corados com Sybr Safe (Sigma Aldrich).

Os fragmentos amplificados nas reações foram clivados com enzima *TaqI*. As misturas para a clivagem foram compostas por 15 µL de produto de PCR (DNA), 2 µL do tampão 10 X, 2 µL de Albumina Sérica Bovina 0,1 % (BSA) e 1 µL da enzima, totalizando 20 µL de volume. A mistura foi então incubada a 65 °C por 1 hora e em seguida inativada a 80 °C por 20 minutos. Os produtos de clivagem foram analisados em géis de poliacrilamida a 3,5 %, juntamente com o peso molecular de 100 pb, corados com Sybr Safe, sendo observados e fotodocumentados em fotodocumentador para gel de eletroforese L-PIX EX (Loccus). A partir da digestão com a enzima foram gerados fragmentos com tamanhos diferentes. Os padrões de clivagem obtidos foram comparados entre si, a fim de serem diferenciados os morfotipos de bactérias e leveduras isoladas. A partir da utilização de uma matriz de presença e ausência foi gerado um dendograma com o método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean*), usando o coeficiente Dice, com bootstrap (10.000 repetições), utilizando o software DARwin 6.0.15.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi observado o crescimento de colônias nos três meios inoculados. A **Tabela 1** apresenta a contagem de UFC/mL para os diferentes meios de cultura. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (2003), na constituição do kefir de leite, deve haver no total de micro-organismos, no mínimo, 10^7 UFC/mL e um mínimo de 10^4 UFC/mL de leveduras. Gulitz (2013), analisando a diversidade da microbiota de kefir de água por métodos dependentes de cultivo, obteve $1,6 \times 10^8$ UFC/mL de bactérias ácido lácticas em MRS e $6,4 \times 10^6$ UFC/mL de leveduras em YPG (yeast peptone glucose), resultados próximos aos obtidos no presente estudo.

Tabela 1 - Contagem de UFC/mL do consórcio BIONAT – I em três diferentes meios de cultura.

MEIO	UFC/mL
MRS ¹	$1,4 \times 10^9$
TSA ²	2×10^7
CYG ³	$1,5 \times 10^6$

¹De Man Rogosa Sharpe; ²Tryptic Soy Agar; ³Chloranfenicol Yeast Glucose.

Através de cultivo nos meios utilizados, diferenciaram-se 46 morfotipos de colônias, das quais as primeiras 28 foram selecionados, sendo que duas dessas cresceram no meio seletivo para leveduras (CYG), 10 em meio para bactérias ácido lácticas, sob condições de anaerobiose (MRS) e 16 em meio não seletivo para bactérias (TSA). Foi feita, então, a caracterização morfológica das colônias, bem como as análises da coloração de Gram, morfologia e arranjo celular e teste de catalase dos 28 morfotipos selecionadas (**Tabela 2**).

Tabela 2 - Caracterização morfológica, coloração de Gram, morfologia e arranjo celular e teste de catalase das colônias isoladas do consórcio BIONAT – I.

MORFOTIPO	MEIO	FORMA	TAMANHO	COR	BORDA	CENTRO	SUPERFÍCIE	GRAM	MORFOLOGIA/ ARRANJO	CATALASE
B1	TSA	Circular	2 mm	Branca opaca	Lisa	Elevado	Lisa	G+	Bacilos	+
B2	TSA	Puntiforme	-	Branca brilhante	Lisa	Elevado	Rugosa	G+	Bacilos	+
B3	TSA	Circular	5 mm	Branca opaca	Lisa	Umbonado	Lisa	G+	Bacilos	-
B4	TSA	Irregular	3 mm	Bege opaca	Lobada	Elevado	Rugosa	G-	Bacilos	+
B5	TSA	Circular	1 mm	Branca	Filamentosa	Elevado	Lisa	G+	Bacilos grandes	-
B6	TSA	Circular	10 mm	Branca opaca	Filamentosa	Elevado	Filamentosa	G+	Bacilos grandes	-
B7	TSA	Puntiforme	-	Transparente	Lisa	Elevado	Lisa	G+	Bacilos longos	+
B8	TSA	Circular	1 mm	Amarela	Lisa	Elevado	Rugosa	G+	Cocos	+
B9	TSA	Circular	1 mm	Branca opaca	Lisa	Elevado	Lisa	G+	Cocos	+
B10	TSA	Circular	2 mm	Branca opaca	Lisa	Elevado	Lisa	G+	Cocos	+
B11	TSA	Puntiforme	-	Amarela	Lisa	Elevado	Lisa	G+	Cocos	+
B12	TSA	Circular	2 mm	Branca	Lisa	Elevado	Lisa	G+	Cocos em cachos	+
B13	TSA	Circular	1 mm	Branca	Lisa	Elevado	Lisa	G+	Cocos em tétrades	+
B14	TSA	Circular	1,5 mm	Transparente	Lisa	Elevado	Lisa	G+	Cocos pequenos	+
B15	TSA	Circular	1 mm	Branca brilhante	Lisa	Elevado	Lisa	G+	Cocos pequenos	+
B16	TSA	Circular	2 mm	Branca	Lisa	Elevado	Lisa	G+	Cocos pequenos	+

Tabela 2 - Continuação.

MORFOTIPO	MEIO	FORMA	TAMANHO	COR	BORDA	ELEVAÇÃO	SUPERFÍCIE	GRAM	MORFOLOGIA/ ARRANJO	CATALASE
B17	MRS	Puntiforme	-	Branca brilhante	Lisa	Elevado	Lisa	G+	Cocos em cachos	-
B18	MRS	Circular	2 mm	Bege com centro escuro	Lisa	Umbonado	Lisa	G+	Bacilos	-
B19	MRS	Circular	1,5 mm	Transparente	Lisa	Plana	Granulosa	G+	Cocos em cachos	-
B20	MRS	Fusiforme	2 mm	Branca brilhante	Lisa	Convexa	Lisa	G+	Bacilos	-
B21	MRS	Circular	1 mm	Branca brilhante	Lisa	Umbonado	Lisa	G-	Bacilos	-
B22	MRS	Puntiforme	-	Transparente	Lisa	Plana	Lisa	G-	Cocos	-
B23	MRS	Irregular	3 mm	Transparente	Lobada	Convexa	Lisa	G+	Bacilos	+
B24	MRS	Circular	1,5 mm	Branca brilhante	Lisa	Elevado	Lisa	G+	Cocos em cadeia	-
B25	MRS	Circular	2 mm	Transparente	Lisa	Elevado	Lisa	G+	Cocos em tétrades	-
B26	MRS	Puntiforme	-	Branca opaca	Lisa	Elevado	Lisa	G+	Bacilos	-
L27	CYG	Puntiforme	-	Branca opaca	Lisa	Elevada	Lisa	G+	Leveduras com brotamento	-
L28	CYG	Circular	1 mm	Branca opaca	Lisa	Elevada	Lisa	G+	Leveduras com brotamento	-

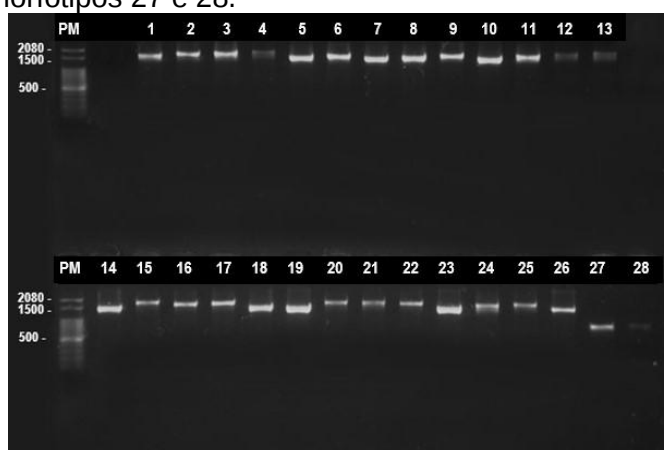
B: Bactéria; L: Levedura.

Ao utilizar meios não seletivos, os testes de Gram e catalase são úteis para uma triagem inicial. Um dos primeiros passos para identificar bactérias é a coloração diferencial, que ao contrário das colorações simples, reage, de forma distinta, com diferentes tipos de células bacterianas, sendo usada para diferenciá-las. A coloração de Gram, que classifica as bactérias em dois grupos: gram-positivas e gram-negativas é uma das principais colorações diferenciais (TORTORA, FUNKE e CASE, 2012). Dos 28 morfotipos de micro-organismos isolados, 89,3% foram classificados como Gram-positivos e 10,7% como Gram-negativos.

Quanto ao teste de catalase, 53,6% das colônias foram positivas e 46,4% foram negativas. O teste de catalase foi utilizado para detectar a presença da enzima catalase, que elimina a toxicidade do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), transformando-o em oxigênio (O_2) e água (H_2O), sendo normalmente encontrada em bactérias capazes de crescer na presença de oxigênio. Sendo assim, bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas normalmente contêm catalase. Já as anaeróbias obrigatórias, em geral não produzem a enzima (TORTORA, FUNKE e CASE, 2012; MADIGAN et al., 2016).

Após a caracterização das colônias, foi feita a extração de DNA dos isolados. Os produtos de PCR do gene 16S rDNA apresentaram um tamanho entre 1.500 e 1.800 pb e os do gene ITS tiveram um tamanho em torno de 800 pb (**Figura 1**).

Figura 1 - Amplificação de uma região do gene 16S para os morfotipos 1 a 26 e de uma região ITS para os morfotipos 27 e 28.

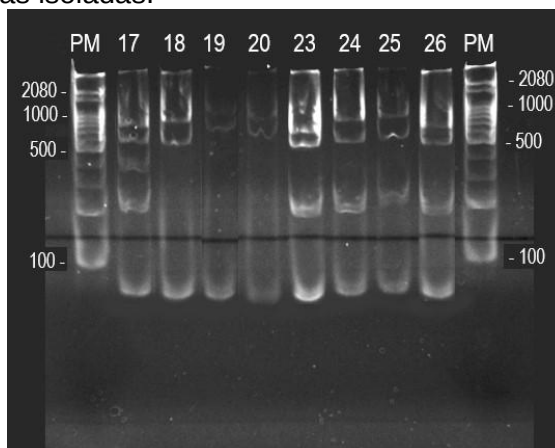


Linha PM = Marcador de Peso Molecular de 1000 pb DNA ladder.

Comparando os perfis de restrição, gerados a partir da clivagem com a enzima *TaqI* (**Figura 2**), foi feito um agrupamento molecular. Conforme mostrado na

Tabela 3, um total de 13 grupos foi formado de acordo com o perfil de digestão pela enzima, sendo 11 grupos de bactérias e 2 grupos de leveduras.

Figura 2 - Exemplo de perfil de restrição obtido por clivagem com a enzima *TaqI* de alguns dos morfotipos de colônias isoladas.



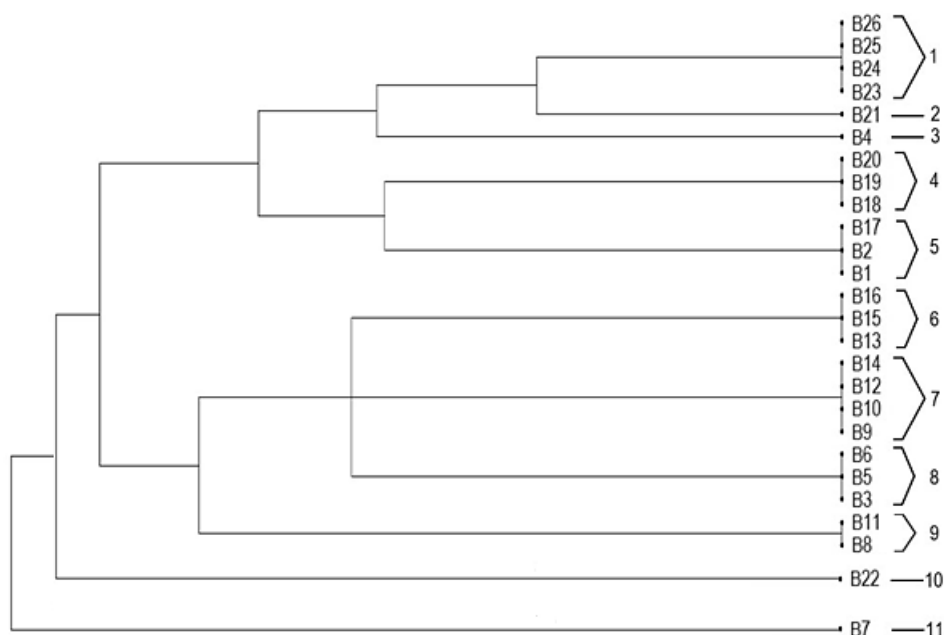
Linha PM = Marcador de Peso Molecular de 1000 pb DNA ladder.

Tabela 3 - Agrupamento molecular dos 28 isolados do consórcio BIONAT-I.

GRUPO	FRAGMENTOS (pb)	MORFOTIPOS	MEIO	MORFOLOGIA	GRAM	CATALASE
1	~700, ~500, ~200, <100	B26, B25, B24, B23	MRS	Cocos	+	-
2	~1000, ~700, <100	B21	MRS	Bacilos	-	-
3	~500, ~400, ~350, ~200, <100	B4	TSA	Bacilos	-	+
4	~800, ~500, ~300, ~200, <100	B18, B19, B20	MRS	Bacilos	+	-
5	~900, ~550, <100	B1, B2, B17*	MRS/TSA*	Bacilos	+	+
6	~400, ~300, ~200, ~100	B13, B15, B16	TSA	Cocos	+	+
7	~900, ~500, ~300, ~100	B9, B10, B12, B14	TSA	Cocos	+	+
8	~800, ~400, ~300	B3, B5, B6	TSA	Bacilos	+	-
9	~800, ~400, ~250, <100	B11, B8	TSA	Cocos	+	+
10	~650, ~350, ~250	B22	MRS	Cocos	-	-
11	~550, ~350, ~250	B7	TSA	Bacilos	+	+
12	~400	L27	CYG	Levedura	+	-
13	~400, ~200, ~100	L28	CYG	Levedura	+	-

A Figura 3 apresenta o dendograma gerado com os dados obtidos na clivagem com *TaqI* (**Figura 3**).

Figura 3 - Dendrograma obtido pelo método UPGMA para os 11 grupos de bactérias formados após clivagem.



A técnica de restrição enzimática utilizando o gene 16S rDNA tem como vantagens a simplicidade, baixo custo e amplo escopo de aplicação (Zeng et al., 2012). Uma vez que a enzima reconhece e cliva o DNA em um sítio específico, e, salvo algumas exceções, cada micro-organismo tem seus sítios de restrição únicos, micro-organismos diferentes produzem fragmentos em número e tamanho diferentes quando tratados com determinada enzima de restrição. Dessa forma, o uso da técnica utilizando a enzima *TaqI* possibilitou a diferenciação molecular entre 13 (11 grupos de bactérias e dois grupos de leveduras) das 28 colônias isoladas, sendo assim eficiente para diferenciar alguns morfotipos e indicando a necessidade de utilização de outras enzimas, a fim de se tentar diferenciar as demais.

As técnicas moleculares Polimorfismo no Comprimento do Fragmento de Restrição (Restriction Fragment Length Polymorphism - RFLP) e Análise de Restrição do DNA Ribossômico Amplificado (ARDRA), que utilizam enzimas de restrição, já foram aplicadas na identificação de micro-organismos de kefir de água e de leite (DELFEDERICO et al., 2006; MAINVILLE et al., 2006; ZANIRATI et al., 2015).

Através de RFLP, utilizando cepas de micro-organismos padrão (American Type Culture Collection – ATCC) para comparação dos perfis de restrição gerados, Mainville et al. (2006) caracterizaram bactérias ácido lácticas isoladas de kefir de

leite, com uso de meios de cultura seletivos. Utilizando a enzima *HindIII*, conseguiram identificar, 6 de 10 cepas de *Lactobacillus* isoladas, sendo uma classificada como *Lb. kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens*, duas como *Lb. kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* e as três demais como *Lb. kefir*. Dentre as 8 cepas de *Lactococcus*, 3 foram classificadas, utilizando as enzimas *HindIII* e *EcoRI*, como *L. lactis* subsp. *cremoris* e as demais, através de clivagem com a enzima *EcoRI* foram classificadas como *L. lactis* subsp. *lactis*. Por fim, as duas cepas de *Leuconostoc* isoladas, foram classificadas como *Ln. mesenteroides* subsp. *Cremoris*.

No trabalho de Delfederico et al. (2006), 17 *Lactobacillus* isolados de grãos de kefir foram caracterizados por ARDRA utilizando as enzimas de restrição *HaeIII*, *DdeI* e *Hinfi*. Para comparação foram utilizadas cinco espécies de cepas de referência (*Lb. kefir*, *Lb. buchneri*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. plantarum*, *Lb. hilgardii*). Inicialmente ARDRA foi aplicada nas cepas de referência para verificar a capacidade da técnica em discriminar as espécies, sendo possível diferenciar cada uma. Ao analisar então os perfis de restrição dos isolados, foi confirmada a identidade de 16 deles como *Lb. kefir*.

Zanirati et al. (2015) utilizou 12 enzimas de restrição (*SphI*, *NcoI*, *NheI*, *SspI*, *SfuI*, *EcoRV*, *DraI*, *VspI*, *HincII*, *EcoRI*, *HindIII* e *AvrII*) para identificar bactérias Ácido Lácticas isoladas de kefir de água, através da técnica de ARDRA. Após a clivagem, foram obtidos 8 padrões, referentes às espécies *Lactobacillus casei*, *L. kefir*, *L. perolens*, *L. kefiranofaciens*, *L. satsumensis*, *L. mali*, *L. parafarraginis* e *L. diolivorans*.

Os dados encontrados na literatura apontam que, com uso de um conjunto de enzimas é possível, além da separação em grupos e diferenciação de morfotipos isolados, a identificação de micro-organismos (DELFEDERICO et al., 2006; MAINVILLE et al., 2006; ZANIRATI et al., 2015).

CONCLUSÃO

Utilizando diferentes meios de cultura, foi possível isolar, dos grãos do Kefir BIONAT – I, diversas colônias de micro-organismos, incluindo bactérias e leveduras. Os resultados apresentados indicam que o uso de restrição enzimática pode acessar a biodiversidade de micro-organismos do kefir BIONAT – I. A enzima *TaqI* se mostrou eficiente na diferenciação de parte dos isolados, contribuindo para a obtenção de

colônias isoladas. O potencial biotecnológico destes isolados poderá ser avaliado e futuramente explorado.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq 309779/2014-6) pelo apoio financeiro e ao Instituto Tecnológico de Cadeias Biotecnológicas (ITCBio) pelo suporte.

REFERÊNCIAS

- AWAD, MOHAMED; OUDA, OSAMA; EL-REFY, ALI; EL-FEKY, FAWZY A.; MOSA, KAREEM A.; HELMY, MOHAMED. FN-Identify: Novel Restriction Enzymes-Based Method for Bacterial Identification in Absence of Genome Sequencing. **Advances in Bioinformatics**, v. 2015, p. 1-14, 2015.
- CHEN, T. H.; WANG, S. Y.; CHEN, K. N.; LIU, J. R.; CHEN, M. J. Microbiological and chemical properties of kefir manufactured by entrapped microorganisms isolated from kefir grains. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 3002 – 3013, 2009.
- DELFEDERICO, LUCRECIA; HOLLMANN¹, AXEL; MARTÍNEZ, MARIANO; IGLESIAS, N. GABRIEL; DE ANTONI, GRACIELA; SEMORILE, LILIANA. Molecular identification and typing of lactobacilli isolated from kefir grains. **Journal of Dairy Research**, v.73, p.20–27, 2006.
- GARROTE, G. L.; ABRAHAM, A. G.; DE ANTONI, G. L. Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. **Journal of dairy research**, v. 68, p. 639-652, 2001.
- GULITZ, A. et al. Comparative phylobiomic analysis of the bacterial community of water kefir by 16S rRNA gene amplicon sequencing and ARDRA analysis. **Journal of applied microbiology**, v. 114, p. 1082-1091, 2013.
- ITCBIO - INSTITUTO TECNOLÓGICO DAS CADEIAS BIOCIENTÍFICAS (Recife-PE). **Processo de obtenção de exopolissacarídeo tipo beta-glucana, extraído de consórcio microbiano do kefir, com características de hidrogel superabsorvente, ação citotóxica para linhagens neoplásicas, ação imunomoduladora e matéria-prima para filme polimérico bioativo**. n. BR 102017025627-8, 29 nov. 2017.
- MADIGAN, MICHAEL; MARTINKO, JOHN; BENDER, KELLY; BUCKLEY, DANIEL; STAHL, DAVID. **Microbiologia de Brock**. 14 ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.
- MARSH, A. J. et al. Sequence-based analysis of the microbial composition of water kefir from multiple sources. **FEMS Microbiology Letters**, v. 348, p. 79-85, 2013.

MAINVILLE, ISABELLE ; ROBERT , NORMAND; LEE, BYONG; FARNWORTH , EDWARD R. Polyphasic characterization of the lactic acid bacteria in kefir. **Systematic and Applied Microbiology** v.29, p.59–68, 2006.

MARSHAL, V. M. Starter cultures for milk fermentation and their characteristics. **Journal of Dairy Technology**, v. 46, p. 49-56, 1993.

POGAČIĆ, T. et al. Microbiota of kefir grains. **Mljekarstvo**, v. 63, p. 3-14, 2013.

TORTORA, GERARD J.; FUNKE , BERDELL R.; CASE, CHRISTINE L. **Microbiologia**. 10 ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

ZANIRATI, D. F. et al. Selection of lactic acid bacteria from Brazilian kefir grains for potential use as starter or probiotic cultures. **Anaerobe**, v. 32, p. 70-76, 2015.

ZENG, Y. H.; KOBLIZEK, M.; LI, Y. X.; LIU, Y. P.; FENG, F. Y.; JI, J. D.; JIAN, J. C.; WU, Z. H. Long PCR-RFLP of 16S-ITS-23S rRNA genes: a high-resolution molecular tool for bacterial genotyping. **Journal of Applied Microbiology**, v.114, p.433—447, 2012.

WALDHERR, F. W. et al. Identification and characterization of a glucan-producing enzyme from *Lactobacillus hilgardii* TMW 1.828 involved in granule formation of water kefir. **Food Microbiology**, v. 27, p. 672-678, 2010.

WANG, Y. et al., Physicochemical properties of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefirianofaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.43, p.283–288, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION / FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Codex standard for fermented milks #243, 2003. Disponível em: <www.fao.org/input/download/standards/400/CXS_243e.pdf>. Acesso em: 05 set. 2017.

6 CONCLUSÕES

A biomassa produzida pelo consórcio BIONAT-I, quando submetida a um tratamento alcalino, resulta na extração de um EPS formado exclusivamente por resíduos de glicose, sendo caracterizada como 1→6 β -glucana sendo denominada consorciana.

A consorciana apresentou citotoxicidade de 70 % para linhagem de leucemia mielocítica crônica e 58 % para adenocarcinoma de mama humano, além de induzir a produção de citocinas IL-6 e TNF- α em células mononucleares do sangue periférico.

A 1-6- β -glucana se apresenta como biomaterial do tipo hidrogel superabsorvente, absorvendo 10 vezes o seu peso seco e pode ser aplicado como matéria-prima na fabricação de filmes poliméricos, com aplicações biomédicas.

Através de metagenômica foi possível avaliar a diversidade microbiana do consórcio de kefir BIONAT-I, onde os gêneros de bactérias e leveduras mais abundantes foram *Zymomonas*, *Ethanoligenens*, *Clostridium*, *Bifidobacterium*, *Saccharomyces*, *Dekkera*, *Torulaspora* e *Lachancea*.

Dentre os micro-organismos que foram encontrados pela primeira vez no kefir estão a bactéria *Ethanoligenens harbinense* e a levedura *Torulaspora quercuum*. Com isso pôde-se observar que a composição microbiana do consórcio BIONAT-I diverge dos demais.

Por meio da caracterização por método cultivo dependente foram isolados 46 morfotipos de colônias de bactérias e leveduras. Destes 28 foram caracterizados por coloração de Gram e teste de catalase e clivagem de produto de PCR, com enzima *Taq I* sendo separados em 13 grupos. Foi possível assim isolar micro-organismos do consórcio e agrupar os semelhantes, facilitando uma futura prospecção biotecnológica por espécies.

REFERÊNCIAS

- ABDELFATTAH, A. et al. Metagenomic analysis of fungal diversity on strawberry plants and the effect of management practices on the fungal community structure of aerial organs. **PLoS ONE**, v. 11, p. 1-17, 2016.
- ABRAHAM, A. G.; DE ANTONI, G. L. Characterization of kefir grains grown in cows' milk and in soya milk. **Journal of Dairy Research**, v. 66 , p. 327–333, 1999.
- AHMAD, A. et al. Beta Glucan: A Valuable Functional Ingredient in Foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 52, p. 201–212, 2012.
- AHMED, A. Analysis of Metagenomics Next Generation Sequence Data for Fungal ITS Barcoding: Do You Need Advance Bioinformatics Experience? **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016.
- ALM, L. Effect of fermentation on lactose, glucose and galactose content in milk and suitability of fermented milk products for lactose intolerant individuals. **Journal of Dairy Science**, v. 65 , p. 346 - 353, 1982.
- BAI, M. et al. Occurrence and dominance of yeast species in naturally fermented milk from the Tibetan Plateau of China. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 56 , p. 707-14, 2010.
- BAJPAI, V. K. et al. Exopolysaccharide and lactic acid bacteria: Perception, functionality and prospects. **Bangladesh Journal of Pharmacology**, v. 11, p. 1-23, 2016.
- BEN-SHEM, A. et al. Crystal Structure of the Eukaryotic Ribosome. **Science**, v. 330, p. 1203-1209, 2010.
- BOHN, J. A.; BEMILLER, J. N. (1-4)-B-D-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. **Carbohydrate Polymers**, v. 29, p. 3-14, 1995.
- BOTTAZZI, V.; BLANCHL, F. A Note on Scanning Electron Microscopy of Micro-organisms associated with the Kefir Granule. **Journal of Applied Bacteriology** , v. 48, p. 265-268, 1980.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Regulamento técnico de procedimentos para registro de alimentos com alegação de propriedades funcionais ou de saúde em sua rotulagem**. Diário Oficial da União: Resolução nº 19 de 30 de abril de 1999, v. 236-E, 1999.
- CAI, H.; ARCHAMBAULT, M.; PRESCOTT, J. F. 16S ribosomal RNA sequence–based identification of veterinary clinical bacteria. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 15 , p. 465–469, 2003.

- CHEN, H. C.; WANG, S. Y.; CHEN, M. J. Microbiological study of lactic acid bacteria in kefir grains by culture-dependent and culture-independent methods. **Food Microbiology** , v. 25 , p. 492–501, 2008.
- CHEN, T.-H. et al. Microbiological and chemical properties of kefir manufactured by entrapped microorganisms isolated from kefir grains. **Journal of dairy science**, v. 92, p. 3002-3013, 2009.
- CHUN, J. et al. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 2259-2261, 2007.
- CORREIA, S. I. et al. Current concepts: tissue engineering and regenerative medicine applications in the ankle joint. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 11, p. 1-20, 2018.
- CORSINO, J. **Bioquímica**. Campo Grande: UFMS, 2009.
- CUNHA, M. A. A. D. et al. Lasiodiplodan, an exocellular (1 $\rightarrow$ 6)-b-D-glucan from *Lasiodiplodia theobromae* MMPI: production on glucose, fermentation kinetics, rheology and anti-proliferative activity. **Journal of Industrial Microbiology**, DOI 10.1007/s10295-012-1112-2, p. 1-10, 2012.
- CZAMANSKI, R. T. Valuation from antibacterial activity of artisan kefir filtered. **Acta Scientiae Veterinarie** , v. 31, p. 143-144 , 2003.
- DE VUYST, L. et al. Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 687-707, 2001.
- DERTLİ, E.; ÇON, A. H. Microbial diversity of traditional kefir grains and their role on kefir aroma. **LWT - Food Science and Technology**, v. 85, p. 151-157, 2017.
- DOBSON, A. et al. High-throughput sequence-based analysis of the bacterial composition of kefir and an associated kefir grain. **FEMS microbiology letters**, v. 320, 2011. ISSN 56–62.
- DONOT, F. et al. Microbial exopolysaccharides: Main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 951-962, 2012.
- DOUDNA, J. A.; RATH, V. L. Structure and Function of the Eukaryotic Ribosome: The Next Frontier. **Cell**, v. 109, p. 153–156 , 2002.
- DUDHAGARA, P. et al. Metagenomic data of fungal internal transcribed Spacer and 18S rRNA gene sequences from Lonar lake sediment, India. **Data in Brief**, v. 4, p. 266-268, 2015.

DUNBAR, J. et al. Levels of Bacterial Community Diversity in Four Arid Soils Compared by Cultivation and 16S rRNA Gene Cloning. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 1662–1669, 1999.

FAN, J. et al. In vitro evaluations of konjac glucomannan and xanthan gum mixture as the sustained release material of matrix tablet. **Carbohydrate Polymers**, v. 73, p. 241–247, 2008.

FARNWORTH, E. R. Kefir – a complex probiotic. **Food Science and Technology**, v. 2, p. 1–17, 2005.

FIORDA, F. A. et al. Development of kefir-based probiotic beverages with DNA protection and antioxidant activities using soybean hydrolyzed extract, colostrum and honey. **Food Science and Technology**, v. 68, p. 690-697, 2016.

FRENGOVA, G. I. . S. E. D.; BESHKOVA, D. M.; SIMOV, Z. I. Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria of Kefir Grains. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 57, p. 805-810, 2002.

GAO, J. et al. Metagenome analysis of bacterial diversity in Tibetan kefir grains. **European Food Research and Technology**, v. 236, p. 549–556, 2013.

GAO, W. et al. Microbial diversity and stability during primary cultivation and subcultivation processes of Tibetan kefir. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 50, p. 1468-1476, 2015.

GARCÍA-OCHOA, F. et al. Xanthan gum: Production, recovery, and properties. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 549-579, 2000.

GAROFALO, C. et al. Bacteria and yeast microbiota in milk kefir grains from different Italian regions. **Food Microbiology**, v. 49, p. 123-133, 2015.

GARRIDO-CARDENAS, J. A.; MANZANO-AGUGLIARO, F. The metagenomics worldwide research. **Current Genetics**, p. 1-11, 2017.

GARRIDO-CARDENAS, J. A.; MANZANO-AGUGLIARO, F. The metagenomics worldwide research. **Current Genetics**, p. 1-11, 2017.

GARROTE, G. L.; ABRAHAM, A. G.; DE ANTONI, G. L. Inhibitory Power of Kefir: The Role of Organic Acids. **Journal of Food Protection**, v. 63, p. 364-369, 2000.

GARROTE, G. L.; ABRAHAM, A. G.; DE ANTONI, G. L. Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. **Journal of Dairy Research**, v. 68, p. 639-652, 2001.

GHASEMLOU, M. et al. Development and characterisation of a new biodegradable edible film made from kefir, an exopolysaccharide obtained from kefir grains. **Food Chemistry**, v. 127, p. 1496–1502, 2011.

GHOSH, T. S. et al. C16S - A Hidden Markov Model based algorithm for taxonomic classification of 16S rRNA gene sequences. **Genomics**, v. 99, p. 195-201, 2012.

GIAVASIS, I. H. L. M.; MCNEIL, B. Gellan gum. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 20, p. 177-211, 2000.

GOODWIN, S.; MCPHERSON, J. D.; MCCOMBIE, W. R. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. **Nature Reviews Genetics**, v. 17, p. 333-351, 2016.

GUARRO, J.; GENÉ, J.; STCHIGEL, A. M. Developments in fungal taxonomy. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, p. 454-500, 1999.

GULITZ, A. et al. Comparative phylobiomic analysis of the bacterial community of water kefir by 16S rRNA gene amplicon sequencing and ARDRA analysis. **Journal of Applied Microbiology**, v. 114, p. 1082--1091, 2013.

GUZEL-SEYDIM, Z. et al. Turkish kefir and kefir grains: Microbial enumeration and electron microscobic observation. **International Journal of Dairy Technology**, v. 58, p. 25-29, 2005.

HAMET, M. F. et al. Application of culture-dependent and culture-independent methods for the identification of *Lactobacillus kefirifaciens* in microbial consortia present in kefir grains. **Food Microbiology**, v. 36, p. 327-334, 2013.

HAMMES, W. P.; HERTEL, C. Selection and improvement of lactic acid bacteria used in meat and sausage fermentation. **Le Lait, INRA Editions**, v. 76, p. 159-168, 1996.

HANDELSMAN, J. Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 68, p. 669-685, 2004.

HENRAS, A. K. et al. The post-transcriptional steps of eukaryotic ribosome biogenesis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, p. 2334 – 2359, 2008.

HORISBERGER, M. Structure of the dextran of the tibi grain. **Carbohydrate Research**, v. 10, p. 379-385, 1969.

HSIEH, H. H. et al. Effects of cow's and goat's milk as fermentation media on the microbial ecology of sugary kefir grains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 157, p. 73-81, 2012.

HUGENHOLTZ, P.; GOEBEL, B. M.; PACE, N. R. Impact of Culture-Independent Studies on the Emerging Phylogenetic View of Bacterial Diversity. **Journal of Bacteriology**, v. 180, p. 4765–4774, 1998.

JANSSON, P.; KENNE, L.; LINDBERG, B. STRUCTURE OF THE EXTRACELLULAR POLYSACCHARIDE FROM *Xanthomonas campestris*. **Carbohydrate Research**, v. 45, n. 275-282, 1975.

JIANZHONG, Z. et al. Analysis of the microflora in Tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis. **Food Microbiology**, v. 26, p. 770–775, 2009.

KALYANASUNDARAM, G. T.; DOBLE, M.; GUMMADI, S. N. Production and downstream processing of (1-3)- β -D-glucan from mutant strain of *Agrobacterium* sp. ATCC 31750. **AMB Express**, v. 2, p. 1-10, 2012.

KAMPS, R. et al. Next-Generation Sequencing in Oncology: Genetic Diagnosis, Risk Prediction and Cancer Classification. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, p. 308, 2017.

KAUFMANN, K. **Kefir Rediscovered!**: The Nutritional Benefits of an Ancient Healing Food. Burnaby: Alive Books, 1997. 3-17 p.

KHALIKOVA, E.; SUSI, P.; KORPELA, T. Microbial Dextran-Hydrolyzing Enzymes: Fundamentals and Applications. **Microbiology and molecular biology review**, v. 69, p. 206-325, 2005.

KLAENHAMMER, T. R. Bacteriocins of lactic acid bacteria. **Biochimie**, v. 70, p. 337-349, 1988.

KLEIN, G. et al. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 41, p. 103–125, 1998.

KLEMM, D. et al. Bacterial synthesized cellulose — artificial blood vessels for microsurgery. **Progress in Polymer Science**, v. 26, p. 1561-1603, 2001.

KUNIN, V. et al. A Bioinformatician's Guide to Metagenomics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 71, p. 557-578, 2008.

KWON, O.-K. K. et al. Inhibitory effect of kefiran on ovalbumin-induced lung inflammation in a murine model of asthma. **Archives of pharmacal research**, v. 31, p. 1590-1596, 2008.

LA RIVIÈRE, J. W. M.; KOOIMAN, F. Kefiran, a Novel Polysaccharide Produced in the Kefir Grain by *Lactobacillus brevis*. **Archiv für Mikrobiologie**, v. 59, p. 269-278, 1967.

LATORRE-GARCÍA, L.; DEL CASTILLO-AGUDO, L.; POLAINA, J. Taxonomical classification of yeasts isolated from kefir based on the sequence of their ribosomal RNA genes. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 785-791, 2007.

LAUREYS, D.; DE VUYST, L. Microbial species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of water Kefir fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, p. 2564-2572, 2014.

LEE, S.-W. Metagenome, the untapped microbial genome, toward discovery of novel microbial resources and application into the plant pathology. **Plant Pathology Journal**, v. 21, p. 93-98, 2005.

LEITE, A. M. O. et al. Assessment of the microbial diversity of Brazilian kefir grains by PCR-DGGE and pyrosequencing analysis. **Food Microbiology**, v. 31, p. 215-221, 2012.

LIU, J. R.; CHEN, M. J.; LIN, C. W. Antimutagenic and Antioxidant Properties of Milk-Kefir and Soymilk-Kefir. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 2467-2474, 2005.

LIU, Y.; CHAN-PARK, M. B. Hydrogel based on interpenetrating polymer networks of dextran and gelatin for vascular tissue engineering. **Biomaterials**, v. 30, p. 196–207, 2009.

LOPES, B. D. M. et al. Xanthan gum : properties, production conditions, quality and economic perspective. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 54, p. 185-194, 2015.

LOPITZ-OTSOA, F. et al. Kefir: a symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. **Revista Iberoamericana de Micología**, 23, 2003.

LORENZ, P.; SCHLEPER, C. Metagenome - a challenging source of enzyme discovery. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 19-20, p. 13-19, 2002.

MADIGAN, M. et al. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

MAEDA, H. et al. Effects of an exopolysaccharide (kefiran) on lipids, blood pressure, blood glucose, and constipation. **BioFactors**, v. 22, p. 197–200, 2004.

MAEDA, H. et al. Structural Characterization and Biological Activities of an Exopolysaccharide Kefiran Produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* WT-2BT. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 5533-5538, 2004.

MAGALHÃES, K. T. et al. Microbial communities and chemical changes during fermentation of sugary Brazilian kefir. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 1241-1250, 2010.

MAGALHÃES, K. T. et al. Brazilian kefir: Structure, microbial communities and chemical composition. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 693-702, 2011.

MAKAROVA, K. et al. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. **PNAS**, v. 103, p. 15611–15616, 2006.

MARDIS, E. R. Next-Generation DNA Sequencing Methods. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 9, p. 387-402, 2008.

MARSH, A. J. et al. Sequence-based analysis of the microbial composition of water kefir from multiple sources. **FEMS Microbiology Letters**, v. 348, p. 79-85, 2013.

MARSH, A. J. et al. Sequencing-based analysis of the bacterial and fungal composition of kefir grains and milks from multiple sources. **PloS one**, v. 8, p. e69371, 2013.

MARSHAL, V. M. Starter cultures for milk fermentation and their characteristics. **Journal of Dairy Technology**, 46, 1993. 49-56.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica básica**. 3 ed. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

MATSUSHITA, K.; TOYAMA, H.; ADACHI, O. Respiratory Chains and Bioenergetics of Acetic Acid Bacteria. **Advances in Microbial Physiology**, v. 36, p. 247-301, 1994.

MIGUEL, M. G. C. P. et al. Identification and assessment of kefir yeast potential for sugar/ethanol-resistance. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44 , p. 113-118 , 2013.

MIGUEL, M. G. D. C. P. et al. Profile of microbial communities present in tibico (sugary kefir) grains from different Brazilian States. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27 , p. 1875–1884, 2011.

MIWA, M.; NAKAO, Y.; NARA, K. Food Applications of Curdlan. In: K., N.; E., D. **Food Hydrocolloids: structures, properties, and functions**. Boston: Springer, 1994.

MIYOSHI, E.; TAKAYA, T.; NISHINARI, K. Effects of glucose, mannose and konjac glucomannan on the gel-sol transition in gellan gum aqueous solutions by rheology and DSC. **Polymer Gels and Networks**, v. 6, p. 273-290, 1998.

MUROFUSHI, M.; SHIOMI, M.; AIBARA, K. Effect of orally administered polysaccharide from kefir grain on delayed-type hypersensitivity and tumor growth in mice. **Japanese Journal of Medical Science and Biology**, v. 36, p. 49-53, 1983.

NALBANTOGLU, U. et al. Metagenomic analysis of the microbial community in kefir grains. **Food Microbiology**, v. 41 , p. 42-51, 2014.

NASCIMENTO, A. L. APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DO PRO-BIÓTICO KEFIR (CONSÓRCIO BIONAT-I) E SEUS DERIVADOS. **Dissertação de estrado em Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco**, Recife, 2017.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 7^a. ed. [S.l.]: W. H. Freeman, 2017.

NEVE, H.; HELLER, K. J. The microflora of water kefir: A glance by scanning electron. **Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte**, v. 54, p. 337-349, 2002.

NOVAK, M. E. V. V. Glucans as Biological Response Modifiers. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets**, v. 9, p. 67-75, 2009.

NWODO, U. U.; GREEN, E.; OKOH, A. I. Bacterial Exopolysaccharides: Functionality and Prospects, v. 13, p. 14002-14015, 2012.

OLSEN, G. J. et al. MICROBIAL ECOLOGY AND EVOLUTION: A RIBOSOMAL RNA APPROACH. **Annual Review of Microbiology**, v. 40, p. 337--365 , 1986.

OTLES, S.; CAGINDI, O. Kefir a probiotic Dairy-composition, nutritional and therapeutic aspects. **Pakistan Journal of Nutrition**, 2, 2003. 54-59.

PACE, N. R. Structure and synthesis of the ribosomal ribonucleic acid of prokaryotes. **Bacteriol Reviews**, v. 37 , p. 562–603, 1973.

PACE, O. R. A Molecular View of Microbial Diversity and the Biosphere. **Science**, v. 276, p. 734-740, 1997.

PETROSINO, J. F. et al. Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. **Clinical Chemistry**, v. 55, p. 856-866, 2009.

PIERMARIA, J. A.; LA CANALA, M. L.; ABRAHAM, A. G. Gelling properties of kefir, a food-grade polysaccharide obtained from kefir grain. **Food Hydrocolloids**, v. 22 , p. 1520–1527, 2008.

POGAČLČ, T. et al. Microbiota of kefir grains. **Mljekarstvo**, v. 63, p. 3-14, 2013.

POLLOCK, T. J. Gellan-related polysaccharides and the genus *Sphingomonas*. **Journal of General Microbiology**, v. 139, p. 1939-1945, 1993.

PORTO, I. C. C. D. M. Polymer Biocompatibility. In: GOMES, A. D. S. **Polymerization**. [S.l.]: InTech, 2012. p. 436.

PRADO, M. R. et al. Milk kefir: Composition, microbial cultures, biological activities, and related products. **Frontiers in Microbiology**, 6, 2015. 1-6.

RAHAR, S. et al. Preparation, characterization, and biological properties of β -glucans. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, v. 2, p. 94 -103, 2011.

REHM, B. H. A. Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 578-592, 2010.

RIZOLI, S. B. et al. The Immunomodulatory Effects of Hypertonic Saline Resuscitation in Patients Sustaining Traumatic Hemorrhagic Shock. **Annals of Surgery**, v. 243, p. 47-57, 2006.

RODRIGUES, K. L. et al. Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract. **International Journal of Antimicrobial Agents** , v. 25 , p. 404–408, 2005.

RODRIGUES, K. L.; CARVALHO, J. C. T.; SCHNEEDORF, J. M. Anti-inflammatory properties of kefir and its polysaccharide extract. **Inflammopharmacology**, v. 13 , p. 485–492 , 2005.

RUIZ, A. et al. Identification of acetic acid bacteria by RFLP of PCR-amplified 16S rDNA and 16S–23S rDNA intergenic spacer. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, p. 1981–1987, 2000.

RUSSO, P. et al. Beta-glucans improve growth, viability and colonization of probiotic microorganisms. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, p. 6026-6039, 2012.

SALAZAR, N. et al. Production of exopolysaccharides by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains of human origin, and metabolic activity of the producing bacteria in milk. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 4158-4168, 2009.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, p. 5463-5467, 1977.

SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Biotechnological prospects from metagenomics. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, p. 303-310, 2003.

SCHMID, J.; SIEBER, V.; REHM, B. Bacterial exopolysaccharides: Biosynthesis pathways and engineering strategies. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 2015.

SCHOLZ, M. B.; LO, C.- C.; CHAIN, P. S. G. Next generation sequencing and bioinformatic bottlenecks: The current state of metagenomic data analysis. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, p. 9-15, 2012.

SHAVIT, E. Renewed Interest in Kefir, the Ancient Elixir of Longevity. **Fungi Magazine**, v. 1, p. 14-18, 2008.

SHENDURE, J.; JI, H. Next generation DNA sequencing. **Nature biotechnology**, v. 26, p. 1135-1145, 2008.

SOUZA, D. M. D.; GARCIA-CRUZ, C. H. Produção fermentativa de polissacarídeos extracelulares por bactérias. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 24, n. 4, p. 331-340, 2004.

STACKEBRANDT, E.; GOEBEL, B. M. Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 44, p. 846-849, 1994.

STREIT, W. R.; SCHMITZ, R. A. Metagenomics - the key to the uncultured microbes. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, p. 492-498, 2004.

TAYLOR, D. J. et al. Comprehensive Molecular Structure of the Eukaryotic Ribosome. **Structure**, v. 17, p. 1591-1604, 2009.

TSIAMIS, G. et al. Microbial Diversity for Biotechnology. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-3, 2014.

TÚRMINA, J. A. et al. Toxicological Assessment of β -(1 $\rightarrow$ 6)-Glucan (Lasiodiplodan) in Mice during a 28-Day Feeding Study by Gavage. **Molecules**, v. 17, p. 14298-14309, 2012.

VANDAMME, P. et al. Polyphasic Taxonomy, a Consensus Approach to Bacterial Systematics. **Microbiological Reviews**, v. 60, p. 407–438, 1996.

VARDJAN, T. et al. Characterization and stability of lactobacilli and yeast microbiota in kefir grains. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 2729-2736, 2013.

VASCONCELOS, A. F. D. et al. Three exopolysaccharides of the β -(1 $\rightarrow$ 6)-D-glucan type and a β -(1 $\rightarrow$ 3;1 $\rightarrow$ 6)-D-glucan produced by strains of *Botryosphaeria rhodina* isolated from rotting tropical fruit. **Carbohydrate Research**, v. 343, p. 2481–2485, 2008.

VASCONCELOS, A. F. D. et al. Sulfonation and Anticoagulant Activity of Fungal Extracellular β -(1 $\rightarrow$ 6)-D-Glucan (Lasiodiplodan).. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 1908-1914, 2013.

VINDEROLA, G. et al. Effects of the oral administration of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefirianofaciens* on the gut mucosal immunity. **Cytokine**, v. 36, p. 254–260, 2006.

VU, B. et al. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. **Molecules**, v. 14, p. 2535-2554, 2009.

WALDHERR, F. W. et al. Identification and characterization of a glucan-producing enzyme from *Lactobacillus hilgardii* TMW 1.828 involved in granule formation of water kefir. **Food Microbiology**, v. 27, p. 672-678, 2010.

WALSH, A. M. et al. Microbial Succession and Flavor Production in the Fermented Dairy Beverage Kefir. **mSystems**, v. 1, p. 1-16, 2016.

WANG, S. Y. et al. Investigation of microorganisms involved in biosynthesis of the kefir grain. **Food Microbiology**, v. 32, p. 274-285, 2012.

WANG, S.-Y. et al. Identification of Yeasts and Evaluation of their Distribution in Taiwanese Kefir and Viili Starters. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 3798-3805, 2008.

WOESE, C. R. Bacterial Evolution. **Microbiological Reviews**, v. 51, p. 221-271, 1987.

WOOLEY, J. C.; GODZIK, A.; FRIEDBERG, I. A primer on metagenomics. **PLoS Computational Biology**, v. 6, p. 1-13, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION / FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Codex standard for fermented milks #243, 2003. Disponível em:

<www.fao.org/input/download/standards/400/CXS_243e.pdf>. Acesso em: 05 set. 2017.

ZAMBERI, N. R. et al. 16S Metagenomic Microbial Composition Analysis of Kefir Grain using MEGAN and BaseSpace. **Food Biotechnology**, v. 30, p. 219-230, 2016.

ZANIRATI, D. F. et al. Selection of lactic acid bacteria from Brazilian kefir grains for potential use as starter or probiotic cultures. **Anaerobe**, v. 32, p. 70-76, 2015.

ZHOU, J. et al. Analysis of the microflora in Tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis. **Food Microbiology**, v. 26 , p. 770–775, 2009.

ZOURARI, A.; ANIFANTAKIS, E. M. Le kéfir. Caractères physico-chimiques, microbiologiques et nutritionnels. Technologie de production. Une revue. **Le Lait INRA Editions**, 68, n. 4, 1988. 373-392.

APÊNDICE A – PATENTE DE INVENÇÃO: PROCESSO DE OBTENÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEO TIPO BETA-GLUCANA, EXTRAÍDO DE CONSÓRCIO MICROBIANO DO KEFIR, COM CARACTERÍSTICAS DE HIDROGEL SUPERABSORVENTE, AÇÃO CITOTÓXICA PARA LINHAGENS NEOPLÁSICAS, AÇÃO IMUNOMODULADORA E MATÉRIA-PRIMA PARA FILME POLIMÉRICO BIOATIVO.

1/1

RESUMO

Processo de obtenção de exopolissacarídeo tipo beta-glucana, extraído de consórcio microbiano do kefir, com características de hidrogel superabsorvente, ação citotóxica para linhagens neoplásicas, ação imunomoduladora e matéria-prima para filme polimérico bioativo descreve o processo de extração de um exopolissacarídeo dos grãos de kefir de água utilizando para tanto uma extração em meio alcalino. O polímero isolado é biodegradável, e consiste em um homopolissacarídeo hidrofílico não iônico e pouco solúvel em água, composto por monômeros de glicose, com ligações predominantes β -1-6 (Figura 6), caracterizado como uma beta-glucana (β -glucana). Este polímero comporta-se como um hidrogel superabsorvente e possui atividade citotóxica contra linhagens neoplásicas de leucemia mielocítica crônica e adenocarcinoma de mama humano, além de promover o processo de cicatrização pela estimulação da produção de citocinas a partir de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs). O polímero isolado ainda pode ser utilizado como matéria-prima para produção de filmes bioativos para aplicações biomédicas.

Fig. 1

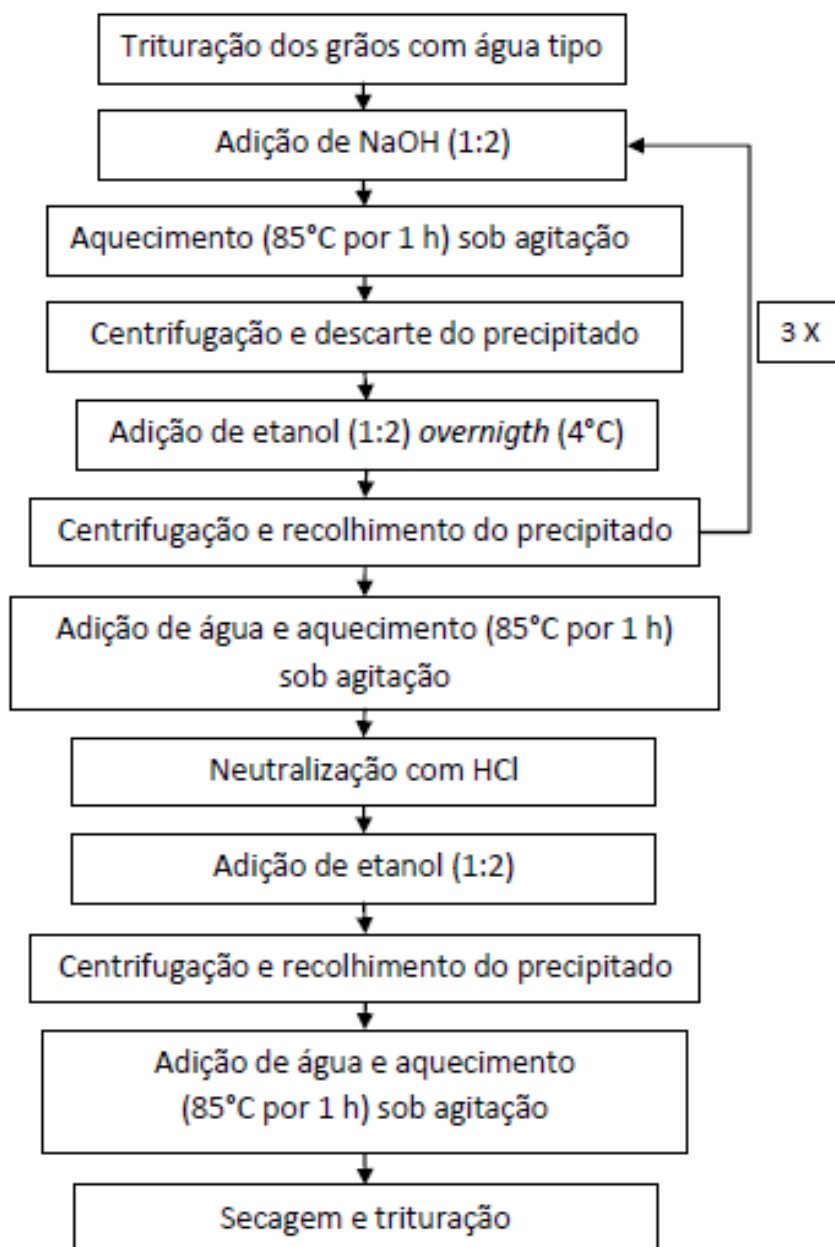


Fig. 2

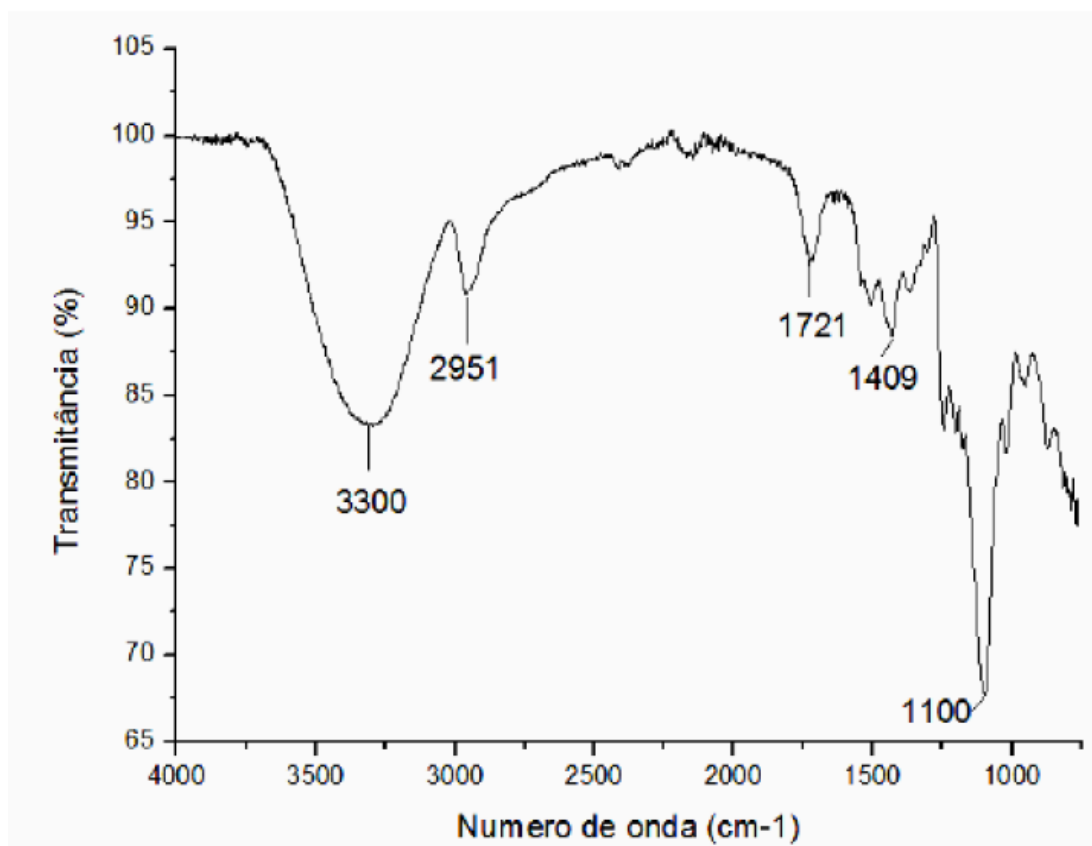
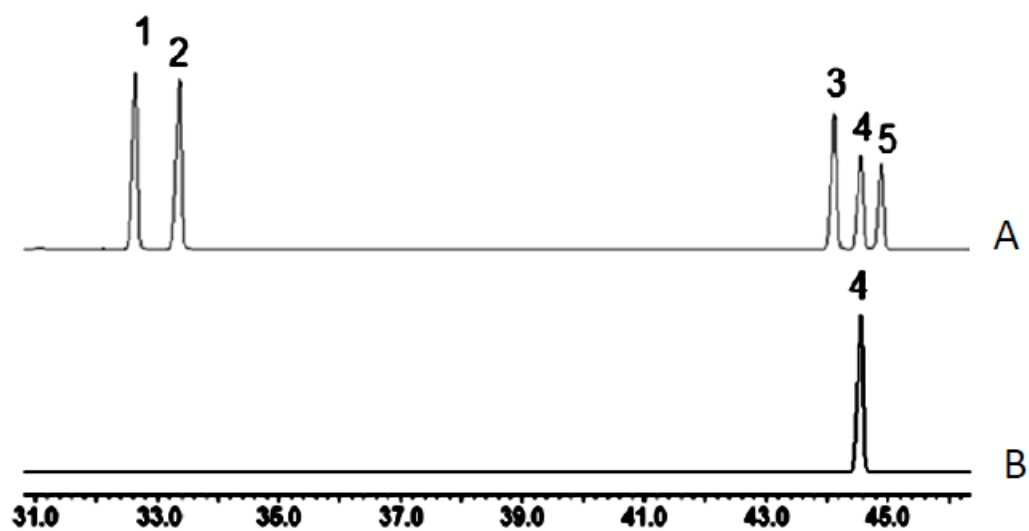


Fig. 3



3/5

Fig. 4

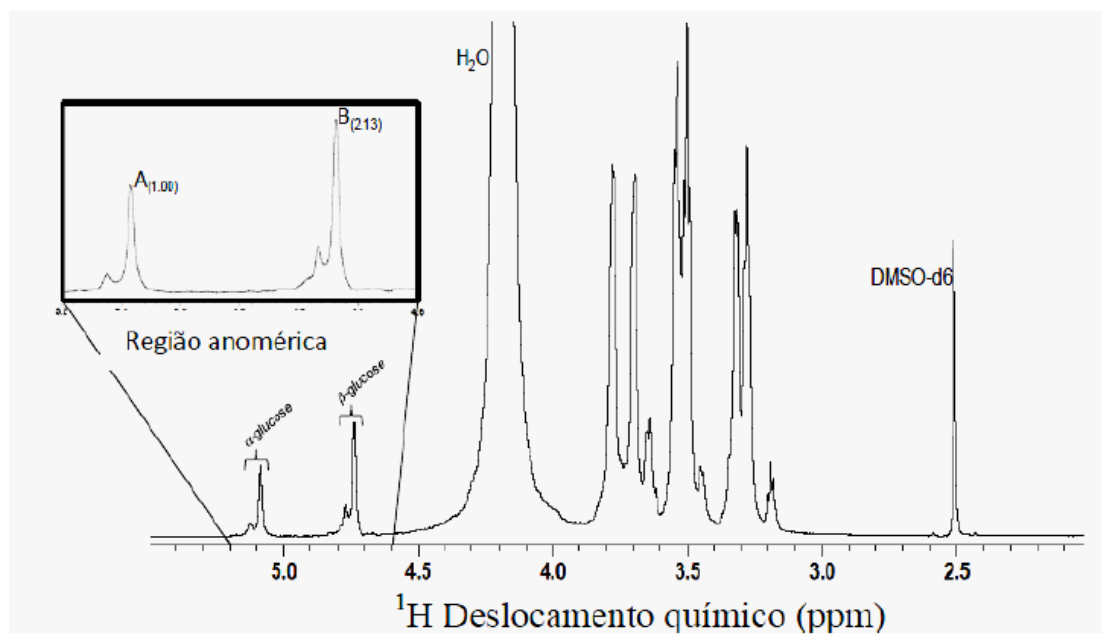
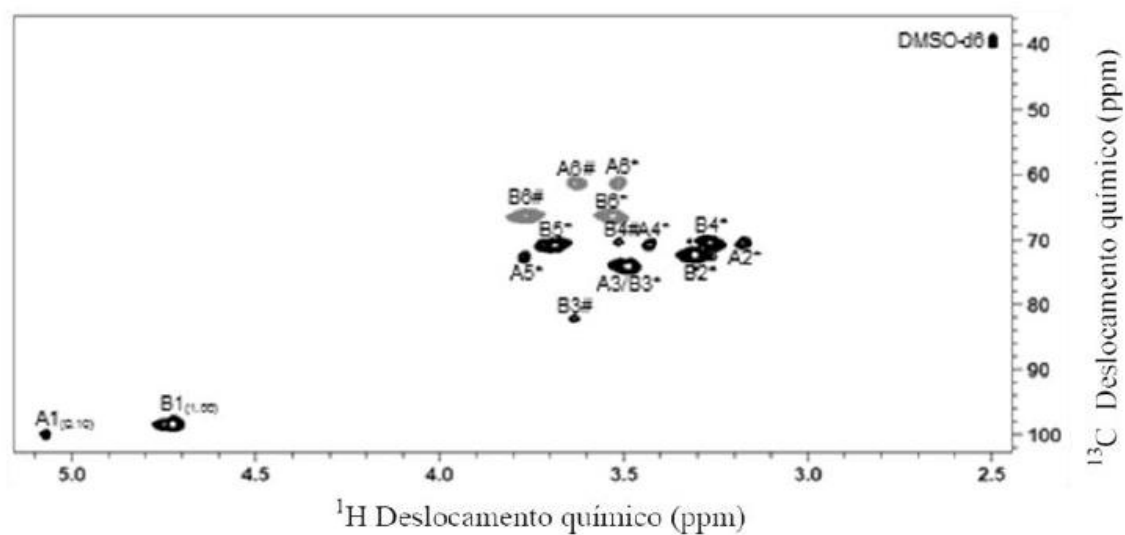


Fig. 5



4/5

Fig. 6

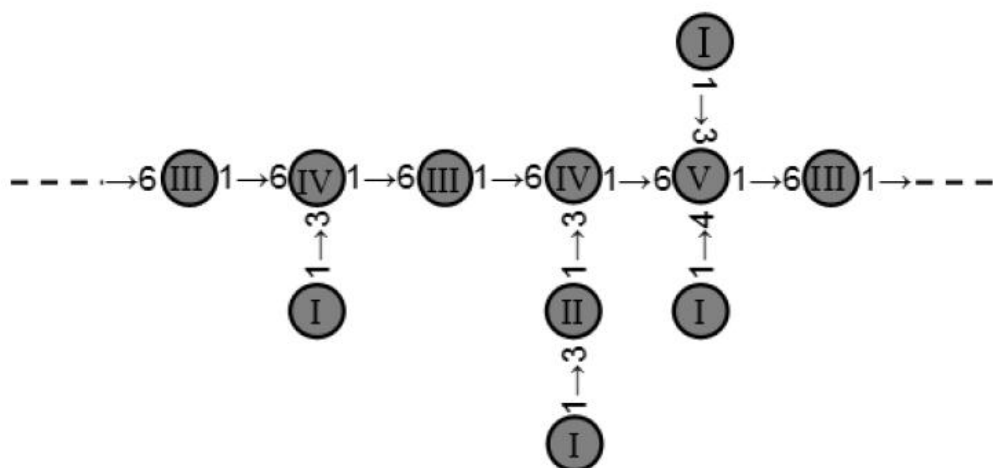
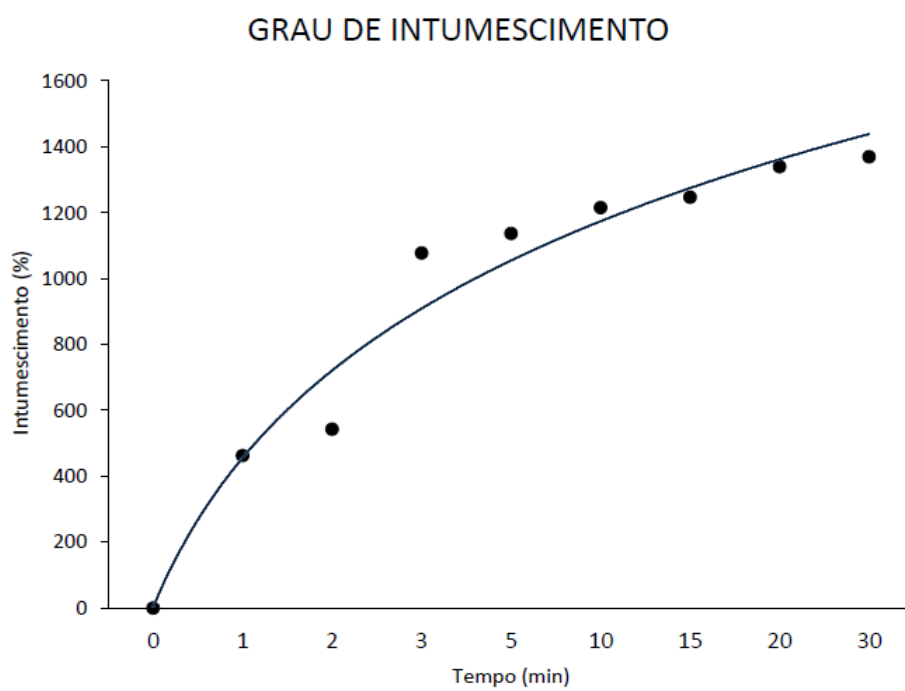


Fig. 7



5/5

Fig. 8

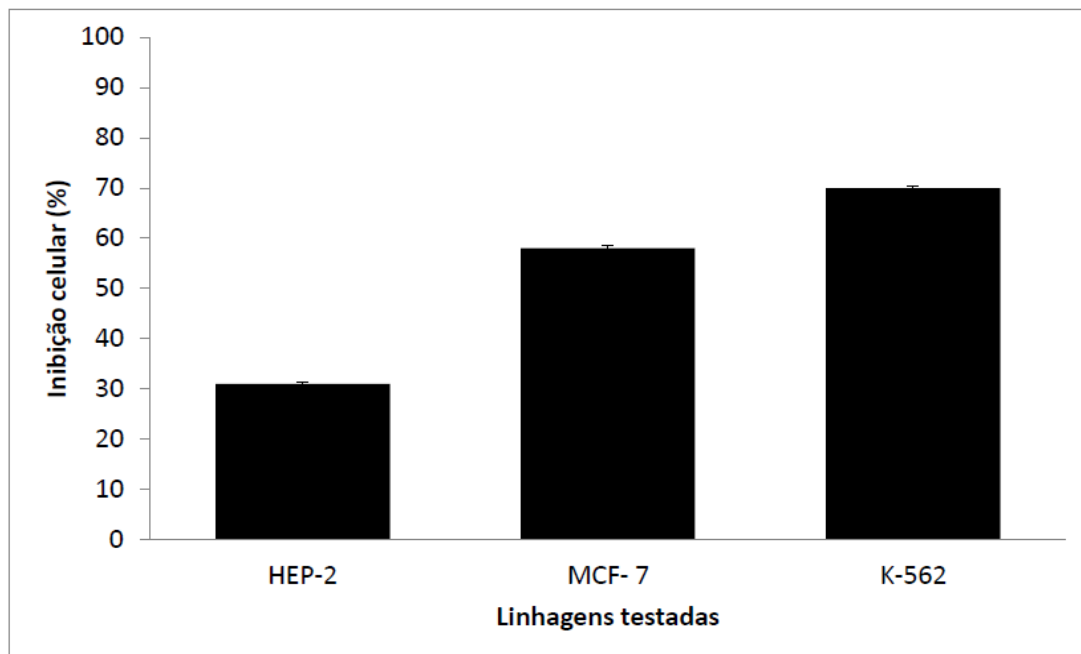
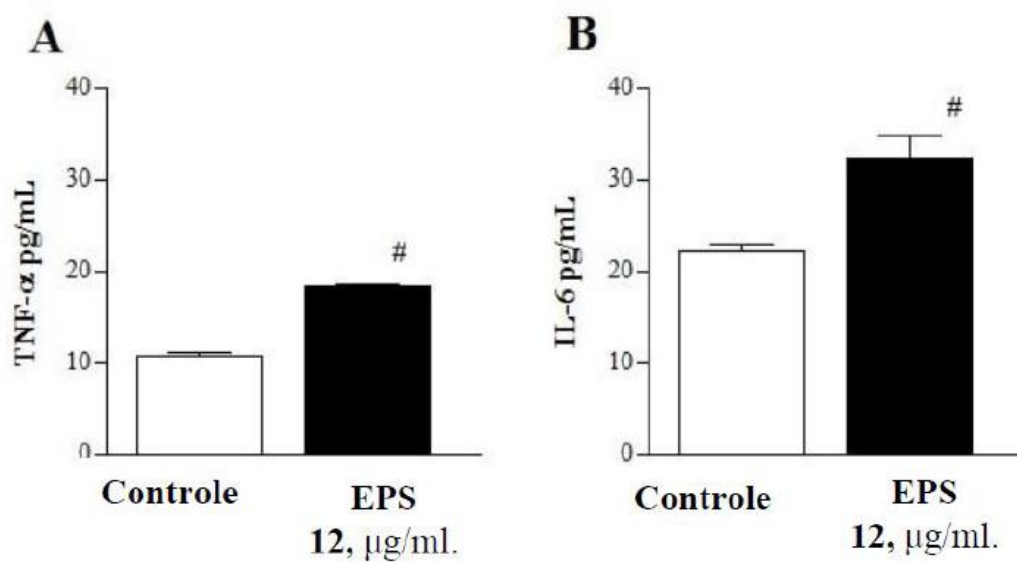


Fig. 9



REIVINDICAÇÕES

1. **Processo de obtenção de exopolissacarídeo tipo β -glucana, extraído de consórcio microbiano do kefir, com características de hidrogel superabsorvente, ação citotóxica para linhagens neoplásicas, ação imunomoduladora e matéria-prima para filme polimérico bioativo** é caracterizado por descrever o processo de extração de exopolissacarídeo tipo β -glucana a partir de grãos de kefir cultivados em solução de açúcar mascavo.
2. **Processo de obtenção de exopolissacarídeo tipo β -glucana, extraído de consórcio microbiano do kefir** de acordo com as reivindicação 1 é caracterizado por compreender a obtenção de β -glucana de grãos de kefir e de consórcios derivados deste, cultivados em solução de açúcar mascavo como substrato e de substratos assemelhados (melaço, solução açúcar demerara acrescida de nutrientes, solução de açúcar acrescida de nutrientes).
3. **Processo de obtenção de exopolissacarídeo tipo β -glucana, extraído de consórcio microbiano do kefir** de acordo com as reivindicações 1 é caracterizado por compreender as etapas de (Figura 1):
 - (a) Os grãos serem clareados em água através de sucessivas lavagens (3 a 15 vezes) com água destilada.
 - (b) Os grãos serem triturados com água preferencialmente tipo I, até adquirir consistência gelatinosa.
 - (c) Ser adicionado NaOH 1M na proporção 1:2 (volume grãos de kefir triturados:volume NaOH).
 - (d) O aquecimento da mistura ser a 85 °C, sob agitação, por 1 hora.
 - (e) A centrifugação, para recolhimento do sobrenadante, ser realizada a 6.100 x g por 5 minutos.
 - (f) A precipitação dos sobrenadantes ser realizada pela adição de 2 volumes de etanol frio, mantidos em 4 °C overnight.
 - (g) A centrifugação, para recolhimento do precipitado, ser realizada a 6.100 x g por 5 minutos.
 - (h) As etapas de adição de NaOH, aquecimento e precipitação com etanol frio e centrifugação para recolhimento do precipitado ser repetida 3 vezes.
 - (i) O material ser lavado com água preferencialmente tipo I, sendo mantido a temperatura de 85 °C, sob agitação, por 1 hora.
 - (j) A neutralização ser realizada com HCl 1M.
 - (k) A precipitação ser novamente realizada pela adição de 2 volumes de etanol frio.
 - (l) A centrifugação, para recolhimento do precipitado, ser novamente realizada a 6.100 x g por 5 minutos.
 - (m) O material ser acrescido de água preferencialmente tipo I, sendo mantido a temperatura de 85 °C, sob agitação, por 1 hora.

- (n) A centrifugação, pra recolhimento do precipitado, ser novamente realizada a 6.100 x g por 5 minnutos.
- (o) A secagem do material ser realizada a temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$), com uso de um desumidificador ou estufa, com posterior trituração para obtenção do polissacarídeo em pó.
4. **Processo de obtenção de exopolissacarídeo tipo β -glucana, extraído de consórcio microbiano do kefir** de acordo com as reivindicações 1 e 3 é caracterizado pelo fato de consistir e distinguir-se pelas seguintes características:
- (a) Presença de sacarídeos verificada pelos ensaios de Molisch (qualitativo) e fenol-ácido sulfúrico (Dubois) cerca de 85% em equivalente de glicose.
 - (b) Teores não detectáveis de proteínas pelo teste de Bradford.
 - (c) Perfil espectroscópico compatível com polissacarídeos quando analisado por espectroscopia na região do Infravermelho por transformada de Fourier com módulo ATR (FT-IR/ATR) (Figura 2).
 - (d) A avaliação de composição monossacarídica, através do ensaio de acetato de alditiol realizada por cromatografia gás-líquido/espectrometria de massas (GCMS) indica que o monômero do exopolissacarídeo é glicose (Figura 3).
 - (e) O ensaio de metilação de polissacarídeos realizada por GCMS (Tabela 1) e a espectroscopia por ressonância magnética nuclear unidimensional (1D) (Figura 4) e bidimensional (2D) (Figura 5), definem a estrutura como sendo uma β -glucana, com ligações predominantes β -1-6 (Figura 6).
5. **Processo de obtenção de exopolissacarídeo tipo β -glucana, extraído de consórcio microbiano do kefir** de acordo com as reivindicações 1, 3 e 4 é caracterizado por consistir em um exopolissacarídeo de β -glucana com ligações predominantes β -1-6, não iônico, pouco solúvel em água e solúvel em álcali (Figura 6).
6. **O exopolissacarídeo tipo β -glucana, extraído de consórcio microbiano do kefir** de acordo com as reivindicações 1, 3, 4 e 5 é caracterizado por compreender em se comportar como hidrogel superabsorvente, adsorvendo 10 vezes o seu peso seco em água em 3 min e chegando até 1.370% em 20 min.
7. **O exopolissacarídeo tipo β -glucana, extraído de consórcio microbiano do kefir** de acordo com as reivindicações 1, 3, 4 e 5 é caracterizado por compreender possuir ação citotóxica contra linhagens neoplásicas de K562 (leucemia mielocítica crônica) e MCF-7 (adenocarcinoma de mama).
8. **O exopolissacarídeo tipo β -glucana, extraído de consórcio microbiano do kefir** de acordo com as reivindicações 1, 3, 4 e 5 é caracterizado por compreender possuir ação imunomodulatória atuando sobre células mononucleares do sangue periférico (PBMCS) para produção de citocinas que atuam no processo de cicatrização e estimulador do sistema imune (TNF- α e IL-6).
9. **O exopolissacarídeo tipo β -glucana, extraído de consórcio microbiano do kefir** de acordo com as reivindicações 1, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 é caracterizado por compreender como matéria-prima para filme polimérico bioativo.

ANEXO A – COMPROVANTE DO DEPÓSITO DA PATENTE**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT.**

Número do Processo: BR 10 2017 025627 8

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: INSTITUTO TECNOLÓGICO DAS CADEIAS BIOCIENTÍFICAS

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 25682795000196

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Associação com intuito não econômico

Endereço: Rua Viscondessa do Livramento 113 Caixa Postal 78

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 52010060

País: Brasil

Telefone: 81 21268536

Fax:

Email: projetocad.bio@hotmail.com

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 29/11/2017
às 12:08, Petição 870170092510

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de PROCESSO DE OBTENÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEO TIPO

Utilidade (54): BETA-GLUCANA, EXTRAÍDO DE CONSÓRCIO MICROBIANO DO KEFIR, COM CARACTERÍSTICAS DE HIDROGEL SUPERABSORVENTE, AÇÃO CITOTÓXICA PARA LINHAGENS NEOPLÁSICAS, AÇÃO IMUNOMODULADORA E MATÉRIA-PRIMA PARA FILME POLIMÉRICO BIOATIVO

Resumo: Processo de obtenção de exopolissacarídeo tipo beta-glucana, extraído de consórcio microbiano do kefir, com características de hidrogel superabsorvente, ação citotóxica para linhagens neoplásicas, ação imunomoduladora e matéria-prima para filme polimérico bioativo descreve o processo de extração de um exopolissacarídeo dos grãos de kefir de água utilizando para tanto uma extração em meio alcalino. O polímero isolado é biodegradável, e consiste em um homopolissacarídeo hidrofílico não iônico e pouco solúvel em água, composto por monômeros de glicose, com ligações predominantes β -1-6 (Figura 6), caracterizado como uma beta-glucana (β -glucana). Este polímero comporta-se como um hidrogel superabsorvente e possui atividade citotóxicas contra linhagens neoplásica de leucemia mielocítica crônica e adenocarcinoma de mama humano, além de promover o processo de cicatrização pela estimulação da produção de citocinas a partir de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs). O polímero isolado ainda pode ser utilizado como matéria-prima para produção de filmes bioativos para aplicações biomédicas.

Figura a publicar: Fig 6

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 14

Nome: NATÁLIA ALMEIDA ONOFRE CORDEIRO

CPF: 08118773450

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Doutorando

Endereço: Rua Marechal Manoel Luiz Osório, 447, Edf. Praça das Begônias,
Ap. 106, Várzea

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 50740-450

País: BRASIL

Telefone: (81) 967 36124

Fax:

Email: natiaonofre@gmail.com

Inventor 2 de 14

Nome: RAFAEL JORGE SANTOS ARACATI PADILHA

CPF: 07350298498

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Biólogo, biomédico e afins

Endereço: Rua Major Médico Vicente Fonseca de Matos, 670, Edf. Jequitibá 1,
Ap. 203, Candeias

Cidade: Jaboatão dos Guararapes

Estado: PE

CEP: 54440-370

País: BRASIL

Telefone: (81) 987 131404

Fax:

Email: rafaeljsap2@gmail.com

Inventor 3 de 14

Nome: REGINA SILVA PICASSO

CPF: 04706032407

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Biólogo, biomédico e afins

Endereço: Rua Major Médico Vicente Fonseca de Matos, 670, Edf. Jequitibá 1,
Ap. 203, Candeias

Cidade: Jaboatão dos Guararapes

Estado: PE

CEP: 54440-370

País: BRASIL

Telefone: (81) 987 798357

Fax:

Email: pisire@gmail.com

Inventor 4 de 14

Nome: CLÁUDIA SAMPAIO DE ANDRADE LIMA

CPF: 33579962434

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Físico, químico, meteorologista, geólogo, oceanógrafo e afins

Endereço: Av. General Polidoro, 512, Ap. 303. Várzea

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 50740-050

País: BRASIL

Telefone: (81) 999 663518

Fax:

Email: claudia.salima@gmail.com

Inventor 5 de 14

Nome: RICARDO YARA

CPF: 11000628825

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Engenheiro, arquiteto e afins

Endereço: Av. General Polidoro, 512, Ap. 303. Várzea

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 50740-050

País: BRASIL

Telefone: (81) 994 094042

Fax:

Email: ricardo.yara@gmail.com

Inventor 6 de 14

Nome: EDERSON AKIO KIDO

CPF: 06240223824

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Engenheiro, arquiteto e afins

Endereço: Rua Setúbal, 336, Ap. 1102, Boa Viagem

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 51030-010

País: BRASIL

Telefone: (81) 998 742672

Fax:

Email: kido.ufpe@gmail.com

Inventor 7 de 14

Nome: SILENE CARNEIRO DO NASCIMENTO

CPF: 06894461449

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Biólogo, biomédico e afins

Endereço: Rua Agricolândia, 150, Ap. 404 Várzea

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 50740-470

País: BRASIL

Telefone: (81) 992 266161

Fax:

Email: silenecarneironasc@gmail.com

Inventor 8 de 14

Nome: CARLOS ANDRÉ DOS SANTOS SILVA

CPF: 06516983402

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Biólogo, biomédico e afins

Endereço: Rua Poloni, 240, ap. 101. Várzea

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 50740-340

País: BRASIL

Telefone: (81) 998 530485

Fax:

Email: carlos.biomedicina@gmail.com

Inventor 9 de 14

Nome: YAGO EMÍDIO DE OLIVEIRA SILVA

CPF: 09805225445

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Engenheiro, arquiteto e afins

Endereço: Rua Manoel Brandão, 547, Cajueiro

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 52221-290

País: BRASIL

Telefone: (81) 995 358314

Fax:

Email: yago.csj@gmail.com

Inventor 10 de 14

Nome: JEYMESSON RAPHAEL CARDOSO VIEIRA

CPF: 02930177438

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Biólogo, biomédico e afins

Endereço: Rua Professora Anunciada da Rocha Melo, 105 aptº 1202, Madalena

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 50710-390

País: BRASIL

Telefone: (81) 996 370060

Fax:

Email: jeymesson@gmail.com

Inventor 11 de 14

Nome: CRISTIANE MOUTINHO LAGOS DE MELO

CPF: 03101143497

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Biólogo, biomédico e afins

Endereço: Rua Nereu Gomes Maciel, 177 Ap. 1204, Bloco B, Casa Caiada

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 53040-055

País: BRASIL

Telefone: (81) 997 044530

Fax:

Email: cristianemout@gmail.com

Inventor 12 de 14

Nome: PAULO ANTÔNIO GALINDO SOARES

CPF: 06050337497

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Biólogo, biomédico e afins

Endereço: Avenida Ulisses Montarroyos, 4516, Ap. 202, Candeias

Cidade: Jaboatão dos Gurarapes

Estado: PE

CEP: 54460-280

País: BRASIL

Telefone: (81) 997 126198

Fax:

Email: paulogsoares@hucff.ufrj.br

Inventor 13 de 14

Nome: PAULO ANTÔNIO DE SOUZA MOURÃO

CPF: 53984633815

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Médico

Endereço: Rua João Afonso, 60 - casa 18, Humaitá, Rio de Janeiro

Cidade: Rio de Janeiro

Estado: RJ

CEP: 22261-000

País: BRASIL

Telefone: (21) 393 82090

Fax:

Email: pmourao@hucff.ufrj.br

Inventor 14 de 14

Nome: ALINE LIMA DO NASCIMENTO

CPF: 08896362490

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Biólogo, biomédico e afins

Endereço: Rua Siqueira campos, 74, Centro

Cidade: Tuparetama

Estado: PE

CEP: 56760-000

País: BRASIL

Telefone: (81) 998 605284

Fax:

Email: liman.aline@gmail.com

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Comprovante de pagamento de GRU 200	Comprovante.Pagamento.INPI - R\$ 70,00 - em21.11.2017.pdf
Contrato Social	Estatuto registrado - Contrato Social.pdf
Ata da Assembleia	Ata posse da Diretoria.pdf
Ata Complementar	Ata Complementar - Dados Diretora Presidente.pdf
Resumo	Resumo.pdf
Desenho	Figuras.pdf
Reivindicação	Reivindicações.pdf
Relatório Descritivo	Relatório Descritivo.pdf

Acesso ao Patrimônio Genético

- ☒ Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

Declaração de veracidade

- ☒ Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.



Transações Pendentes

A33C211630967713012
21/11/2017 16:37:56

Pagamento de títulos com débito em conta corrente

21/11/2017 BANCO
361303613 - DO BRASIL - 16:37:52
0002

COMPROVANTE DE PAGAMENTO DE TITULOS

CLIENTE: INSTITUTO TECNOLOGICO DAS
AGENCIA: 3613-7 CONTA: 62.701-1

=====

BANCO DO BRASIL

00190000090294091617010668864175773790000007000
NR.
DOCUMENTO 112.101
NOSSO
NUMERO 29409161710668864
CONVENIO 02940916
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIED
AG/COD. BENEFICIARIO 2234/00333028
DATA DE VENCIMENTO 20/12/2017
DATA DO PAGAMENTO 21/11/2017
VALOR DO DOCUMENTO 70,00
VALOR
COBRADO 70,00

=====

NR.AUTENTICACAO D.30E.AA0.D45.6E1.9EB

=====

Central de Atendimento BB
4004 0001 Capitais e regioes metropolitanas
0800 729 0001 Demais localidades
Consultas, informacoes e servicos transacionais.

SAC
0800 729 0722
Informacoes, reclamacoes e cancelamento de produtos e servicos.

Ouvidoria
0800 729 5678
Reclamacoes nao solucionadas nos canais
habituais: agencia, SAC e demais canais de
atendimento.

Atendimento a Deficientes Auditivos ou de Fala
0800 729 0088
Informacoes, reclamacoes, cancelamento de
cartao, outros produtos e servicos de Ouvidoria.

Assinada por	JB389542 CLAUDIA SAMPAIO DE ANDRADE LIMA	21/11/2017 16:16:00
	JB389537 TIAGO HENRIQUE SOUZA COELHO	21/11/2017 16:37:56

Transação efetuada com sucesso.

Transação efetuada com sucesso por: JB389537 TIAGO HENRIQUE SOUZA COELHO.