

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE
IMUNOMODULATÓRIA DE EXOPOLISSACARÍDEOS PRODUZIDOS
POR LACTOBACILOS ISOLADOS DE KEFIR**

ORIENTADO: Igor Moura de Paiva

ORIENTADOR: Prof. Dr. Álvaro Cantini Nunes


CO-ORIENTADOR: Profa. Dra. Elisabeth Neumann

BELO HORIZONTE

Fevereiro de 2013

IGOR MOURA DE PAIVA

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE
IMUNOMODULATÓRIA DE EXOPOLISSACARÍDEOS PRODUZIDOS
POR LACTOBACILOS ISOLADOS DE KEFIR**



Dissertação apresentada ao Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do grau de mestre em Genética.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Álvaro Cantini Nunes

CO-ORIENTADOR: Profa. Dra. Elisabeth Neumann

BELO HORIZONTE

Fevereiro de 2013



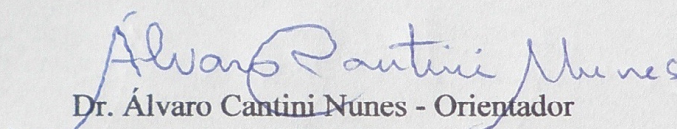
Pós-Graduação em Genética
Departamento de Biologia Geral, ICB
Universidade Federal de Minas Gerais
Av. Antônio Carlos, 6627 - C.P. 486 - Pampulha - 31270-901 - Belo Horizonte - MG
e-mail: pg-gen@icb.ufmg.br FAX: (+31) - 3409-2570

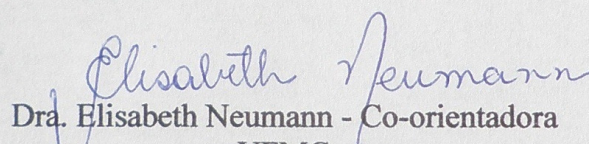


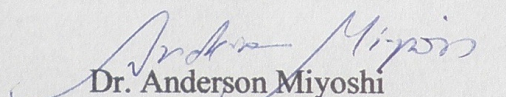
**"Caracterização Estrutural e Avaliação da Capacidade
Imunomodulatória de Exopolissacarídeos Produzidos por
Lactobacilos Isolados de Kefir"**

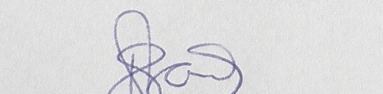
Igor Moura de Paiva

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:


Dr. Álvaro Cantini Nunes - Orientador
UFMG


Dra. Elisabeth Neumann - Co-orientadora
UFMG


Dr. Anderson Miyoshi
UFMG


Dra. Vera Lúcia dos Santos
UFMG

Belo Horizonte, 26 de fevereiro de 2013.

Dedico este trabalho especialmente a Deus, que a todo o momento me dá forças para seguir em frente.

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai José Rubens, por todo o apoio, confiança e ensinamentos corretos e à minha mãe Nelita, pelo amor desmedido e por me mostrar a cada dia que Deus cuida de nós. Não tenho palavras para expressar toda minha gratidão a vocês.

À Keila pelo carinho, companheirismo, paciência e diversão e a toda à sua família.

Ao meu irmão Rodrigo, que sinto muita saudade de quando dividíamos quarto e à Clarissa. Pela amizade e os divertidos momentos que já passamos, sobretudo na areia, de frente para o mar, na praia de Manguinhos.

À MSc. Karina, minha irmã quase mãe, pelo carinho e preocupação constante. Valeu pelas dicas nas análises estatísticas.

Aos meus orientadores Prof. Dr. Álvaro Cantini Nunes e Profa. Dra. Elisabeth Neumann, pelos ensinamentos e pela confiança depositada, além da amizade e dos momentos de descontração.

Aos professores e funcionários que foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho, em especial ao Prof. Dr. Jacques Robert Nicoli, à Profa. Dra. Rosa Maria Esteves Arantes, à Dra. Ivana Silva Lula, ao Jamil Silvano de Oliveira e ao prof. MSc. Daniel Bonoto Gonçalves.

Aos membros da banca examinadora por terem aceitado o convite e se disponibilizado a contribuir com seus conhecimentos.

Ao Prof. Dr. Marco Antônio Moreira Furtado por ter me iniciado na vida acadêmica e pela amizade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética, aos professores e aos amigos do mestrado, em particular os alunos Rachid, Jarbas, Daniel, Cris, Mariana e Mateus.

Aos amigos que estão ou já passaram pelo Laboratório de Genética Molecular de Protozoários Parasitas Sávio, Luige, Lenice, Bruno, Raphael, Débora, Pedro, Maurício, Márcia, Cinara, Camila e Adriana que contribuíram enormemente para a realização deste trabalho e tornaram os experimentos mais prazerosos e agradáveis.

Aos amigos que convivi no Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos Tássia, Karine, Elisa, Mário, Bianca, Ariane, Fabs, Samir, Éricka, Adriano, Quésia, Léo, Bárbara, Rafael, Silvinha, Luciana, Rafaella entre tantos outros que fizeram com que as longas e quentes tardes fossem menos árduas.

Aos funcionários e ex-funcionários da Ecovec Vitor, Bruna, Adriana, Renan, Letícia e Lucas.

Às todas as meninas do NIPE, em especial a Dra. Christiane Teixeira Cartelle, pela contribuição nos experimentos de histologia.

Aos amigos Léo, Leandro, Cíntia e Marcel pela certeza que de longe ou de perto a torcida e a lealdade foram grandes.

À todos os amigos da turma Farma2010/UFJF, Zé, Vinição, Daisy, Pedro, Estael, Fabrício, Léo... todos mesmo, que marcaram uma etapa de grande alegria e que tenho ótimas recordações.

À todos os meus familiares “Paiva” em especial aos meus primos Thiago, Daniel, Flávio, Vinícius e Willian pela grande amizade.

Por último e de maneira grandiosa agradeço a Deus. Muito obrigado por tudo Senhor!

RESUMO

Os grãos de Kefir são caracterizados por uma matriz exopolissacarídica que abriga uma complexa comunidade simbiótica de bactérias e leveduras. A bebida é obtida a partir da fermentação dos microrganismos, constituintes do grão, nos mais variados tipos de meio em que estes podem ser cultivados, destacando o leite bovino e soluções aquosas de sacarose. Os exopolissacarídeos podem apresentar um ou mais tipos de resíduos de monossacarídeos, de modo que a síntese dos homopolissacarídeos envolve apenas um gene enquanto a dos heteropolissacarídeos envolve vários genes. Estas moléculas apresentam inúmeras aplicações biotecnológicas tanto na indústria quanto na área biomédica. No presente trabalho foi realizada a identificação de cepas de lactobacilos produtores de exopolissacarídeos, a caracterização molecular dos genes das enzimas envolvidas na polimerização dos resíduos glicídicos, bem como a caracterização estrutural e avaliação da capacidade imunomodulatória destes biopolímeros. Dentre os 53 lactobacilos isolados de grãos de kefir que foram utilizados, 16 foram considerados produtores de exopolissacarídeo quando cultivados em meio MRS contendo sacarose. As sequências de nucleotídeo das glicosiltransferases de *L. kefiranofaciens* 1P3, *L. satsumensis* 10P e 10P2 e *L. parafarraginis* 12P apresentaram alta identidade entre si e identidade de 74-75% com uma sequência do GenBank referente à mesma enzima de uma cepa de *L. hilgardii* que também foi isolada de grãos de kefir. Os cinco exopolissacarídeos que foram caracterizados estruturalmente apresentaram apenas glicose na sua cadeia polimérica e ligações $\alpha(1,6)$ e $\alpha(1,4)$ nas proporções de 92 e 8% respectivamente, sendo identificados como dextranos (1P3, 10P, 10P2, 12P e 19U) e a massa molecular dos mesmos foi superior a 500 KDa. Para avaliar a capacidade imunomodulatória dos exopolissacarídeos, camundongos tratados com os dextranos 1P3, 10P e 10P2 foram comparados com camundongos tratados com salina. Seus efeitos imunomoduladores no intestino delgado dos animais foram avaliados pela produção de IgA e pela expressão das citocinas IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p40, IL-17, IFN- γ , TGF- β e TNF- α . Todos os dextranos estimularam um aumento significativo na produção de IgA. Os animais que receberam dextrano 1P3 apresentaram produção reduzida de IL-10 e TGF- β , enquanto os que receberam dextrano 10P2 tiveram a expressão de TNF- α aumentada.

Palavras-chave: Grãos de Kefir, Lactobacilos, Exopolissacarídeo, Imunomodulação.

ABSTRACT

Kefir grains are characterized as an exopolysaccharide matrix, where a symbiotic community of bacteria and yeast are firmly embedded. The beverage is obtained by fermentation of the microorganisms, which compose the grains, in several possible types of growth medium, highlighting cow milk and aqueous solutions of sucrose. Exopolysaccharide can present one or more types of monosaccharide residues, so that homopolysaccharide synthesis involves only one gene while heteropolysaccharide synthesis involves several genes. These molecules present numerous biotechnology applications even in industry as in biomedical area. In this present work, it was performed identification of exopolysaccharide-producing lactobacilli strains, molecular characterization of the genes of the enzymes involved in the polymerization of glycidic residues, as well as structural characterization and evaluation of immunomodulatory capacity of these biopolymers. Among 53 isolated lactobacilli strains from kefir grains which were utilized, 16 were considered exopolysaccharide-producing strains when cultivated in MRS medium containing sucrose. Nucleotide sequences of the glucosyltransferases from *L. kefiranofaciens* 1P3, *L. satsumensis* 10P and 10P2 and *L. parafarraginis* 12P presented high identity among them and identity of 74-75% with a sequence from the GenBank regarding to same enzyme of a *L. hilgardii* strain which also were isolated from kefir grains. The five exopolysaccharides which were characterized structurally presented only glucose in their polymeric chain and bound $\alpha(1,6)$ e $\alpha(1,4)$ in the proportions 92 and 8% respectively, being identified as dextrans (1P3, 10P, 10P2, 12P e 19U) and their molecular weight were greater than 500 KDa. To evaluate the immunomodulatory capacity of the exopolysaccharides, mice treated with dextrans 1P3, 10P and 10P2 were compared with mice treated with saline. Their immunomodulatory effects under small intestine of the animals were evaluated by IgA production and by expression of the cytokines IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p40, IL-17, IFN- γ , TGF- β and TNF- α . All dextrans stimulated an increase significant in the production of IgA. Animals which received dextran 1P3 presented reduced production of IL-10 and TGF- β , whereas those which received dextran 10P2 had the expression of TNF- α increased.

Keywords: Kefir, Lactobacilli, Exopolysaccharide, Dextran, immunomodulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Imagens de dois tipos de grãos de Kefir. Um cultivado em leite bovino (A) e outro em água com açúcar (B). Fonte: Ebay, 2013.	18
Figura 2 - Estrutura química do kefirano. D-Glcp: radical D-glicopiranosil; D-Galp: radical D-galactopiranosil. Fonte: adaptado de Kooiman (1968) e Micheli et al. (1999).	25
Figura 3 - Representação do mecanismo de ação das dextrano-sacarases. Letra "X" indica os dois domínios do sítio catalítico da enzima. Fonte: Adaptado de Robyt, Kimble e Walseth (1974).	30
Figura 4 - <i>L. satsumensis</i> 10P2 em ágar MRS (A) e em ágar sMRS contendo 8% de sacarose (B). A produção de EPS foi reconhecida pela visualização de colônias com aspecto viscoso.	47
Figura 5 - Imagem de um gel de agarose (1%) capturada sob LUV mostrando a resolução dos produtos de PCR referente à região codificadora do sítio catalítico das glicosiltransferases dos isolados 1P3 (poço 2); 10P (poço 3); 10P2 (poço 4); 12P (poço 5) e 19U (poço 6). Poço 1: marcador de massa molecular de 50 bp (New England).	50
Figura 6 - Imagem de um gel de poliacrilamida 6% corado com nitrato de prata que mostra o padrão de bandas referente à resolução dos produtos da (GTG) ₅ -PCR de oito isolados de lactobacilos produtores de EPS: <i>L. kefiranofaciens</i> 1P (2) e 1P3 (3); <i>L. casei</i> 15U2 (4) e 16U (5); <i>L. satsumensis</i> 10P (6) e 10P2 (7); <i>L. perolens</i> 17P2 (8) e 19P (9); Poço 1: marcador de massa molecular de 100 pb (Invitrogen).	52
Figura 7 - Espectros de ¹ H-RMN do EPS produzido pelo <i>L. satsumensis</i> 10P2. Os valores são referente ao deslocamento químico expresso em ppm (acima do sinal) e à intensidade expresso pela área (abaixo do sinal).	56
Figura 8 - Análise por cromatografia de troca iônica dos EPS de <i>L. satsumensis</i> 10P2 submetido à hidrólise ácida por 2 h (A); Sobreposição de cromatogramas referentes a padrões de glicose, frutose, arabinose e glicerol (Sigma-Aldrich) (B); EPS de <i>L. satsumensis</i> 10P2 submetido à hidrólise ácida por 16 h (C).	58
Figura 9 - Análise dos extratos de EPS de <i>L. kefiranofaciens</i> 1P3 por cromatografia de troca iônica.	61
Figura 10 - Análise dos extratos de EPS de <i>L. satsumensis</i> 10P por cromatografia de troca iônica.	61

Figura 11 - Análise dos extratos de EPS de <i>L. satsumensis</i> 10P2 por cromatografia de troca iônica.....	62
Figura 12 - Análise dos extratos de EPS de <i>L. parafarraginis</i> 12P por cromatografia de troca iônica.....	62
Figura 13 - Análise dos extratos de EPS de <i>L. mali</i> 19U por cromatografia de troca iônica.....	63
Figura 14 - Visualização de IgA através de imunofluorescência direta em cortes representativos de íleo de animais do grupo salina (A) e do grupo tratado com dextrano 10P2 (B).	65
Figura 15 - Efeito do dextrano no íleo de camundongos CV sobre a produção de IgA. Os valores da tabela indicam a porcentagem de área marcada por IgA em relação a área total das porções ilíacas analisadas.....	66
Figura 16 - Efeito dos dextrans no intestino delgado sobre a produção de IL-5 em camundongos CV. Os valores da tabela indicam o nível relativo de expressão da IL-5 nos grupos testes comparado com o grupo salina.	68
Figura 17 - Efeito dos dextrans no intestino delgado sobre a produção de IL-6 em camundongos CV. Os valores da tabela indicam o nível relativo de expressão da IL-6 nos grupos testes comparado com o grupo salina.....	68
Figura 18 - Efeito dos dextrans no intestino delgado sobre a produção de IL-10 em camundongos CV. Os valores da tabela indicam o nível relativo de expressão da IL-10 nos grupos testes comparado com o grupo salina.	69
Figura 19 - Efeito dos dextrans no intestino delgado sobre a produção de IL-12p40 em camundongos CV. Os valores da tabela indicam o nível relativo de expressão da IL-12p40 nos grupos testes comparado com o grupo salina.....	69
Figura 20 - Efeito dos dextrans no intestino delgado sobre a produção de IL-17 em camundongos CV. Os valores da tabela indicam o nível relativo de expressão da IL-17 nos grupos testes comparado com o grupo salina.....	70
Figura 21 - Efeito dos dextrans no intestino delgado sobre a produção de IFN- γ em camundongos CV. Os valores da tabela indicam o nível relativo de expressão do IFN- γ nos grupos testes comparado com o grupo salina.	70
Figura 22 - Efeito dos dextrans no intestino delgado sobre a produção de TGF- β em camundongos CV. Os valores da tabela indicam o nível relativo de expressão do TGF- β nos grupos testes comparado com o grupo salina.....	71

Figura 23 - Efeito dos dextranos no intestino delgado sobre a produção de TNF- α em camundongos CV. Os valores da tabela indicam o nível relativo de expressão do TNF- α nos grupos testes comparado com o grupo salina.....	71
Figura 24 - <i>L. kefiranofaciens</i> 1P3 cultivado em ágar sMRS.....	95
Figura 25 - <i>L. satsumensis</i> 10P cultivado em ágar sMRS.....	95
Figura 26 - <i>L. parafarraginis</i> 12P cultivado em ágar sMRS.....	96
Figura 27 - <i>L. mali</i> 19U cultivado em ágar sMRS.....	96
Figura 28 - Espectros de ^1H -RMN do EPS de <i>L. kefiranofaciens</i> 1P3.	97
Figura 29 - Espectros de ^1H -RMN do EPS de <i>L. satsumensis</i> 10P.	98
Figura 30 - Espectros de ^1H -RMN do EPS de <i>L. parafarraginis</i> 12P.	98
Figura 31 - Espectros de ^1H -RMN do EPS de <i>L. mali</i> 19U.....	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Padronização das condições da RT-qPCR para quantificação relativa da expressão gênica das citocinas no intestino delgado de camundongos.	44
Tabela 2 - Procedência e identificação dos lactobacilos produtores de EPS isolados de Kefir de água e Kefir de leite.	46
Tabela 3 - Produção de EPS por cinco isolados de lactobacilos de Kefir.....	53
Tabela 4 - Valores ^a de deslocamento químico e da integração dos sinais correspondentes aos hidrogênios anoméricos dos extratos de EPS.	54
Tabela 5 - Valores ^a dos tempos de retenção nas análises por cromatografia de troca iônica dos EPS hidrolisados.....	57
Tabela 6 - Valores ^a dos tempos de retenção nas análises por cromatografia de gel filtração dos EPS.....	59
Tabela 7 - Características dos extratos de dextrano utilizados para a avaliação da capacidade imunomodulatória.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS

- ¹H - Hidrogênio de massa atômica 1
- A - Adenina
- Actb- Beta-actina
- BA - Bahia
- BAL - Bactérias do ácido láctico
- bp - Pares de base
- BLAST - *Basic Locus Alignment Search Tool*
- EMP - Via glicolítica de Embden-Meyerhof-Parnas
- EPS - Exopolissacarídeo
- C - Citosina
- cDNA - Ácido desoxirribonucleico complementar
- Cq- Ciclo de quantificação
- CS - Componente secretório
- CTAB - Cetiltrimetilamônio
- CV- Convencional
- D - Sítio degenerado que indica G ou A ou T
- D₂O - Água deuterada
- DegFor - Iniciador degenerado *forward*
- DegRev - Iniciador degenerado *reverse*
- DNA - Ácido desoxirribonucleico
- EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
- FTF - Frutossiltransferase
- G - Guanina
- Gapdh- Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
- GF - Inseto de germes
- GRAS - Geralmente Reconhecido como Seguro
- GTF - Glicosiltransferase
- H₂SO₄ - Ácido sulfúrico
- HCl - Ácido clorídrico
- HClO₄ - Ácido perclórico
- HE - Hematoxilina e eosina
- HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência

ICB - Instituto de Ciências Biológicas
ID - Código de identificação
IL - Interleucina
Ig - Imunoglobulina
IgA⁺ - Células produtoras de IgA
IgD⁺ - Células produtoras de IgD
IgM⁺ - Células produtoras de IgM
IFN- γ - Interferon gama
K - Sítio degenerado que indica G ou T
KDa - Quilodalton
KOH - Hidróxido de potássio
LiCl - Cloreto de lítio
IMRs - MRS modificado contendo lactose
LUV - Luz ultravioleta
MG - Minas Gerais
MRB - Modificadoras da resposta biológica
mRNA - Ácido ribonucleico mensageiro
MRS - De Man, Rogosa e Sharpe
N - Sítio degenerado que indica qualquer base nitrogenada
NaNO₃ - Nitrato de sódio
NRE - Nível relativo de expressão
pH - Potencial de hidrogênio
PBS - Salina tampão fosfato
PCR - Reação em cadeia da polimerase
PR - Paraná
R - Sítio degenerado que indica A ou G
R² - Coeficiente de correlação
RMN - Ressonância magnética nuclear
rMRS - MRS modificado contendo rafinose
RNA - Ácido ribonucleico
rRNA - RNA ribossômico
Rt - Tempo de retenção
RT-PCR - Reação da transcriptase reversa, seguida de PCR
RT-qPCR - PCR quantitativa, associada com reações de transcrição reversa

S - Sítio degenerado que indica G ou C
sIgA - Imunoglobulina A secretora
sMRS - MRS modificado contendo sacarose
qPCR- PCR quantitativa
T - Timina
TES - Tris, EDTA e sacarose
TGF- β - Fator de transformação do crescimento beta
TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa
UFC - Unidades formadoras de colônias
UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais
V - Sítio degenerado que indica G ou A ou C
Y - Sítio degenerado que indica C ou T
W - Sítio degenerado que indica A ou T

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	v
RESUMO	vii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Grãos de Kefir	18
1.2 Lactobacilos	20
1.3 Exopolissacarídeos	22
1.3.1 Dextranos	24
1.3.2 Kefirano	24
1.3.3 Oligossacarídeos	26
1.4 Glicosiltransferases	27
1.4.1 Gene <i>gtf</i>	28
1.4.2 Mecanismo de ação catalítica	28
1.5 Modulação do sistema imune por polissacarídeos	31
2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	33
3 OBJETIVOS	34
3.1 Objetivo Geral	34
3.2 Objetivos específicos	34
4 MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 Procedência dos lactobacilos	35
4.2 Triagem dos isolados produtores de exopolissacarídeo	35
4.3 Procedimentos moleculares	36
4.3.1 Extração do DNA genômico	36
4.3.2 Caracterização molecular do sítio catalítico do gene <i>gtf</i>	36
4.3.3 (GTG) ₅ -PCR	37
4.4 Produção e extração dos exopolissacarídeos	37
4.5 Caracterização estrutural dos exopolissacarídeos	38
4.5.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear	38
4.5.2 Cromatografia líquida de alta eficiência	38

4.5.2.1 Determinação da constituição de monossacarídeos nos exopolissacarídeos	39
4.5.2.2 Determinação da massa molecular	39
4.6 Pureza dos extratos de exopolissacarídeos	40
4.6.1 Quantificação de proteínas totais	40
4.6.2 Identificação de monossacarídeos residuais	40
4.7 Avaliação da capacidade imunomodulatória dos exopolissacarídeos	40
4.7.1 Animais	40
4.7.2 Tratamentos	41
4.7.3 Determinação do efeito dos exopolissacarídeos na produção de IgA	41
4.7.4 Extração de RNA total e produção de cDNA a partir do intestino delgado dos animais	42
4.7.5 Quantificação relativa da expressão de citocinas no intestino delgado dos animais	43
4.7.6 Análises estatísticas	45
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1 Triagem dos isolados de lactobacilos produtores de exopolissacarídeo	46
5.2 Caracterização molecular do sítio catalítico do gene <i>gtf</i>	49
5.3 (GTG) ₅ -PCR	51
5.4 Produção de exopolissacarídeos	53
5.5 Caracterização estrutural dos exopolissacarídeos	54
5.5.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear	54
5.5.2 Determinação de monossacarídeos	56
5.5.3 Determinação do massa molecular	59
5.6 Pureza dos exopolissacarídeos	60
5.7 Avaliação da capacidade imunomodulatória dos exopolissacarídeos	63
6 CONCLUSÃO	74
REFERÊNCIAS	75
APÊNDICE	85

1 INTRODUÇÃO

1.1 Grãos de Kefir

Os grãos de Kefir são constituídos por uma matriz polissacarídica, onde bactérias e leveduras se encontram firmemente envolvidas. Esta matriz, composta principalmente por exopolissacarídeos produzidos por algumas cepas, retém um balanço relativamente estável e constante de microrganismos. Todo o conjunto que caracteriza o grão (bactérias, leveduras e a trama polimérica) tem sido descrito como uma comunidade que coexiste numa relação de simbiose (YÜKSEKDAG; BEYATH; ASLIM, 2004).

Kefir é uma bebida obtida a partir da fermentação conduzida pelos microrganismos constituintes do grão nos mais variados tipos de meio em que estes podem ser cultivados como leite de diferentes espécies, soro de queijo, leite de soja, de arroz, de coco, sucos de frutas, solução aquosa de sacarose, de melação, de cacau, entre outros. Na figura 1 estão ilustrados os dois tipos de grãos mais comumente utilizados: os cultivados em leite bovino e em água com açúcar (sacarose) (MAGALHÃES et al., 2011; PUERARI; MAGALHÃES; SCHWAN, 2012).

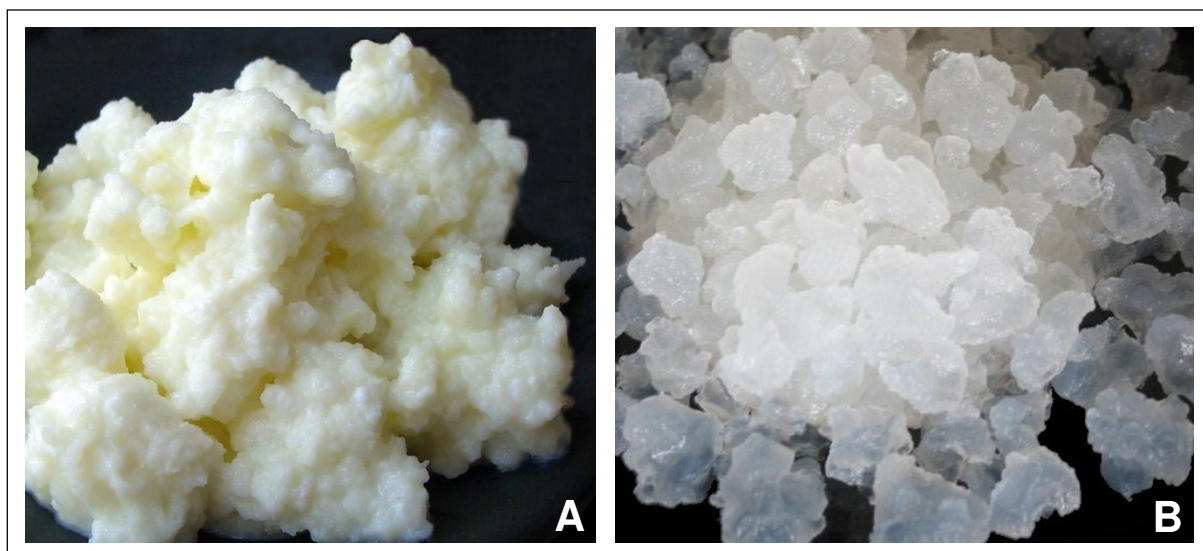


Figura 1 - Imagens de dois tipos de grãos de Kefir. Um cultivado em leite bovino (A) e outro em água com açúcar (B). Fonte: Ebay, 2013.

Nos grãos de Kefir é encontrada uma diversidade microbiana bastante elevada e estes apresentam grande heterogeneidade entre si, dependendo da origem dos grãos e dos diferentes métodos de cultivo. Os principais representantes são bactérias ácido-láticas do gênero *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* e *Enterococcus*, bactérias ácido-acéticas do gênero *Acetobacter* e leveduras do gênero *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* e *Candida* (GARROTE; ABRAHAM; ANTONI, 2002; LOPITZ-OTSOA et al., 2006).

O sabor e aroma únicos de cada tipo de Kefir são resultado da atividade metabólica dos microrganismos que compõem os grãos, destacando a fermentação láctica e outros tipos de fermentação com menores proporções, como a fermentação alcoólica. Desta forma, a bebida pronta para o consumo possui ácido láctico, dióxido de carbono, álcool etílico, ácidos acético, fórmico, succínico e propiônico, diferentes aldeídos como acetaldeído e propionaldeído, traços de álcool isoamílico, acetona e outros (GÜVEN; GÜVEN; GÜLMEZ, 2003).

Segundo Fontán et al. (2006), a produção industrial de Kefir é um processo muito complexo devido à dificuldade de manter a estabilidade da composição microbiana nos grãos ao longo do tempo. Não obstante, o Kefir é bastante explorado industrialmente em determinadas regiões, especialmente no leste europeu. Na Rússia, por exemplo, o Kefir de leite bovino é fabricado por inúmeras indústrias lácteas como a Danone (“Activia Kefir” e “Danone Kefir”), a Samaralacto (“Bio Balance”, “Prostokvashino” e “Dr. Brandt”), a Ufamolagroprom (Veselyi molochnik) e a Lianozovo (“Domik v derevne”) (ENIKKEEV, 2012).

Os grãos de Kefir cultivados em leite tiveram sua origem na região do Cáucaso, que atualmente compreende os territórios da Geórgia, Armênia, Azerbaijão e parte da Rússia. Estes grãos caracterizam-se por serem partículas brancas ou amareladas, opacas, semelhantes a uma pipoca ou couve-flor, de tamanho irregular, variando desde alguns milímetros até entre 2-3 cm de diâmetro. Sua matriz polissacarídica é composta por um biopolímero que contém quantidades aproximadamente equimolares de resíduos de D-glicose e D-galactose denominado Kefirano e descrito primeiramente por Kooiman em 1968. Vários representantes do gênero *Lactobacillus* são descritos como produtores deste biopolímero como *L. kefir*, *L. parakefir*, *L. kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens*, *L. kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum*, dentre outros (BARAN, 2002; MICHELI et al., 1999).

Por sua vez, os grãos de Kefir cultivados em água com açúcar não possuem ainda uma origem bem estabelecida, todavia a ideia de existir múltiplas origens parece ser a mais plausível. Inúmeros sistemas simbiotes semelhantes entre si já foram descritos, como “grãos de Kefir de água” (ou “grãos de Kefir de açúcar”), “tibicos”, ou “tibi”, “grãos de cerveja de gengibre”, “abelhas Californianas”, “abelhas Africanas”, “Ale Nuts”, “bálsamo de Gilead”, “bèbéés” e “grãos japoneses de cerveja”. A primeira descrição científica foi dos “grãos de cerveja de gengibre”, publicada por Ward (1892), os quais possuem grande notoriedade na Inglaterra por terem sido utilizados por soldados britânicos na Guerra da Criméia em 1855. No mesmo período, Lutz (1899) descreveu os grãos denominados “tibi”, que são originários do México e foram inicialmente retirados de folhas de *Opuntia*, um gênero de cactos muito comum na região (HORISBERGER, 1969; WALDHERR et al., 2010).

Ao comparar os grãos de Kefir de água com os de leite, muitas semelhanças são observadas. Entretanto os grãos cultivados em água com sacarose, na presença ou não de frutas (geralmente figo e limão), são partículas translúcidas e não opacas, sua cor varia dependendo do tipo de açúcar utilizado, por exemplo, com açúcar mascavo os grãos apresentam coloração marrom. Além disso, sua matriz exopolissacarídica é constituída principalmente por dextrano, um homopolissacarídeo bem menos complexo que o Kefirano, contendo apenas resíduos de D-glicose. Seus principais produtores são *L. brevis* e *L. hilgardii* (HORISBERGER, 1969; WALDHERR et al., 2010).

1.2 Lactobacilos

O gênero *Lactobacillus* constitui-se um grupo heterogêneo de bactérias que compreende 185 espécies e 28 subespécies. De acordo com o Delineamento Taxonômico dos Procariotos (GARRITY et al., 2004), o gênero pertence ao filo *Firmicutes*, classe *Bacilli*, ordem *Lactobacillales*, família *Lactobacillaceae*. Ocupam diversos habitats como solo, vegetais e água; trato respiratório, gastrointestinal e urogenital de humanos e animais; e alimentos, especialmente iogurtes, bebidas fermentadas, queijos, carnes e outros (EUZÉBY, 2013; FELIS; DELLAGLIO, 2007).

Caracterizam-se morfologicamente como bastonetes ou cocobacilos e pertencem ao grupo das bactérias do ácido láctico (BAL), juntamente com mais 10 gêneros (*Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella*). Os integrantes deste grupo, ainda que bastante diverso, compartilham algumas características comuns: são microrganismos imóveis, Gram-positivo, não produtores de catalase, anaeróbios facultativos, apresentam uma porcentagem de G+C no genoma inferior a 54% e, em especial, produzem ácido láctico como principal subproduto da fermentação de açúcares e álcoois superiores, característica esta que rendeu o nome de BAL ao grupo (STILES; HOLZAPFEL, 1997).

Podem ser subdivididos quanto ao tipo de fermentação realizada: (i) Lactobacilos homofermentadores obrigatórios, que fermentam apenas hexoses, formando principalmente lactato (>85%) pela via de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), a via mais comum de glicólise; (ii) Lactobacilos heterofermentadores obrigatórios, que fermentam tanto hexoses quanto pentoses pela via das pentoses fosfato, gerando lactato, etanol (ou ácido acético) e dióxido de carbono em quantidades equimolares; e (iii) Lactobacilos heterofermentadores facultativos, que fermentam hexoses pela via de EMP e pentoses pela via das pentoses fosfato, sendo esta via inativada em presença de hexoses (HAMMES; VOGEL, 1995).

As bactérias pertencentes ao gênero *Lactobacillus* desempenham um papel crucial na produção de alimentos como vegetais, carnes e em particular os leites fermentados, que constituem o principal veículo de cepas probióticas. Durante a última década os efeitos benéficos destes microrganismos, como prevenção, alívio ou cura de distúrbios intestinais causadas por intolerância à lactose, alergia alimentar, diarreia, doenças intestinais inflamatórias e constipações vem sendo cada vez mais compreendidos. Em consequência, o consumo de probióticos como promotores de saúde tem deixado de ser anecdotal e tem sido baseado em rigorosos estudos clínicos utilizando cepas bem caracterizadas (ALANDER et al., 1999; BERNARDEAU et al., 2008).

A utilização de técnicas moleculares constitui-se uma ferramenta muito importante para a identificação e caracterização de lactobacilos. Estudos filogenéticos e de diversidade entre procariotos baseado em sequências do gene 16S rRNA se iniciaram há mais de 40 anos. Estes genes ribossômicos apresentam

sequências extremamente conservadas, sendo funcionalmente e evolutivamente homólogos para todos os seres vivos, uma vez que são fundamentais para a maquinaria de síntese proteica, não sofrem transferência lateral e, além disso, contêm fragmentos com variabilidade suficiente para a diferenciação em nível de gênero e em alguns casos de espécie (PONTES et al., 2007).

Entretanto, dependendo da proximidade filogenética entre as espécies, apenas a identificação baseada no gene 16S rRNA não é suficiente para sua distinção. A molécula de rRNA, por ser altamente conservada, é lenta para se modificar ao longo da evolução das espécies, não sendo capaz de revelar diferenças significativas entre espécies que divergiram recentemente como *L. plantarum*, *L. paraplantarum* e *L. pentosus* ou *L. casei*, *L. rhamnosus* e *L. zae* (FELIS; DELLAGLIO, 2007).

Diversos métodos podem ser empregados em conjunto para aumentar o poder discriminatório na identificação de microrganismos como a hibridização DNA-DNA, o sequenciamento de genes codificadores de proteínas e alguns parâmetros taxonômicos específicos para as BAL como o conteúdo de G+C, tipo de isômero da molécula de ácido lático produzido e composição de peptídeoglicano da parede celular. Um método que vem sendo bastante empregado e que é considerado menos laborioso, são os que utilizam técnicas de DNA *fingerprinting* baseadas na reação da cadeia da polimerase (PCR), como a amplificação de elementos repetitivos do DNA bacteriano (rep-PCR), destacando a (GTG)₅-PCR. Esta técnica caracteriza-se como uma reação de PCR que gera um padrão de bandas de alta complexidade, sendo rápida e reprodutível para a distinção de espécies, subespécies e até linhagens de *Lactobacillus* (FELIS; DELLAGLIO, 2007; GEVERS; HUYS; SWINGS, 2001).

1.3 Exopolissacarídeos

Os exopolissacarídeos (EPS) são polímeros extracelulares constituídos de centenas ou milhares de resíduos de monossacarídeos que podem ser produzidos por bactérias, leveduras, fungos e algas e proporcionam aos organismos produtores proteção contra ambientes adversos. Na maioria dos casos contribuem contra dessecação celular, estresse osmótico, fagocitose, presença de antibióticos ou

componentes tóxicos, ataques de fagos e predação por protozoários. Em organismos unicelulares os EPS proporcionam aderência intercelular e entre célula-superfície, constituindo-se um dos principais componentes do biofilme de colônias microbianas (SAVADOGO et al., 2004).

Estes polímeros de elevada massa molecular são amplamente explorados industrialmente, sobretudo nas indústrias alimentícia, química e farmacêutica, devido à suas propriedades como emulsificação, estabilização, floculação, controle de cristalização, inibição de sinérese (liberação de água de um sistema), encapsulação, formação de filme, remoção de metais pesados e outros. Os principais biopolímeros utilizados são os de plantas (pectina, amido), de algas (alginato, carrágena) e hidrocolóides proteicos de animais (gelatina, caseína), bem como os microbianos (dextranos, gomas xantana, gelana, curdlana) (VUYST; DEGEEST, 1999; WANG et al., 2008).

Os *Lactobacillus* não são produtores de grandes quantidades de EPS se comparado com plantas, algas e algumas bactérias como a bactéria fitopatogênia *Xanthomonas campestris*, produtora da goma xantana, que a cada ano mais de 20.000 toneladas são comercializadas, sendo usada especialmente como espessante. Contudo, seu uso tem sido cada vez mais incentivado em alimentos e em medicamentos, uma vez que possuem o *status* de seguras: *Generally Recognized as Safe* (GRAS), o que facilita sua aprovação para o consumo por parte dos órgãos sanitários. Além disso, a diversidade existente entre os EPS de lactobacilos constitui-se um caminho em potencial para mais inovações envolvendo estas moléculas (BADEL; BERNARDI; MICHAUD, 2011).

Em geral, as moléculas de EPS produzidas por BAL são subdivididas em dois grupos: (1) homopolissacarídeos, que possuem 4 subgrupos: (i) α -D-glicanos como dextranos, mutanos, reuteranos e alternanos; (ii) β -D-glicanos, constituídos por resíduos do anômero β da D-glicose, unidos sobretudo por ligações glicosídicas $\beta(1,3)$ com ramificações $\beta(1,2)$; (iii) β -D-frutanos que incluem principalmente: levanos (ligações glicosídicas $\beta(2,1)$) e inulinas (ligações glicosídicas $\beta(2,1)$) contendo resíduos de β -D-frutofuranose; e (iv) outros, como os poligalactanos, compostos por unidades de repetição idênticas com diferentes ligações glicosídicas; e (2) heteropolissacarídeos, compostos por unidades de repetições contendo mais de um tipo de resíduos de açúcar (MALIK et al., 2009; VUYST; DEGEEST, 1999).

1.3.1 Dextranos

São biossintetizados pela ação de apenas uma enzima. Estas enzimas, denominadas glicosiltransferase, são exportadas para o meio extracelular pelo microrganismo produtor e em presença de sacarose no meio, realizam a polimerização de resíduos de glicose. Podem ser produzidos por diferentes microrganismos, sobretudo por BAL, são classificados como homopolissacarídeos porque sua cadeia polimérica é constituída somente por resíduos de D-glicose, os quais são ligados, majoritariamente, por ligações glicosídicas $\alpha(1,6)$ (MONCHOIS; WILLEMOT; MONSAN, 1999).

Os dextranos produzidos por *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F foram os primeiros biopolímeros a serem utilizados industrialmente em 1948 e muitas aplicações são atribuídas a estas moléculas. São utilizados como matéria-prima na fabricação de peneiras moleculares, constituindo o recheio de colunas cromatográficas de permeação em gel, como as colunas Sephadex, Sepharose, Sephacyl, dentre outras. Na prática clínica, são utilizados como substituto do plasma sanguíneo e facilitador do fluxo de sangue como os dextranos de massa molecular 70 e 40 KDa (BELDER, 2003).

Os dextranos em solução de NaCl (7% v/v) foram descritos por apresentarem efeito anti-inflamatório (RIZOLI et al., 2006). Alguns dextranos quimicamente modificados como sulfato de dextrano, dietilaminoetil dextrano (DEAE-dextrano) e dextrano acetilado (Ac-DEX) também apresentam efeitos na resposta imune, sendo bastante utilizados como adjuvante imune de vacinas (PETROVSKY; COOPER, 2011). Por outro lado, os dextrano sulfato de sódio (DSS) induzem *in vivo* graves inflamações no cólon pela formação de nano-lipocomplexos entre esta molécula e ácidos graxos de cadeia média, em particular no cólon distal e são amplamente utilizados para induzir colite em modelos animais (LAROUÏ et al., 2012).

1.3.2 Kefirano

O Kefirano é um heteropolissacarídeo extracelular muito importante para a formação dos grãos de Kefir de leite. Possui 21 unidades de repetição hexassacarídica, que consiste de um oligossacarídeo contendo 3 resíduos de D-

glicopiranosose e 3 de D-galactopiranosose que se repete ao longo da cadeia polimérica desta molécula (Figura 3) (KOOIMAN, 1968; MAEDA et al., 2004).

Diferente dos dextrans que são polimerizados por ação de apenas uma enzima, a biossíntese dos heteropolissacarídeos se inicia no citoplasma bacteriano onde suas unidades de repetição são formadas a partir de nucleotídeos de açúcar como a glicose uridina difosfato (UDP-glicose) e a galactose uridina difosfato (UDP-galactose) permanecendo ligadas à membrana plasmática. Na etapa seguinte estas unidades de repetição são expostas para o meio extracelular ainda ligadas à membrana, são polimerizadas e só então são secretadas para o meio extracelular. Lamothe et al. (2002) estudaram a biossíntese de um EPS de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e concluíram que um grupo de 14 genes localizados cromossomicamente, são os responsáveis pela produção e secreção destes heteropolissacarídeos.

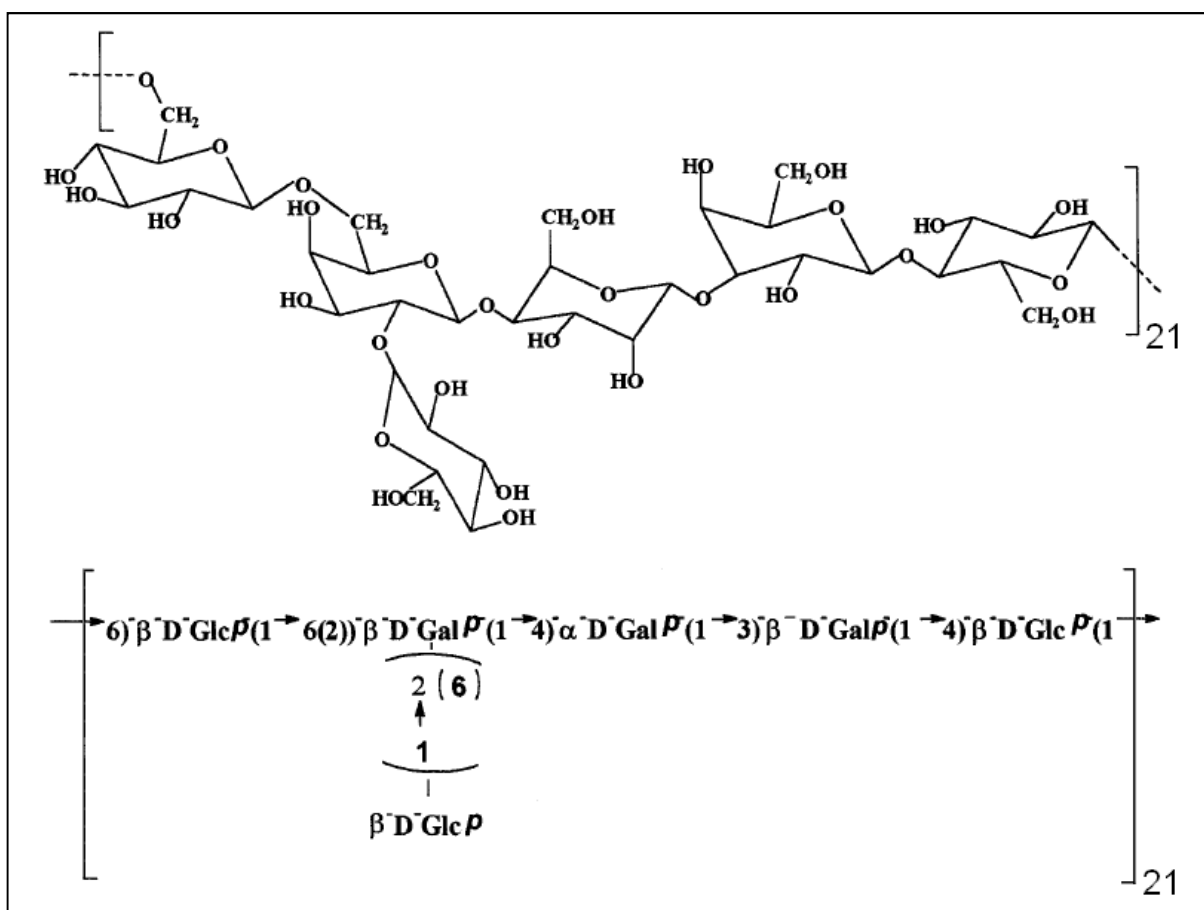


Figura 2 - Estrutura química do kefirano. D-Glcp: radical D-glicopiranosil; D-Galp: radical D-galactopiranosil. Fonte: adaptado de Kooiman (1968) e Micheli et al. (1999).

Diversos trabalhos tem mostrado que o Kefirano é uma molécula com grande potencial tecnológico e de promoção da saúde. Em solução, formam filmes com comportamento pseudoplástico de alta elasticidade e resistência à tração (PIERMARIA et al., 2009), além de apresentar uma melhor capacidade de emulsificação do que a goma xantana (WANG et al., 2008). O Kefirano ainda apresenta atividade antitumoral (SHIOMI et al., 1982), atividade antimicrobiana (RODRIGUES et al., 2005), reduz os níveis séricos de colesterol e triglicérides (MAEDA et al., 2004), protege de efeitos citopáticos causados por *Bacillus cereus* (MEDRANO et al., 2009), suprime a ativação de mastócitos induzidos por antígeno (FURUNO; NAKANISHI, 2012), possui efeito na imunidade de mucosa do trato gastrointestinal (VINDEROLA et al., 2006; MEDRANO et al., 2011) dentre outras aplicações.

1.3.3 Oligossacarídeos

São carboidratos de cadeia curta que estão presentes em abundância na natureza. Apresentam inúmeras propriedades sendo utilizados como nutracêuticos, estimuladores imunológicos e principalmente como prebióticos. Um prebiótico é definido como um ingrediente alimentar não digerível que afeta beneficemente seu hospedeiro humano ou animal por estimular seletivamente o crescimento e/ou a atividade de populações bacterianas benéficas à saúde, como bactérias do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, no trato gastrointestinal (GIBSON e RASTAL, 2006).

Atualmente mais de 20 tipos de oligossacarídeos já foram descritos com atividade prebiótica, destacando os fruto- (FOS), os isomalto- (IMO), os galacto- (GOS) e os xilo-oligossacarídeos (XOS). Sua obtenção pode ser por diversas maneiras desde reações químicas como isomerização e transgalactosilação até produção enzimática e hidrólise de polissacarídeos (BADEL, BERNARDI e MICHAUD, 2011; GIBSON; RASTAL, 2006).

As BAL são fonte de oligossacarídeos através de 3 maneiras: (i) obtenção pelo cultivo bacteriano, como a extração do FOS extracelular produzido por *L. reuteri* 121 (VAN HIJUM et al., 2002); (ii) síntese enzimática em presença de aceptores eficientes como a gentiobiose (CÔTÉ, 2009); (iii) hidrólise controlada de

polissacarídeos utilizando enzimas como as glicosil-hidrolases (E.C.3.1.y) e as liases (E.C. 4.2.2.y) (BADEL; BERNARDI; MICHAUD, 2011).

1.4 Glicosiltransferases

As glicosiltransferases (GTF), também denominadas de glicano-sacarases são enzimas extracelulares produzidas principalmente por algumas BAL. São pertencentes à família 70 das glicosil hidrolases e consideradas do grupo E.C.2.4.x.y. (CAZY, 2013). A partir da sacarose, catalisam a polimerização de resíduos de D-glicose de elevada massa molecular, conhecidos como glicanos, entretanto quando bons aceptores de elétrons, como a maltose, são adicionados ao meio de reação, estas enzimas catalisam a síntese de oligossacarídeos (MONCHOIS; WILLEMOT; MONSAN, 1999).

Diferentes tipos de glicanos são sintetizados dependendo da enzima produzida pelas cepas bacterianas. Estas moléculas podem variar segundo os tipos e as proporções de ligações glicosídicas que unem os resíduos de D-glicose e segundo a massa molecular. Em geral, elas apresentam uma cadeia principal linear, como os dextranos, os mutanos e os reuteranos que possuem alta proporção de ligação glicosídica $\alpha(1,6)$, $\alpha(1,3)$ e $\alpha(1,4)$ respectivamente, além dos alternanos, que possuem ligações glicosídicas $\alpha(1,3)$ e $\alpha(1,6)$ em proporções semelhantes. Além disso, podem apresentar diferentes ligações glicosídicas de ramificação como $\alpha(1,2)$, $\alpha(1,3)$, $\alpha(1,4)$ e $\alpha(1,6)$ e em diferentes proporções (MONCHOIS; WILLEMOT; MONSAN, 1999).

Outro grupo de enzimas pertencente à das glicosil hidrolases (família 68) e do grupo E.C.2.4.x.y. são o das frutossiltransferases (FTF) ou frutano-sacarases, que também utilizam a sacarose para a formação de polímeros, neste caso porém, estas moléculas são constituídas de resíduos de D-frutose (frutanos). Uma particularidade interessante é que a rafinose (galactose-glicose-frutose) não é substrato para as GTG, somente para as FTF. Portanto, glicanos não são polimerizados a partir deste trissacarídeo, apenas frutanos (CAZY, 2013; MALIK et al., 2009).

As glicosil hidrolases são enzimas que sintetizam apenas um tipo específico de polissacarídeo, e, por serem altamente específicas são frequentemente chamadas pelo nome do polímero produzido precedido do termo sacarase, como as

dextrano-sacarases (E.C.2.4.1.5), as alternano-sacarases (E.C.2.4.1.140), as levano-sacarases (E.C.2.4.1.10) e as inulo-sacarases (E.C.2.4.1.9) que produzem dextrano, alternano e os frutanos levano e inulina, respectivamente (CAZY, 2013).

1.4.1 Gene *gtf*

Os estudos de isolamento e caracterização do gene codificador das glicosiltransferases se iniciaram na década de 80 com o objetivo de desenvolver vacinas contra a cárie dental. Estas enzimas produzidas por bactérias do gênero *Streptococcus* como as de *Streptococcus mutans* e *sobrinus* desempenham um importante papel no processo de cariogênese dental, uma vez que os glicanos produzidos pelas mesmas protegem e aumentam a adesão para a colonização destas bactérias cariogênicas (MONCHOIS; WILLEMOT; MONSAN, 1999).

Desta forma, há mais de três décadas estes genes vem sendo estudados e já foram isolados e sequenciados mais de 30 genes *gtf*, sendo observado que as GTF de BAL estão intimamente relacionadas e compartilham algumas regiões em comum, constituindo 4 regiões: (i) uma extremidade N-terminal com um peptídeo sinal de 32 a 34 aminoácidos, que sinaliza o destino destas enzimas para o exterior da célula, seguido de (ii) uma parte altamente variável de 123 a 129 aa, (iii) uma região central altamente conservada de aproximadamente 1000 aa, que é o sítio catalítico da enzima, na qual a sacarose é clivada e (iv) uma extremidade C-terminal de cerca de 500 aa, composta de uma série de repetições em tandem, constituindo a região de ligação do glicano em formação (KRALJ et al., 2005).

1.4.2 Mecanismo de ação catalítica

Duas reações são de fundamental importância na biossíntese dos glicanos: a formação da cadeia principal a introdução de ramificações nesta cadeia. Em ambos os tipos de reação, a energia necessária para a união dos resíduos de D-glicopiranosil advém da quebra da sacarose (MONCHOIS; WILLEMOT; MONSAN, 1999).

O modo de ação das dextrano-sacarases foi estudado por muitos anos e diversos mecanismos já foram propostos. Entretanto, Robyt, Kimble e Walseth

(1974) demonstraram que o dextrano em formação se mantinha ligado à enzima por ligações covalentes e que a biossíntese ocorria pela extremidade redutora. Portanto o mecanismo de biossíntese será explicado utilizando o esquema representado pela Figura 2:

A sacarose presente no meio extracelular induz uma mudança na conformação proteica da enzima, ativando seu sítio catalítico, que é composto por dois domínios (I). Numa primeira etapa os dois domínios fazem um ataque nucleofílico simultâneo à moléculas de sacarose, formando dois grupos glicosil que permanecem ligados ao carbono 1 através de ligações covalentes (II). Na etapa seguinte, a hidroxila do carbono 6 de um dos radicais glicosil, faz um ataque nucleofílico ao carbono 1 do radical ligado no outro domínio, formando uma ligação $\alpha(1,6)$ (III). O primeiro domínio é então liberado para atacar mais uma molécula de sacarose, formando um novo grupo glicosil (IV). Em seguida, a hidroxila do carbono 6 do novo grupo glicosil formado, faz um ataque ao carbono 1 do radical isomaltosil formado na etapa anterior (V). Na presença de sacarose o mecanismo se repete continuamente com os dois domínios catalíticos se alternando em formar complexos covalentes com a glicose e com a cadeia de dextrano em formação (ROBYT; KIMBLE; WALSETH, 1974).

A liberação do dextrano do sítio catalítico acontece quando este é deslocado através da ação de aceptores como glicose ou frutose, que mesmo não sendo aceptores eficientes, em grandes concentrações são capazes de atuar nos domínios enzimáticos, de tal forma que uma de suas hidroxilas faz um ataque nucleofílico ao carbono 1 do radical dextranosil (MONCHOIS; WILLEMOT; MONSAN, 1999; ROBYT; KIMBLE; WALSETH, 1974).

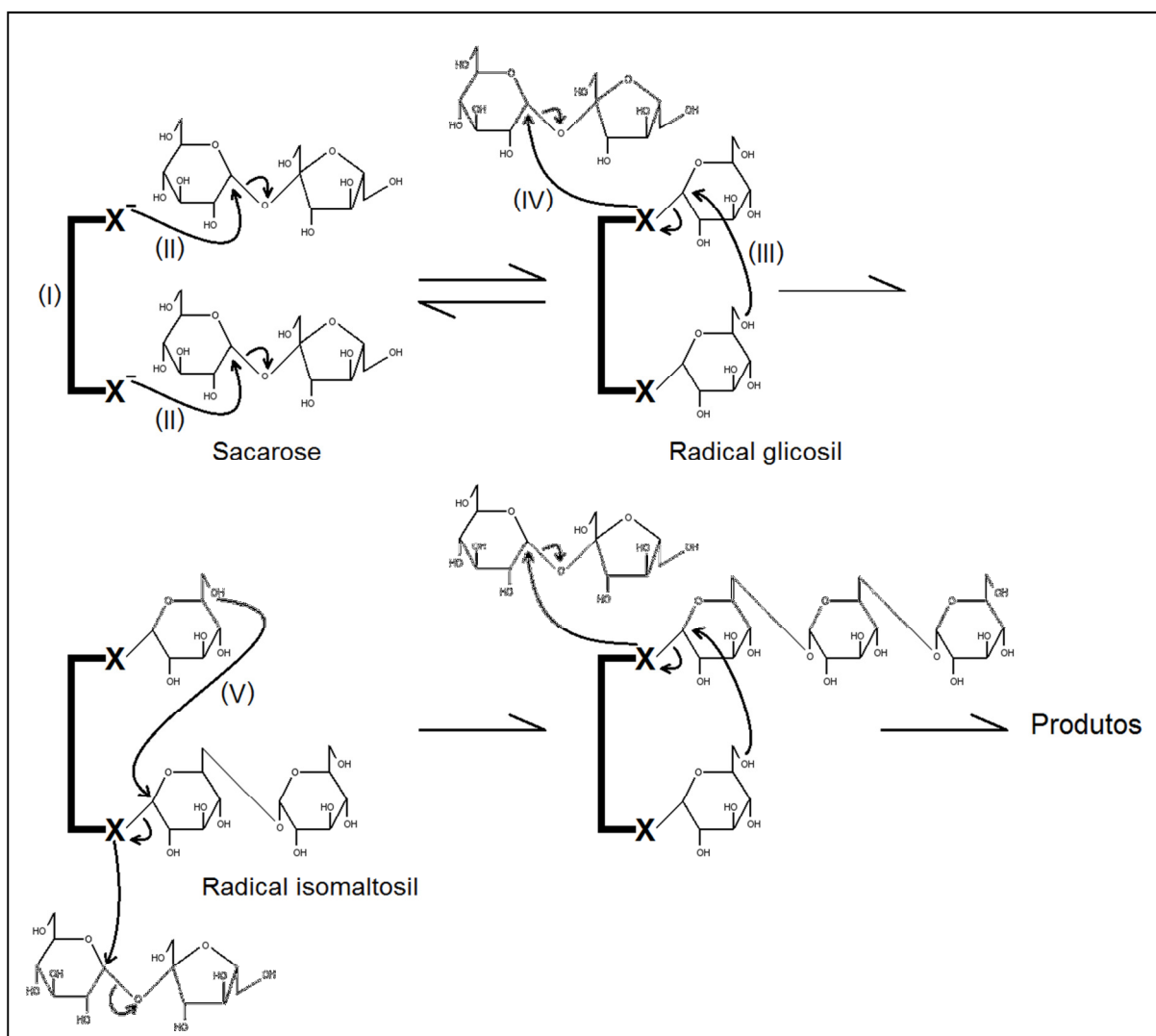


Figura 3 - Representação do mecanismo de ação das dextransucrases. Letra “X” indica os dois domínios do sítio catalítico da enzima. Fonte: Adaptado de Robyt, Kimble e Walseth (1974).

Este mesmo mecanismo de ação, ainda explica a formação de oligodextranos quando são adicionados no meio de reação aceptores eficientes como a maltose, isomaltose, celobiose, gentiobiose, lactose, dentre outros. Estes dissacarídeos, mesmo em concentrações baixas, são capazes de deslocar rapidamente a molécula de dextrano em crescimento, não permitindo que polissacarídeos de alta massa molecular sejam polimerizados (CÔTÉ, 2009; MONCHOIS; WILLEMOT; MONSAN, 1999; PATEL; MAJUMDER; GOYAL, 2011).

Já as ramificações são formadas quando um dextrano faz o papel de molécula aceptora. Portanto, ligações $\alpha(1,4)$, $\alpha(1,3)$ ou $\alpha(1,2)$ são formadas quando uma das hidroxilas do carbono 4, 3 ou 2 de um dextrano já formado desloca um

radical dextranosil ligado à enzima através de um ataque nucleofílico ao seu carbono 1. A ligação covalente com a enzima é então rompida e as cadeias principais de dois dextranos são unidas por uma das três ligações glicosídicas possíveis, formando a ramificação (ROBYT; TANIGUCHI, 1976).

1.5 Modulação do sistema imune por polissacarídeos

Com os avanços no entendimento de como funciona a sinalização celular, estratégias para manipular estas vias de comunicação têm sido desenvolvidas com o objetivo de influenciar as respostas imunológicas nos organismos. Muitos compostos apresentam a capacidade de interagir com o sistema imune, regulando negativa ou positivamente aspectos específicos deste sistema no hospedeiro. Estes compostos são classificados como modificadores da resposta biológica (MRB) ou imunomoduladores. Muitas moléculas apresentam a capacidade de serem MRB como polissacarídeos, proteínas, peptídeos, glicoproteínas, lipopolissacarídeos, derivados de lipídios dentre outros (TZIANABOS, 2000).

Em geral os polissacarídeos são considerados antígenos independentes de células T, os quais não induzem respostas imunes mediadas por células, promovendo uma resposta humoral com indução de imunoglobulinas de baixa afinidade como IgA e IgM. Entretanto, alguns polissacarídeos de origem microbiana também já foram descritos como indutores da atividade de células T e de células apresentadoras de antígenos como os monócitos e os macrófagos. Diversos resultados ainda são conflitantes no que diz respeito à imunomodulação de polissacarídeos uma vez que não existem muitos trabalhos que abordem os mecanismos de imunomodulação e a relação estrutura-função destes biopolímeros (PORPORATTO; BIANCO; CORREA, 2006; TZIANABOS, 2000).

Muitos polissacarídeos são descritos por apresentarem propriedades imunomoduladoras. Alguns exemplos específicos merecem ser citados por terem sido os primeiros que tiveram estas propriedades comprovadas (TZIANABOS, 2000).

Polissacarídeos zwitterônicos presentes na superfície celular de algumas bactérias patogênicas como *Bacteroides fragilis*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae* induzem *in vitro* uma forte resposta de células T CD4⁺ dependente de MHC classe II. Estes polímeros apresentam em sua cadeia

polimérica alguns substituintes de carga positiva (como grupos amina) e de carga negativa (como grupos fosfato e carboxila) que são descritos como os principais responsáveis pelo seu efeito imunomodulador (KALKA-MOLL et al., 2002).

Glicanos $\beta(1,3)$ encontrados abundantemente na parede celular de bactérias, leveduras e fungos são considerados potentes imunomoduladores com efeitos tanto na imunidade inata quanto na adaptativa. Estes homopolissacarídeos são reconhecidos pelos receptores dectina-1 expressos por macrófagos, neutrófilos e células dendríticas, desencadeando uma resposta imune inata com liberação de citocinas como IL-12, IL-6, TNF- α e IL-10. Por outro lado, os glicanos $\beta(1,3)$ também são polissacarídeos zwitterônicos e desta forma possuem a capacidade de desencadear resposta imune adaptativa pela ativação de células T CD4⁺ (CHAN; CHAN; SZE, 2009).

Mananas que são polímeros constituídos por resíduos de D-manose apresentam atividade imunossupressora. De acordo com Garner et al. (1990), mananas produzidas por *Candida albicans* induzem a produção de citocinas como IL-4, IL-12p40, IL-10 e IFN- γ que estão envolvidas no processo de regulação negativa de células T CD8⁺ e que por sua vez promovem a supressão da resposta imunológica.

2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

Os exopolissacarídeos bacterianos são produzidos tanto por *Archebacteria* quanto por *Eubacteria* com a finalidade de proporcionar aos organismos produtores aderência e proteção contra ambientes adversos. São classificados como homo ou heteropolissacarídeos, a biossíntese dos homopolímeros envolve apenas um gene enquanto a dos heteropolímeros envolve vários genes.

Os grãos de Kefir constituem uma fonte em potencial de microrganismos produtores de exopolissacarídeos e são utilizados para a produção de Kefir há séculos que, por sua vez, é considerado como o iogurte do século XXI devido aos benefícios proporcionados à saúde humana pela ingestão do mesmo. Apresentam uma grande diversidade microbiana, destacando a presença de bactérias do gênero *Lactobacillus*, que são descritas como o principal gênero responsável pela formação da matriz exopolissacarídica em grãos de Kefir cultivados em leite e em água com açúcar.

Um grande volume de pesquisas tem sido realizado nos últimos anos sobre exopolissacarídeos produzidos por bactérias do ácido láctico, devido às suas inúmeras propriedades físico-químicas e biológicas e ainda pelo fato dos mesmos serem produzidos por organismos reconhecidamente seguros para a saúde (*Generally Recognized As Safe*). Dentre suas aplicações, se destaca a capacidade que alguns exopolissacarídeos produzidos por bactérias e leveduras apresentam de modular a resposta imune.

Diante disto, se faz de extrema importância a triagem de microrganismos produtores de exopolissacarídeo bem como a caracterização estrutural destas biopolímeros para a compreensão e otimização dos mecanismos responsáveis pelas suas propriedades.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Caracterizar as estruturas dos exopolissacarídeos produzidos por lactobacilos isolados de grãos de Kefir, realizar a identificação molecular do gene das enzimas responsáveis pela formação destes biopolímeros e avaliar a capacidade imunomodulatória dos mesmos.

3.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos foram: (A) identificar os lactobacilos produtores de EPS em meio de cultivo com diferentes tipos de carboidrato; (B) amplificar por PCR e sequenciar a região correspondente ao sítio catalítico nos genes *gtf* dos isolados produtores de EPS para caracterização do gene das glicosiltransferases; (C) determinar a pureza e a estrutura polissacarídica dos EPS extraídos; (D) determinar o efeito da ingestão dos EPS sobre a capacidade de produção de imunoglobulinas do tipo A (IgA) e sobre a expressão relativa do mRNA das citocinas IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p40, IL-17, IFN- γ , TGF- β e TNF- α no intestino delgado de camundongos convencionais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Procedência dos lactobacilos

Foram utilizados para a realização do presente trabalho 52 bactérias do gênero *Lactobacillus*, que foram previamente isoladas e identificadas por Zanirati et al. (2012). Estes isolados são provenientes de grãos de Kefir cultivados em água com açúcar mascavo ou em leite, que foram coletados de diferentes localidades brasileiras. Dos 52 lactobacilos, 7 foram isolados de Kefir de água de Belo Horizonte/MG, 6 de Kefir de água de Curitiba/PR, 16 de Kefir de água de Salvador/BA, 7 de Kefir de água de Viçosa/MG, 9 de Kefir de leite de Curitiba/PR, 2 de Kefir de leite de Divinópolis/MG e 5 de Kefir de leite de Salvador/BA.

4.2 Triagem dos isolados produtores de exopolissacarídeo

Para a realização do teste de produção de EPS, os isolados, que estavam estocados a -80°C em caldo De Man, Rogosa e Sharpe (MRS, Difco) com glicerol (30% v/v), foram reativados através de dois repiques em caldo MRS a partir de um inóculo de 2% (v/v). O crescimento foi realizado em anaerobiose por 18h a 37°C.

Após a reativação, os lactobacilos foram plaqueados em triplicata por estriamento composto em ágar MRS contendo 2% de glicose segundo De Man, Rogosa e Sharpe (1968) e em 3 diferentes tipos de ágar MRS modificado: no primeiro meio, denominado sMRS, a glicose foi substituída por 8% de sacarose (Sigma-Aldrich) e nos outros dois meios a glicose foi substituída por 5% de rafinose (Sigma-Aldrich) e 5% de lactose (Fluka Analytical), os quais foram denominados rMRS e IMRS respectivamente. As placas foram incubadas em anaerobiose por 48 h a 37°C.

4.3 Procedimentos moleculares

4.3.1 Extração do DNA genômico

O DNA foi extraído dos isolados crescidos por 18 horas em 10 mL de meio MRS usando o *kit Wizard Genomic DNA purification* (Promega). No entanto, as bactérias foram submetidas a um pré-tratamento antes da extração, no qual as células bacterianas foram separadas do meio de cultura por centrifugação, lavadas com 1 mL de água deionizada e ressuspensas em 1 mL de LiCl 5M sob agitação por uma hora à temperatura ambiente. Depois disto, foi realizada outra centrifugação, seguida do descarte do sobrenadante, lavagem com 1 mL de água deionizada, ressuspensão em tampão TES (50 mM de Tris-HCl pH 8,0, 10 mM de EDTA e 25 mM de sacarose) contendo 10 mg/mL de lisozima (Sigma-Aldrich) e incubação por uma hora a 37°C. Em seguida o DNA extraído foi quantificado por espectrofotometria (Nanodrop 1000, Thermo Fisher Scientific) e resolvido em gel de agarose a 1% contendo brometo de etídio para a visualização de bandas sob luz ultravioleta (LUV).

4.3.2 Caracterização molecular do sítio catalítico do gene *gtf*

A amplificação da região codificadora do sítio catalítico nos genes *gtf* dos lactobacilos produtores de EPS foi realizada utilizando iniciadores degenerados elaborados por Kralj et al. (2002) com base na homologia de sequências da região codificadora do sítio catalítico de diferentes genes *gtf* de BAL. O iniciador *forward* foi denominado DegFor (5'-GAYAAAYWSNAAYCCNRYNGTNC-3') e o *reverse* DegRev (5'-ADRTCNC CRTARTANAVNYKNG-3'). A PCR foi então realizada com aproximadamente 100 ng de DNA genômico, 200 µM de dNTP, 4,5 mM de MgCl₂, 3 µM de cada iniciador, 0,075 U/µL unidades de *Taq* DNA polimerase (Promega) e tampão da reação (pH 8,5). O programa utilizado no termociclador (Applied Biosystems) para a reação foi: 1 ciclo de 95°C por 5 minutos, 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto e por último 1 ciclo de 72°C por 2 minutos.

Em seguida, os produtos de PCR foram resolvidos em gel de agarose (1%) e os *amplicons* dos isolados que apresentaram uma banda bem definida, sem presença de bandas inespecíficas, foram escolhidos para serem sequenciados. Os *amplicons* selecionados foram purificados com etanol 70% e EDTA 125 mM, quantificados por espectrofotometria (Nanodrop 1000, Thermo Fisher Scientific) e suas sequências de nucleotídeo determinadas pelo método de Sanger et al. (1977) utilizando o sequenciador automático ABI 3130 *Genetic Analyser* (Applied Biosystem) do Laboratório de Genética do Departamento de Zootecnia (Escola de Veterinária/UFMG).

4.3.3 (GTG)₅-PCR

Esta técnica de DNA *fingerprinting* foi usada para distinção das linhagens dos isolados produtores de EPS, identificados como sendo da mesma espécie de lactobacilos e que foram provenientes de uma mesma amostra de Kefir. As condições da PCR foram as seguintes: 100 ng de DNA genômico, 200 µM de dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, 1 µM do oligonucleotídeo 5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3', 0,125 U/µL *Taq* DNA polimerase (Promega), 0,001% de gelatina e tampão de reação (pH 8,5). Por fim, os ciclos da amplificação foram efetuados da seguinte forma: 1 ciclo de 94°C por 5 minutos, 30 ciclos subsequentes de 94°C por 1 minuto, 52°C por 1 minuto e 72°C por 3 minutos e finalmente 1 ciclo de 72°C por 10 minutos.

Para a visualização dos padrões de banda das diferentes regiões amplificadas no genoma, os produtos da PCR foram resolvidos em gel de poliacrilamida (6%) e corados com nitrato de prata.

4.4 Produção e extração dos exopolissacarídeos

Os lactobacilos selecionados foram reativados em caldo MRS e procedeu-se a contagem de células viáveis por meio de diluição decimal seriada (10⁻¹ até 10⁻⁷) em salina estéril e plaqueamento das diluições 10⁻⁵, 10⁻⁶ e 10⁻⁷ em duplicata em ágar MRS, com incubação a 37°C por 48 horas em anaerobiose. Logo em seguida, as mesmas culturas reativadas foram utilizadas para a produção de EPS, transferindo-as (através de inóculo de 1,5% v/v) para dois frascos Erlenmeyer contendo 200 mL

de caldo sMRS e incubados em anaerobiose a 37°C por 48h. Decorrido este tempo, as células foram retiradas por centrifugação. Os EPS, presentes no sobrenadante, foram extraídos por precipitação em 2 volumes de etanol (Synth, 95% v/v), acondicionamento a -20°C por 12 horas e centrifugação para descarte do meio de cultura.

Para as análises de caracterização estrutural, os *pellets* correspondentes a 200 mL de cultura foram ressuspensos em água Mili-Q, seguido de precipitação em etanol e centrifugação por mais duas vezes. Por fim, os EPS foram ressuspensos em água Mili-Q pela terceira vez e liofilizados (Liotop K105).

Para determinar a quantidade de EPS produzido por cada isolado, os *pellets* dos outros 200 mL de cultura foram secados a 37°C por 96 horas, sua massa foi determinada e os resultados foram expressos em gramas de EPS produzido por litro de caldo sMRS.

4.5 Caracterização estrutural dos exopolissacarídeos

4.5.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Os extratos de EPS liofilizados foram solubilizados em água deuterada (D₂O) e espectros unidirecionais de ¹H (hidrogênio de massa atômica 1) foram adquiridos a 70°C em duplicata, utilizando um espectrômetro (Bruker Avancer DRX) na frequência base de 400 MHz. Este equipamento pertence ao Laboratório de Ressonância Magnética de Alta Resolução do Departamento de Química (LAREMAR/ICEX/UFMG).

Os deslocamentos químicos (δ) expressos em partes por milhão (ppm) foram determinados utilizando acetona ($\delta = 2,225$) como padrão interno e a integração dos sinais foi realizada para determinação da intensidade (área) das ligações.

4.5.2 Cromatografia líquida de alta eficiência

Os dois tipos de análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo (Shimadzu) composto por degaseificador (DGU-20A5), bomba (LC-20AT), módulo de comunicação (CBM-20A), forno de coluna (CTO-20A) e detector de índice de

refração (RID-10A) do Laboratório de Apoio da Pós-Graduação, do Departamento de Microbiologia (ICB/UFMG).

4.5.2.1 Determinação da constituição de monossacarídeos nos exopolissacarídeos

Os EPS liofilizados (cerca de 3 mg) foram submetidos à hidrólise ácida por adição de 750 µL de solução de HClO₄ a 1,75 M e incubadas a 80°C em banho seco (ThermoStat Plus, Eppendorf). Cada amostra foi hidrolisada em duplicata e em dois tempos diferentes: 2 e 16 h. Para interrupção da hidrólise, o ácido foi neutralizado pela adição de 250 µL de solução de KOH a 5 M. O precipitado correspondente ao perclorato de potássio formado foi removido por centrifugação e o sobrenadante foi filtrado em membrana 0,45 µm antes de ser injetado no cromatógrafo.

Foram analisados os extratos hidrolisados bem como padrões de glicose, frutose, arabinose e glicerol (Sigma-Aldrich). A composição de monossacarídeos foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando uma coluna de troca iônica (Supelcogel C-610H). A fase móvel foi H₂SO₄ a 50 mM com fluxo de 0,6 mL/min.

4.5.2.2 Determinação da massa molecular

Foram utilizados além dos EPS liofilizados (cerca de 1 mg), 4 padrões de dextranos de peso molecular conhecido. Padrão 1: Dextrano Sulfato de Sódio (MP Biomedical) de 36-50 KDa; Padrão 2 e 3: Dextranos (Fluka Analytical) de 150 KDa e 410 KDa; Padrão 4: Dextrano sulfato (Sigma-Aldrich) de 500 KDa. Foi construída uma curva de calibração com os tempos de retenção (Rt) destes padrões e seus pesos moleculares.

Para esta análise a coluna utilizada foi de gel filtração (Shodex KW-803) e a fase móvel foi NaNO₃ a 0,1 M com fluxo de 1 mL/min. Amostras e padrões foram solubilizados em solução de NaNO₃ a 0,1 M e filtradas em membrana 0,45 µm antes das injeções no cromatógrafo.

4.6 Pureza dos extratos de exopolissacarídeos

4.6.1 Quantificação de proteínas totais

A verificação de possíveis contaminantes proteicos nos EPS extraídos foi realizada com o reagente Coomassie Blue Brilhante G-250, utilizando um kit de quantificação de proteínas totais (Sigma-Aldrich), que é baseado no método descrito por Bradford (1976), o qual apresenta sensibilidade de 1 a 100 µg de proteína.

Para a construção da curva de calibração, foi utilizado como padrão albumina humana, nas concentrações de 25, 50, 100, 150, 210 e 300 µg/mL. As leituras foram realizadas a 595 nm em espectrofotômetro (Apel PD-303 UV).

4.6.2 Identificação de monossacarídeos residuais

Os extratos foram ressuspensos em água Mili-Q e analisados pelo mesmo tipo de cromatografia de troca iônica descrita nesta seção (item 4.5.2.1).

4.7 Avaliação da capacidade imunomodulatória dos exopolissacarídeos

4.7.1 Animais

Foram utilizados camundongos convencionais (CV) da linhagem Swiss NIH, com 23 a 27 dias de idade, de ambos os sexos. Os animais foram provenientes de matrizes de camundongos isentos de germes (GF) que foram convencionalizadas pela administração de diluições fecais de camundongos CV e propagadas em condições de manejo de colônias *outbred*.

Os animais foram mantidos em mini-isoladores Alesco (ALE.MIL.01.03) no biotério NB2 do Departamento de Microbiologia ICB/UFMG com ciclo diurno/noturno de 12 horas, onde receberam ração comercial (Nuvilab CR1, Nuvital Nutriente) e água autoclavada *ad libitum*.

Esta dissertação compõe um subprojeto de um projeto mais abrangente intitulado: "Propriedades probióticas de Kefir preparado com leite de vaca, leite de soja ou água com açúcar mascavo de microrganismos isolados de grãos de Kefir e

de substâncias produzidas por esses isolados” que foi encaminhado ao Comitê de Ética para Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA/UFMG) e aprovado com a referência 96/2011 em 11/05/2011.

4.7.2 Tratamentos

Os extratos de EPS foram solubilizados em salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7,4). Os camundongos do grupo teste (21 animais) receberam por gavagem 100 mg de dextrano / Kg de peso corporal / dia (cerca de 100 µL) durante 7 dias. Os dextransos 1P3, 10P e 10P2, que não apresentaram problemas de sequenciamento do gene *gtf* ou de pureza dos extratos, foram administrados em 7 camundongos, compondo três grupos teste. Por sua vez, os camundongos do grupo controle (6 animais) receberam por gavagem o mesmo volume de salina (pH 7,4). No sétimo dia todos os animais foram eutanasiados.

4.7.3 Determinação do efeito dos exopolissacarídeos na produção de IgA

O intestino delgado dos animais foi dividido em três partes de mesmo tamanho correspondentes ao duodeno, jejuno e íleo. No terço final do intestino (íleo) foi coletado um fragmento de aproximadamente 5 cm que foi aberto longitudinalmente e esticado sobre papel de filtro. Esse material foi pré-fixado em solução de Bouin, e enrolado em espiral, com a mucosa voltada para dentro, de modo a formar um *swiss roll* (ARANTES e NOGUEIRA, 1997).

O material foi rotineiramente processado para inclusão em parafina, e cortes de secções histológicas de 4 µm de espessura foram obtidos. As áreas correspondentes à presença de imunoglobulinas do tipo A (IgA) foram marcadas em cortes histológicos através de ensaio de imunofluorescência direta. No primeiro dia de preparo para marcação com IgA, as lâminas contendo os cortes histológicos previamente obtidos foram incubadas a 60°C por 30 minutos, desparafinadas através de três imersões por 30 minutos em xilol, hidratadas 3 vezes em soluções de etanol 90, 80 e 70% por 10 minutos, lavadas em 3 banhos de 5 minutos com PBS diluído em 1:10, incubadas em câmara úmida com solução de soro albumina a 2% por 30 minutos e lavadas novamente por 3 vezes em banho de 5 minutos com PBS

diluído. No segundo dia foi adicionado sobre as lâminas secas, ao abrigo da luz e por 30 minutos, o anticorpo anti-IgA de camundongo conjugado com isotiocianato de fluoresceína (Sigma-Aldrich) na diluição 1:100 em PBS contendo 1% de soro albumina. Em seguida foi realizado uma incubação em câmara úmida a 37°C durante 2 horas, três lavagens de 5 minutos com PBS diluído e 30 µL de Hoechst diluído em 1:10 com PBS foi adicionado em cada lâmina. Foi realizada mais uma incubação em câmara úmida a temperatura ambiente por 10 minutos e outras duas lavagens de 5 minutos com PBS diluído. Após isto, as lâminas foram secas e lâminulas contendo uma gota do meio de montagem Prolong Gold (Invitrogen) foram gentilmente colocadas sobre os cortes histológicos. Por fim, procedeu-se a observação das lâminas em microscópio (Olympus BX 51) com luz fluorescente. Em média, 6 campos em objetiva de 10x foram suficientes para percorrer cada lâmina. As imagens foram capturadas utilizando uma microcâmera (JVC TK-1270) acoplada ao microscópio e as imagens foram importadas para o analisador de imagens KS 300 (*software image analyzer*, Kontron Elektronik GmbH) do Laboratório de Morfometria do Departamento de Patologia geral (ICB/UFMG). O software calculou a área marcada correspondente à IgA (área fluorescente) e a área total de tecido em cada imagem. Foram expressos graficamente as médias e os desvios-padrão da proporção (em %) da área marcada de IgA sobre a área total de íleo.

4.7.4 Extração de RNA total e produção de cDNA a partir do intestino delgado dos animais

Após a eutanásia dos animais, pedaços de 1-2 cm de comprimento das porções inicial, medial e distal do intestino delgado foram coletados e armazenados em RNA Later (Ambion) a -20°C. Os 3 pedaços de tecido foram triturados juntos e a extração de RNA total foi realizada pelo reagente Trizol (Sigma-Aldrich) de acordo com as recomendações do fabricante.

O RNA total extraído foi quantificado por espectrofotometria (Nanodrop 1000, Thermo Fisher Scientific) e submetido à eletroforese em gel de agarose (1%). Amostras com quantificação inferior a 200 ng/µL foram excluídas, foi avaliada a pureza dos RNA extraídos pela relação das absorvâncias em 260 e 280 nm (A₂₆₀/A₂₈₀) e valores entre 1,7 a 2,1 foram os limites aceitáveis. Foi avaliada

também a relação da intensidade das bandas correspondentes ao rRNA 28S e ao rRNA 18S que deve ser de 2:1.

Uma alíquota correspondente a 10 µg de RNA foi tratada com DNase (Turbo DNase kit, Life Technologies) para remoção do DNA genômico. Em seguida o cDNA foi gerado a partir do RNA total purificado por reação de transcrição reversa (RT-PCR) utilizando o *High Capacity kit* (Life Technologies) seguindo recomendações do fabricante. Uma alíquota correspondente a 1 µg de RNA foi utilizada para cada reação de RT-PCR. O RNA total e o cDNA foram armazenados a -20 °C.

4.7.5 Quantificação relativa da expressão de citocinas no intestino delgado dos animais

A quantificação relativa da expressão de citocinas no intestino delgado dos animais foi realizada por PCR quantitativo em tempo real (qPCR) associadas com reações de transcrição reversa (RT-qPCR). As amostras de cDNA obtidas do RNA total referente às 3 porções do intestino delgado foram utilizadas para quantificação relativa da expressão gênica das seguintes citocinas: interleucinas (IL) IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p40, IL-17, interferon gama (IFN-γ), fator de transformação do crescimento beta (TGF-β) e fator de necrose tumoral alfa (TNF-α). A padronização das condições da RT-qPCR (Tabela 1) como concentração dos iniciadores, eficiência das reações, curva de dissociação e temperatura de anelamento (60 °C) foram realizadas por Steinberg et al. (2012).

Para as reações de RT-qPCR foi utilizado cDNA obtido dos RNA extraído dos tecidos intestinais, iniciadores descritos por Giulietti et al. (2001) cujas sequências e características estão descritas na Tabela 1 e MasterMix contendo o fluoróforo SYBR Green (Life Technologies). O programa de ciclagem usado foi: 1 ciclo de 50 °C por 2 minutos e 95 °C por 10 minutos; e 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. Para a curva de dissociação o programa de ciclagem foi: 1 ciclo de 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 15 segundos e 95 °C por 15 segundos. As reações foram realizadas em placas óticas de 96 poços com selante adesivo ótico (MicroAmp, Applied Biosystems) utilizando a plataforma ABI 7900 Real Time PCR (Applied Biosystems) pertencente ao Departamento de Biologia Geral (ICB/UFMG).

Tabela 1 - Padronização das condições da RT-qPCR para quantificação relativa da expressão gênica das citocinas no intestino delgado de camundongos.

Genes	Sequência dos iniciadores (primers)	Concentração de primer (μ M)	Eficiência (%)	Tamanho do (amplicon)
Gapdh	f TCACCACCATGGAGAAGGC	0,5	92,1	168 bp
	r GCTAAGCAGTTGGTGGTGCA			
Actb	f AGAGGGAAATCGTGCGTGAC	0,5	90,1	138 bp
	r CAATAGTGATGACCTGGCCGT			
IL-5	f AGCACAGTGGTCAAAGAGACCTT	0,5	102,4	117 bp
	r TCCAATGCATAGCTGGTGATTT			
IL-6	f GAGGATACCACTCCCAACAGACC	0,3	99,8	141 bp
	r AAGTGCATCATCGTTGTTCATACA			
IL-10	f GGTTGCCAAGCCTTATCGGA	0,75	80,0 ^a	191 bp
	r ACCTGCTCCACTGCCTTGCT			
IL-12p40	f GGAAGCACGGCAGCAGAATA	1,0	104,7	180 bp
	r AACTTGAGGGAGAAGTAGGAATGG			
IL-17	f GCTCCAGAAGGCCCTCAGA	0,75	91,5	142 bp
	r AGCTTTCCCTCCGCATTGA			
IFN- γ	f TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA	0,75	103,9	92 bp
	r TGGCTCTGCAGGATTTTCATG			
TGF- β	f TGACGTCACTGGAGTTGTACGG	0,5	88,0 ^a	170 bp
	r GGTTTCATGTCATGGATGGTGC			
TNF- α	f CATCTTCTCAAATTCGAGTGACAA	0,75	83,0 ^a	175 bp
	r TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC			

^a : reações com eficiência fora da faixa descrita por Livak e Shimittgen (2001) de 90-110%. f/r: iniciadores *forward* e *reverse* respectivamente.

Para a obtenção do nível relativo de expressão (NRE) foi empregado a fórmula (Equação 1) descrita por Hellemans et al. (2007), que permite o emprego de mais de um gene referência para a normalização dos dados e a utilização do valor real de eficiência de amplificação de cada par de iniciador. Os dados de expressão gênica foram normalizados através dos resultados das amplificações dos cDNA correspondentes aos genes de referência que codificam a β -actina (Actb) e a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (Gapdh). A média aritmética dos dados de expressão do grupo salina foi utilizada como calibrador para cada gene, e, portanto, seu nível de expressão foi definido como uma vez. Os resultados foram expressos

graficamente usando a média e o desvio-padrão dos valores de NRE dos mRNA para cada citocina.

$$NRE_x = \frac{[E_x] \Delta Cq_x (Cq_x \text{ calibrador} - Cq_x \text{ amostra teste})}{\sqrt[n]{\prod [E_{ref}] \Delta Cq_{ref} (Cq_{ref} \text{ calibrador} - Cq_{ref} \text{ amostra teste})}} \quad \text{Equação 1}$$

Na equação acima, “NRE” é igual ao nível relativo de expressão, “x” representa o nível relativo de expressão de um gene hipotético, “E” a eficiência da RT-qPCR para cada gene, “Cq” o ciclo de quantificação, “n” o número de genes de referência (que no caso são 2 genes) e “Π” a média geométrica.

4.7.6 Análises estatísticas

De acordo com RAZALI e WAH (2011) quando o tamanho da amostra estudada é pequeno (n inferior a 30), os testes de normalidade não se tornam confiáveis. Por isso a diferença dos valores referentes às medidas de IgA e citocinas foram comparadas usando o teste não-paramétrico de Mann-Whitney com nível de significância de 95% ($p \leq 0,05$) utilizando o *software* SPSS 13.0 (SPSS Inc.).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Triagem dos isolados de lactobacilos produtores de exopolissacarídeo

Dos 52 lactobacilos cultivados em ágar sMRS contendo sacarose, 16 (30,2%) foram considerados produtores de EPS, sendo três *L. casei*, três *L. kefiranofaciens*, dois *L. kefiri*, um *L. mali*, um *L. parafarraginis*, três *L. perolens* e três *L. satsumensis*. Em todas as amostras foi encontrado pelo menos um isolado produtor, com exceção dos grãos de Kefir de leite de Salvador/BA (Tabela 2).

Tabela 2 - Procedência e identificação dos lactobacilos produtores de EPS isolados de Kefir de água e Kefir de leite.

Localidade	Kefir de água		Kefir de leite	
	ID	Espécie	ID	Espécie
Salvador (BA)	9P2	<i>L. casei</i>		
	10P	<i>L. satsumensis</i>		
	10P2	<i>L. satsumensis</i>		Sem produtores
	11P	<i>L. perolens</i>		
	12P	<i>L. parafarraginis</i>		
Curitiba (PR)	17P2	<i>L. perolens</i>	1P	<i>L. kefiranofaciens</i>
	18P	<i>L. satsumensis</i>	1P3	<i>L. kefiranofaciens</i>
	19P	<i>L. perolens</i>	3P3	<i>L. kefiri</i>
Divinópolis (MG)	n/a		8U	<i>L. kefiranofaciens</i>
			3U2	<i>L. kefiri</i>
Belo Horizonte (MG)	15U2	<i>L. casei</i>		
	16U	<i>L. casei</i>	n/a	
Viçosa (MG)	19U	<i>L. mali</i>	n/a	

ID: código de identificação de cada isolado de *Lactobacillus* por Zanirati et al. (2012); n/a: não se aplica (amostras de grãos de Kefir inexistentes no trabalho).

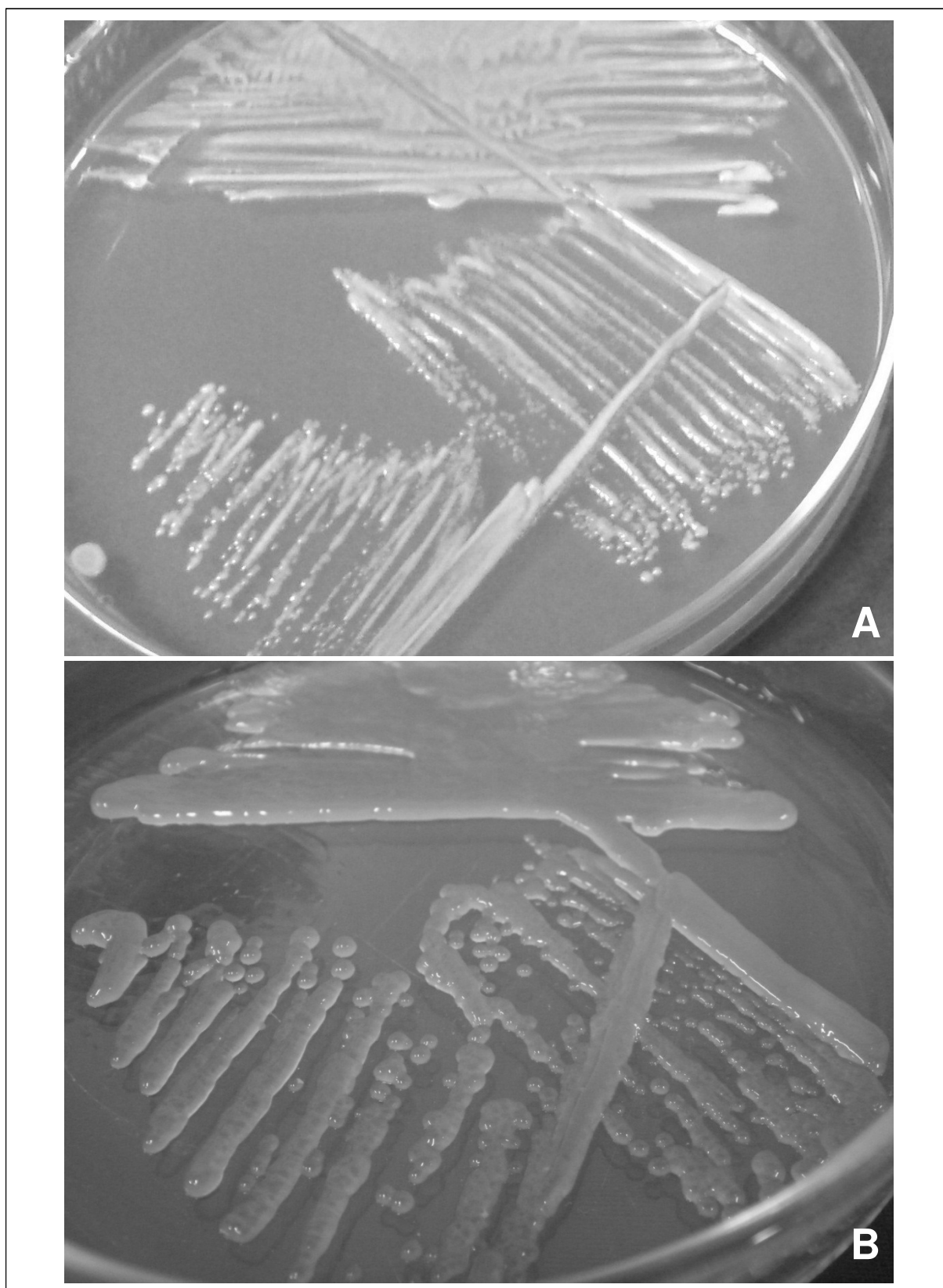


Figura 4 - *L. satsumensis* 10P2 em ágar MRS (A) e em ágar sMRS contendo 8% de sacarose (B). A produção de EPS foi reconhecida pela visualização de colônias com aspecto viscoso.

Foram considerados produtores de EPS os isolados selecionados que apresentaram colônias com aspecto viscoso nas três repetições realizadas em ágar sMRS, utilizando como controle as colônias cultivadas em ágar MRS (Figura 4 e apêndice B). Alguns isolados que não foram considerados produtores de EPS apresentaram colônias com aspecto viscoso em apenas uma ou duas repetições do teste, o qual foi realizado em triplicata. Nestes casos, seriam necessários estudos de otimização das condições de cultivo para que os isolados produzissem EPS de maneira constante. Entretanto, foram selecionados apenas os isolados produtores adaptados às condições de cultivo propostas inicialmente. A temperatura e o tempo de incubação utilizadas neste trabalho que foram de 37°C e 48h são exemplos de algumas condições de cultivo que poderiam ter sido modificadas, uma vez que uma cepa de *L. brevis* também isolada de grãos de Kefir por Pidoux, Brillouet e Quemener (1988) apresentou produção de EPS quando cultivada a 30°C por 120h.

Nas placas de ágar rMRS contendo rafinose, apesar de ter sido observado crescimento de todos os isolados, não foi visualizado nenhuma colônia com aspecto viscoso. O meio com rafinose foi usado neste trabalho para a triagem de lactobacilos produtores de frutanos, uma vez que em presença de sacarose os lactobacilos poderiam produzir moléculas de glicanos ou de frutanos. Malik et al. (2009) identificaram 13 BAL isoladas de diferentes alimentos que apresentaram colônias viscosas em meio MRS modificado contendo rafinose e descreveram que este trissacarídeo é substrato apenas para as frutossiltransferases. As glicosiltransferases quando promovem a quebra da ligação glicosídica existente entre o resíduo de glicose e frutose não conseguem unir os radicais glicosil de forma correta para a formação dos glicanos uma vez que os mesmos permanecem ligados à um resíduo de galactose. Portanto, a ausência de colônias com EPS em presença de rafinose provavelmente indicou que os lactobacilos selecionados como produtores no meio sMRS produziram moléculas de glicanos.

Já nas placas de ágar IMRS contendo lactose, também foi observado o crescimento de todos os isolados, porém não houve produção de EPS por nenhum isolado testado. Neste meio esperava-se uma produção de heteropolissacarídeos, como o Kefirano ou heteropolissacarídeos semelhantes. Wang et al. (2008) conseguiram encontrar, entre BAL, um *L. kefiranofaciens* produtor de um heteropolissacarídeo contendo glicose e galactose, utilizando um meio a base de

soro de leite suplementado com lactose, glicose, triptona, cisteína e uma série de sais metálicos além de incubação por 7 a 9 dias a 30 °C em anaerobiose. Cheirsilp et al. (2003), por sua vez, estudaram a otimização da produção de Kefirano em cultura mista de *L. kefiranofaciens* com *Saccharomyces cerevisiae* uma vez que a produção de Kefirano é reconhecidamente dependente de etanol, além de condições anaeróbias.

Em alguns trabalhos se observa que o kefirano é definido apenas por apresentar quantidades aproximadamente equimolares de resíduos de D-glicose e D-galactose ou por ser produzido por *L. kefiranofaciens*. Entretanto, de acordo com Kooiman (1968), para ser considerada uma molécula de Kefirano os resíduos de açúcar e as ligações glicosídicas das unidades de repetição precisam ser caracterizados, bem como o tamanho da molécula (item 1.4.2). Desta forma, parece que não está bem estabelecida ainda na literatura a definição do que se constitui uma molécula de Kefirano, sendo necessários estudos mais detalhados da diversidade estrutural existente entre os heteropolissacarídeos presentes em grãos de Kefir de leite (CHEIRSILP et al., 2003; FRENGOVA et al., 2002).

5.2 Caracterização molecular do sítio catalítico do gene *gtf*

O produto da amplificação da região codificadora do sítio catalítico dos genes *gtf* apresenta um tamanho de aproximadamente 660 pares de bases (bp) e as condições da PCR já são bem estabelecidas (KRALJ et al., 2003). Mesmo assim se fez necessário a modificação de alguns parâmetros, especificamente a concentração de DNA polimerase de 0,028 para 0,075 U/ μ L e a temperatura de anelamento de 42 para 55 °C, uma vez que muitas regiões inespecíficas do genoma estavam sendo amplificadas. Dentre os 16 isolados produtores de EPS, cinco (1P3, 10P, 10P2, 12P e 19U) apresentaram *amplicons* de tamanho adequado (Figura 5).

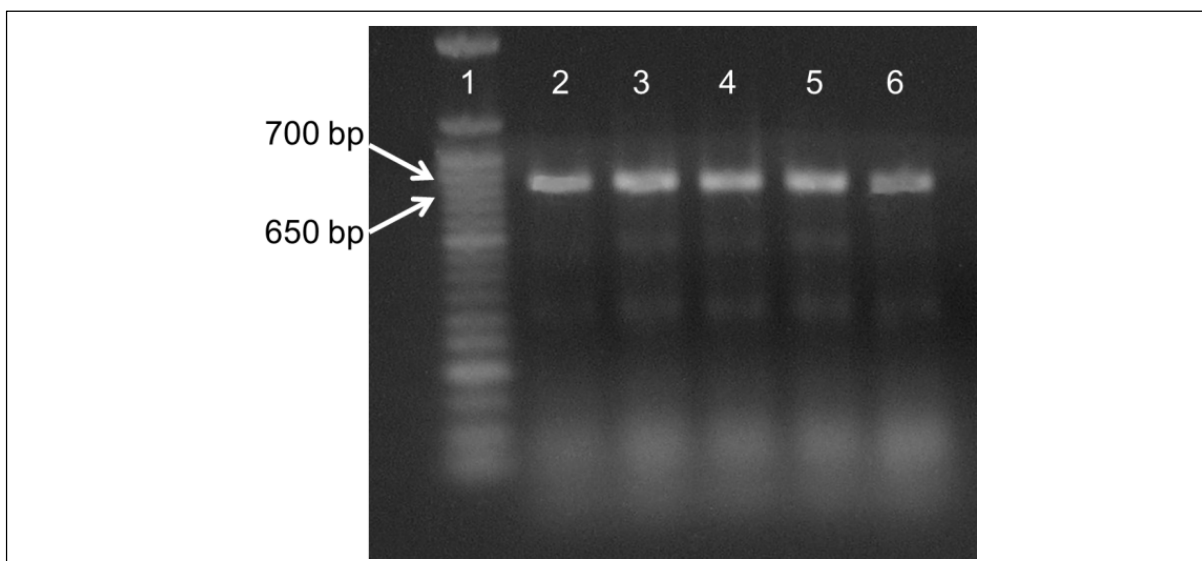


Figura 5 - Imagem de um gel de agarose (1%) capturada sob LUV mostrando a resolução dos produtos de PCR referente à região codificadora do sítio catalítico das glicosiltransferases dos isolados 1P3 (poço 2); 10P (poço 3); 10P2 (poço 4); 12P (poço 5) e 19U (poço 6). Poço 1: marcador de massa molecular de 50 bp (New England).

Os *amplicons* dos isolados 1P3, 10P, 10P2 e 12P foram encaminhados para o sequenciamento de DNA. O *amplicon* do isolado 19U não foi sequenciado porque a concentração de DNA após sua purificação foi insuficiente. As quatro sequências geradas apresentaram em média 648 nucleotídeos e foram alinhadas utilizando o programa MEGA 5.0, sendo observada uma alta semelhança entre elas. As extremidades não pareadas foram desprezadas e através do BLAST foi constatado que as sequências de nucleotídeos referentes às cepas 10P e 10P2 apresentaram 100% de identidade; estas em relação à sequência referente aos isolados 1P3 e 12P apresentaram identidade de 99%. Por fim, as sequências referentes aos isolados 1P3 e 12P também foram 99% idênticas entre si (anexo).

Em seguida procedeu-se a conversão das sequências de nucleotídeos para aminoácidos utilizando a ferramenta ORF Finder e a comparação com outras sequências depositadas no banco de dados GenBank através do BLAST. As enzimas dos isolados de *L. satsumensis* 10P e 10P2 apresentaram identidade em nível de nucleotídeo de 74% e em nível de aminoácidos de 80% com a GTF produzida por *L. hilgardii* TMW1828, enquanto a identidade das enzimas do isolado de *L. kefiranofaciens* 1P3 e do isolado de *L. parafarraginis* 12P foram, em nível de nucleotídeo, de 75 e 74% e em nível de aminoácidos de 80 e 79% respectivamente

em relação à mesma GTF produzida por *L. hilgardii* TMW1828 (Apêndice A). Esta cepa de *L. hilgardii* foi isolada de grãos de Kefir de água por Waldherr et al. (2010).

Segundo Hsieh et al. (2012), a mudança do meio em que os grãos de Kefir são originalmente cultivados pode modificar o perfil dos microrganismos produtores de EPS envolvidos na formação da matriz exopolissacarídica. O *L. kefiranofaciens* 1P3 que é um produtor de heteropolissacarídeos em potencial, mesmo tendo sido isolado de grãos de Kefir de leite possui o gene *gtf* e foi capaz de produzir EPS em presença de sacarose. Este resultado provavelmente indica um dos mecanismos de como os grãos de Kefir de leite são capazes de se adaptarem quando cultivados em água com açúcar.

5.3 (GTG)₅-PCR

Dentre os lactobacilos produtores de EPS, quatro espécies apresentaram dois isolados provenientes de um mesmo grão de kefir e houve a necessidade da identificação em nível de linhagem: (i) *L. casei* 15U2 e 16U isolados de Kefir de água de Belo Horizonte; (ii) *L. perolens* 17P2 e 19P isolados de Kefir de água de Curitiba; (iii) *L. kefiranofaciens* 1P e 1P3 isolados de Kefir de leite de Curitiba; (iv) *L. satsumensis* 10P e 10P2 isolados de Kefir de água de Salvador.

Após a (GTG)₅-PCR, os produtos da amplificação foram resolvidos em gel de poliacrilamida e foi observada uma média de 8,4 bandas (Figura 6). Apesar das semelhanças entre os perfis, os mesmos apresentaram algumas pequenas diferenças no perfil de bandas o que permitiu afirmar que apesar de terem sido isolados de um mesmo grão de Kefir e terem sido identificados como sendo de uma mesma espécie, não se tratavam dos mesmos microrganismos, pois são lactobacilos de linhagens diferentes.

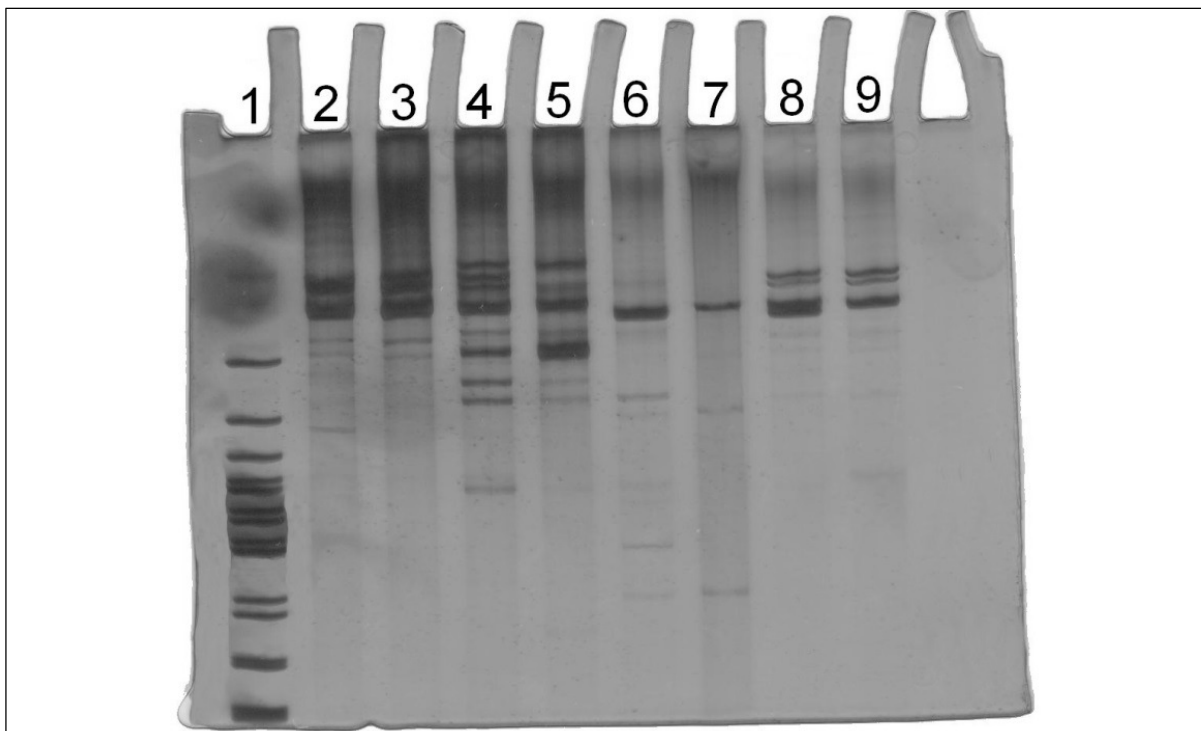


Figura 6 - Imagem de um gel de poliacrilamida 6% corado com nitrato de prata que mostra o padrão de bandas referente à resolução dos produtos da $(GTG)_5$ -PCR de oito isolados de lactobacilos produtores de EPS: *L. kefiranofaciens* 1P (2) e 1P3 (3); *L. casei* 15U2 (4) e 16U (5); *L. satsumensis* 10P (6) e 10P2 (7); *L. perolens* 17P2 (8) e 19P (9); Poço 1: marcador de massa molecular de 100 pb (Invitrogen).

Gevers, Huys e Swings (2001) analisaram 44 cepas de referência de lactobacilos (totalizando 26 espécies). Utilizaram a $(GTG)_5$ -PCR e os produtos da reação apresentaram perfil com média de 16,5 bandas. Todas as cepas foram agrupadas de acordo com suas respectivas designações taxonômicas e apenas 7 linhagens não puderam ser diferenciadas.

Os perfis descritos no trabalho do parágrafo anterior apresentaram um número médio de bandas maior do que os perfis deste trabalho. Isto pode ser devido à diferença na concentração do gel de poliacrilamida. É possível perceber na Figura 6 que a maioria dos produtos de PCR resolvidos se encontra na porção superior do gel. Portanto o número médio de bandas poderia ser aumentado se a concentração de poliacrilamida fosse reduzida, o que elevaria evidenciaria mais diferenças nos perfis de banda.

5.4 Produção de exopolissacarídeos

Os cinco lactobacilos produziram EPS em diferentes concentrações. O produtor menos eficiente que foi o *L. parafarraginis* 12P, quando comparado ao produtor mais eficiente que foi o *L. mali* 19U, produziu cerca de 13 vezes menos EPS mesmo com uma contagem celular de uma unidade logarítmica a mais (Tabela 3). Ainda assim, o isolado 12P apresentou produção maior que o *L. hilgardii* TMW1828, que segundo Waldherr et al. (2010), foi de $2,45 \pm 0,51$ g/L após 48h de cultivo a 30 °C, embora não tenha sido descrito a densidade celular do inóculo inicial, que também foi de 1,5% (v/v).

Tabela 3 - Produção de EPS por cinco isolados de lactobacilos de Kefir.

Linhasgens	Produção (g/L)	Densidade celular (UFC/mL)
<i>L. kefiranofaciens</i> 1P3	$12,60 \pm 2,58$	$5,90 \times 10^9$
<i>L. satsumensis</i> 10P	$11,93 \pm 2,17$	$5,10 \times 10^9$
<i>L. satsumensis</i> 10P2	$13,42 \pm 0,53$	$1,71 \times 10^{10}$
<i>L. parafarraginis</i> 12P	$2,55 \pm 0,73$	$1,13 \times 10^{10}$
<i>L. mali</i> 19U	$34,01 \pm 2,87$	$8,00 \times 10^9$

A produção de heteropolímeros parece apresentar um rendimento muito menor do que a produção de homopolímeros. Comparando os resultados do presente trabalho com os de Frengova et al. (2002), que avaliaram a produção de heteropolissacarídeos extracelulares em BAL, a linhagem de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* HP1, considerada a melhor entre as testadas, apresentou produção de apenas 0,82 g/L de EPS após 22 h de cultivo.

5.5 Caracterização estrutural dos exopolissacarídeos

A caracterização estrutural foi realizada com os EPS produzidos pelos *L. kefiranofaciens* 1P3, *L. satsumensis* 10P, *L. satsumensis* 10P2, *L. parafarraginis* 12P e *L. mali* 19U.

5.5.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Os EPS analisados apresentaram dois sinais correspondentes aos hidrogênios anoméricos dos resíduos de açúcar, os quais foram praticamente idênticos entre os polímeros (Figura 7 e Apêndice C). Foi observado um sinal de maior intensidade na região de δ 4,93–4,96 atribuído a ligações $\alpha(1,6)$ e outro sinal de menor intensidade em δ 5,27–5,29 atribuído a ligações $\alpha(1,4)$ (Tabela 4) (KRALJ et al., 2005).

Tabela 4 - Valores^a de deslocamento químico e da integração dos sinais correspondentes aos hidrogênios anoméricos dos extratos de EPS.

	1º hidrogênio anomérico		2º hidrogênio anomérico	
	δ (ppm)	Intensidade (área)	δ (ppm)	Intensidade (área)
EPS 1P3	5,29 ± 0,001	0,086 ± 0,004	4,95 ± 0,002	1,000
EPS 10P	5,28 ± 0,019	0,096 ± 0,006	4,94 ± 0,017	1,000
EPS 10P2	5,29 ± 0,007	0,075 ± 0,039	4,95 ± 0,008	1,000
EPS 12P	5,29 ± 0,008	0,099 ± 0,016	4,95 ± 0,010	1,000
EPS 19U	5,28 ± 0,013	0,066 ± 0,017	4,94 ± 0,015	1,000

^a : Média e desvio-padrão das duplicatas que foram analisadas duas vezes (quatro valores).

As proporções de ligações $\alpha(1,6)$ / $\alpha(1,4)$ foram as seguintes: 92,06% / 7,94% (*L. kefiranofaciens* 1P3), 91,24% / 8,76% (*L. satsumensis* 10P), 93,07% / 6,93% (*L. satsumensis* 10P2), 91,01% / 8,99% (*L. parafarraginis* 12P) e 93,83 % / 6,17 % (*L. mali* 19U). O grau de ramificação dos glicanos afeta a solubilidade em água e outras propriedades reológicas. Quanto maior a proporção de ligações $\alpha(1,6)$ maior é a solubilidade em água e a estabilidade sob condições ácidas e alcalinas quando comparado com ligações $\alpha(1,3)$ (SHUKLA et al., 2011).

Esta elevada semelhança observada nos tipos e proporções de ligações glicosídicas entre os EPS, corrobora os resultados já apresentados relativos à alta identidade (99–100%) da região do sítio catalítico nos genes *gtf* entre as glicanosacarase das linhagens investigadas neste trabalho, indicando que provavelmente se tratam de enzimas funcionalmente idênticas. Kralj et al. (2005) induziram mutações na região do sítio catalítico de um gene *gtf* denominado GTFA, que normalmente polimeriza glicanos com 57% de ligações $\alpha(1,4)$ e 43% de ligações $\alpha(1,6)$ e algumas GTFA mutantes foram drasticamente modificadas produzindo glicanos com até 93% de ligações $\alpha(1,6)$.

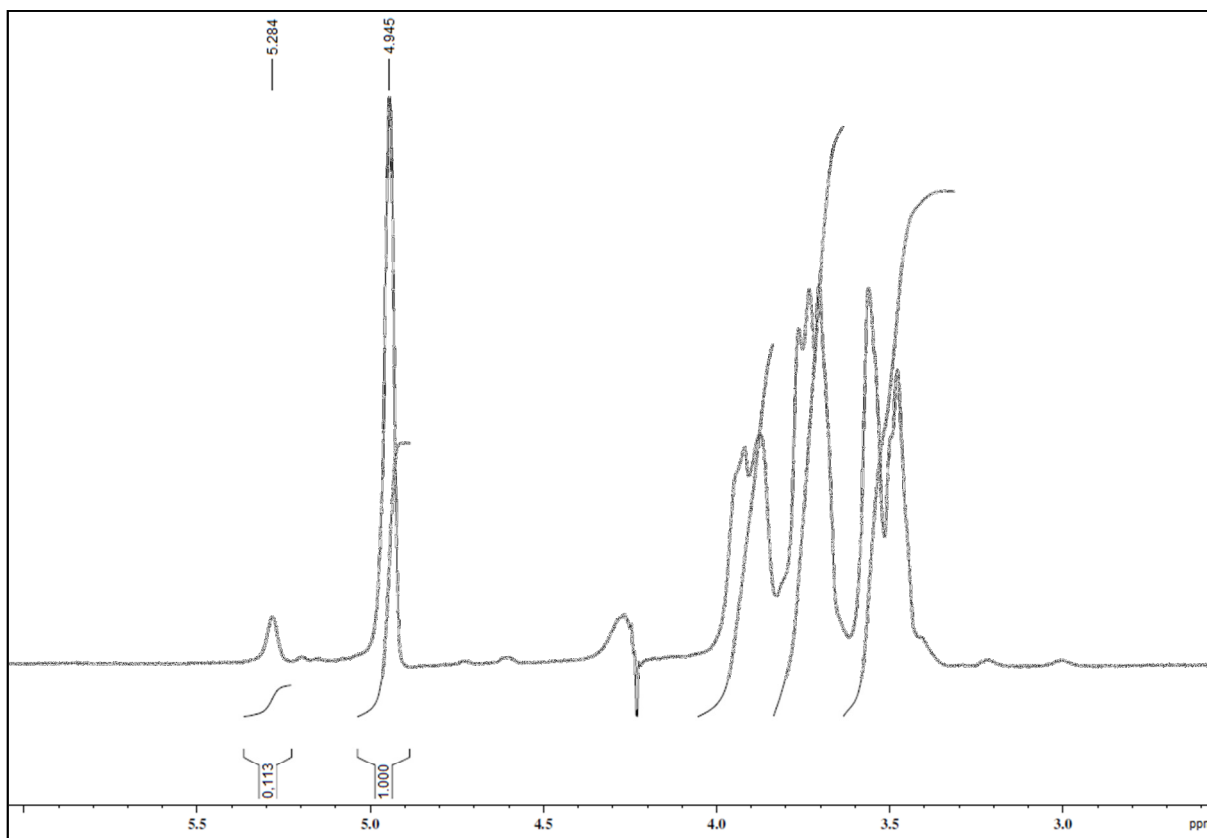


Figura 7 - Espectros de ^1H -RMN do EPS produzido pelo *L. satsumensis* 10P2. Os valores são referente ao deslocamento químico expresso em ppm (acima do sinal) e à intensidade expresso pela área (abaixo do sinal).

5.5.2 Determinação de monossacarídeos

Após a digestão ácida, os EPS hidrolisados foram analisados por meio de uma coluna cromatográfica de troca iônica em que carboidratos e polióis podem ser separados. Os produtos de hidrólise por 16 h apresentaram apenas um pico com fator de retenção correspondente ao padrão de glicose utilizado. Os produtos de hidrólise por 2 h apresentaram o pico referente à glicose, além de dois outros pequenos picos que provavelmente são oligos ou polissacarídeos que não foram completamente hidrolisados e foram denominados de sacarídeos 1 e 2 (Tabela 5).

A hidrólise por 2 h foi realizada porque segundo Bounaix et al. (2009), a molécula de frutose é degradada quando permanece por períodos prolongados de tempo em presença de altas concentrações de ácido, o que impossibilitaria sua identificação. Entretanto, a frutose não foi detectada em nenhum produto de hidrólise assim como nenhum outro monossacarídeo a não ser a glicose (Figura 8).

Portanto, é possível afirmar que estes EPS são moléculas de dextrano, uma vez que são polissacarídeos constituídos apenas por resíduos de D-glicose tendo em sua cadeia principal ligações glicosídicas $\alpha(1,6)$. Desta forma, os EPS foram denominados de dextrano 1P3, dextrano 10P, dextrano 10P2, dextrano 12P e dextrano 19U em referência ao código de cada linhagem utilizada para a produção dos mesmos.

Tabela 5 - Valores^a dos tempos de retenção nas análises por cromatografia de troca iônica dos EPS hidrolisados.

	Sacarídeo 1	Sacarídeo 2	Glicose	Frutose
Padrão frutose	-	-	-	11,79 \pm 0,114
Padrão glicose	-	-	11,224 \pm 0,030	-
Eps 1P3 - 2h	8,503 \pm 0,036	9,417 \pm 0,033	11,232 \pm 0,033	-
Eps 1P3 - 16h	-	-	11,232 \pm 0,028	-
Eps 10P - 2h	8,478 \pm 0,000	9,392 \pm 0,000	11,211 \pm 0,000	-
Eps 10P - 16h	-	-	11,215 \pm 0,004	-
Eps 10P2 - 2h	8,480 \pm 0,001	9,395 \pm 0,001	11,212 \pm 0,001	-
Eps 10P2 - 16h	-	-	11,250 \pm 0,002	-
Eps 12P - 2h	8,476 \pm 0,001	9,394 \pm 0,005	11,208 \pm 0,001	-
Eps 12P - 16h	-	-	11,207 \pm 0,001	-
Eps 19U - 2h	8,495 \pm 0,023	9,412 \pm 0,026	11,203 \pm 0,026	-
Eps 19U - 16h	-	-	11,205 \pm 0,000	-

^a : Média e desvio-padrão das duplicatas expressos em minutos.

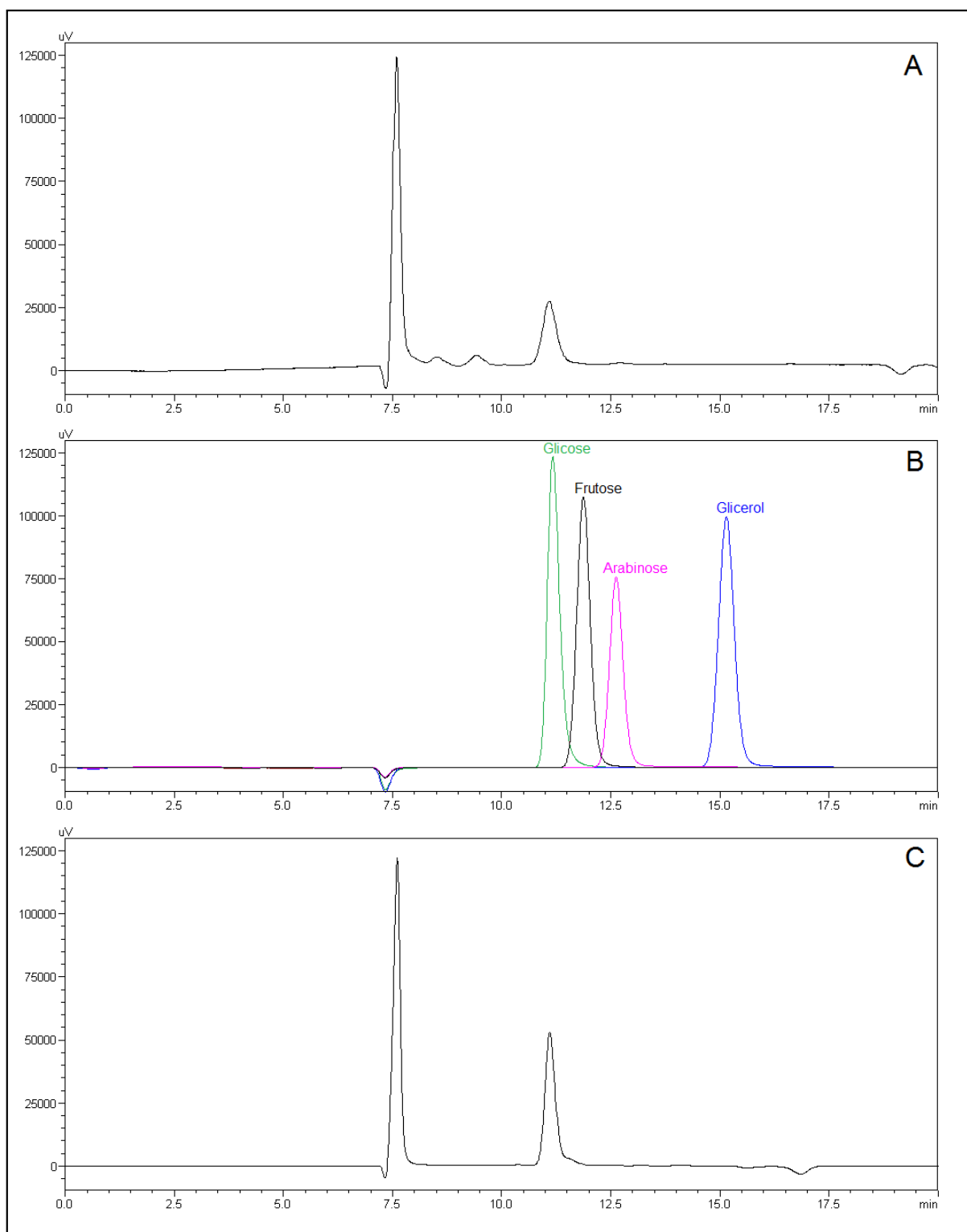


Figura 8 - Análise por cromatografia de troca iônica dos EPS de *L. satsumensis* 10P2 submetido à hidrólise ácida por 2 h (A); Sobreposição de cromatogramas referentes a padrões de glicose, frutose, arabinose e glicerol (Sigma-Aldrich) (B); EPS de *L. satsumensis* 10P2 submetido à hidrólise ácida por 16 h (C).

5.5.3 Determinação do massa molecular

Não foi possível determinar com precisão a massa molecular de nenhum dos dextranos porque os mesmos apresentaram tempos de retenção menores que os padrões de dextrano sulfato (padrão 4) utilizados, extrapolando assim, a curva padrão construída com equação de reta $y = -0,0009x + 5,9511$ e $R^2 = 0,9704$. No entanto, estimamos as massas moleculares utilizando a curva padrão mesmo extrapolada e os tempos de retenção de cada dextrano e concluímos que os mesmos teriam entre 723 e 814 KDa aproximadamente (Tabela 6).

Tabela 6 - Valores^a dos tempos de retenção nas análises por cromatografia de gel filtração dos EPS.

	Massa molecular (KDa)	Tempo de retenção (min.)
Padrão 1 de dextrano	36	5,936 ± 0,016
Padrão 2 de dextrano	150	5,794 ± 0,001
Padrão 3 de dextrano	410	5,640 ± 0,003
Padrão 4 de dextrano	500	5,502 ± 0,001
EPS 1P3	(814)	5,218 ± 0,000
EPS 10P	(809)	5,223 ± 0,001
EPS 10P2	(794)	5,236 ± 0,004
EPS 12P	(810)	5,222 ± 0,001
EPS 19U	(723)	5,300 ± 0,005

^a : Média e desvio-padrão das duplicatas.

Ainda assim, é possível afirmar apenas que são dextranos de massa molecular maior que 500 KDa e que apresentam massas moleculares muito

próximas entre si, uma vez que o tempo de retenção dos mesmos foi de aproximadamente 5,2 minutos.

As massas moleculares de biopolímeros de elevada massa molecular geralmente não são determinados por não se utilizar padrões e colunas adequados. Os EPS analisados por Bounaix et al. (2009) são descritos apenas como maiores que 1.000 KDa e ainda o EPS denominado Kefirano por Medrano et al. (2009) é descrito como maior que 10.000 KDa.

5.6 Pureza dos exopolissacarídeos

A concentração de proteínas nos EPS extraídos foi determinada a partir da equação de regressão linear $y = 0,0006x + 0,0181$ ($R^2 = 0,9959$) obtida pela curva padrão de albumina humana. Exceto o extrato correspondente ao dextrano 12P, que apresentou concentração proteica de 68 $\mu\text{g/mL}$, todos os outros apresentaram concentração de proteínas menor que 25 $\mu\text{g/mL}$.

Com relação à presença de monossacarídeos residuais, foi detectada a presença de glicose em todos os extratos e uma vez que não foi realizada uma curva de calibração com os padrões de glicose, não foi possível determinar sua concentração. Entretanto, foi possível visualizar nos cromatogramas das Figuras 9, 10, 11, 12 e 13, que os picos correspondentes à glicose nos extratos de dextrano 12P e 19U foram maiores que nos outros, o que indica uma maior quantidade de glicose nestes extratos.

Na extração dos EPS, a etapa de precipitação dos mesmos com solventes se faz muito importante para a eliminação de proteínas e monossacarídeos. Azeredo e Oliveira (1996) testaram uma série de volumes e tipos de solventes para a precipitação de EPS bacterianos, utilizando diferentes volumes de etanol, acetona, propanol, isopropanol, brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) e 3,5,6 - trifenil - 2,3,5,6 tetraaza biciclo-1-hexeno (nitron) e concluíram que apenas 0,1 volume de nitron precipitou a máxima quantidade de EPS e a segunda melhor precipitação foi com três volumes de propanol. A utilização de etanol no trabalho como agente precipitante pode ter ocasionado a presença das impurezas encontradas, uma vez que o etanol não foi considerado o solvente mais adequado para esta finalidade.

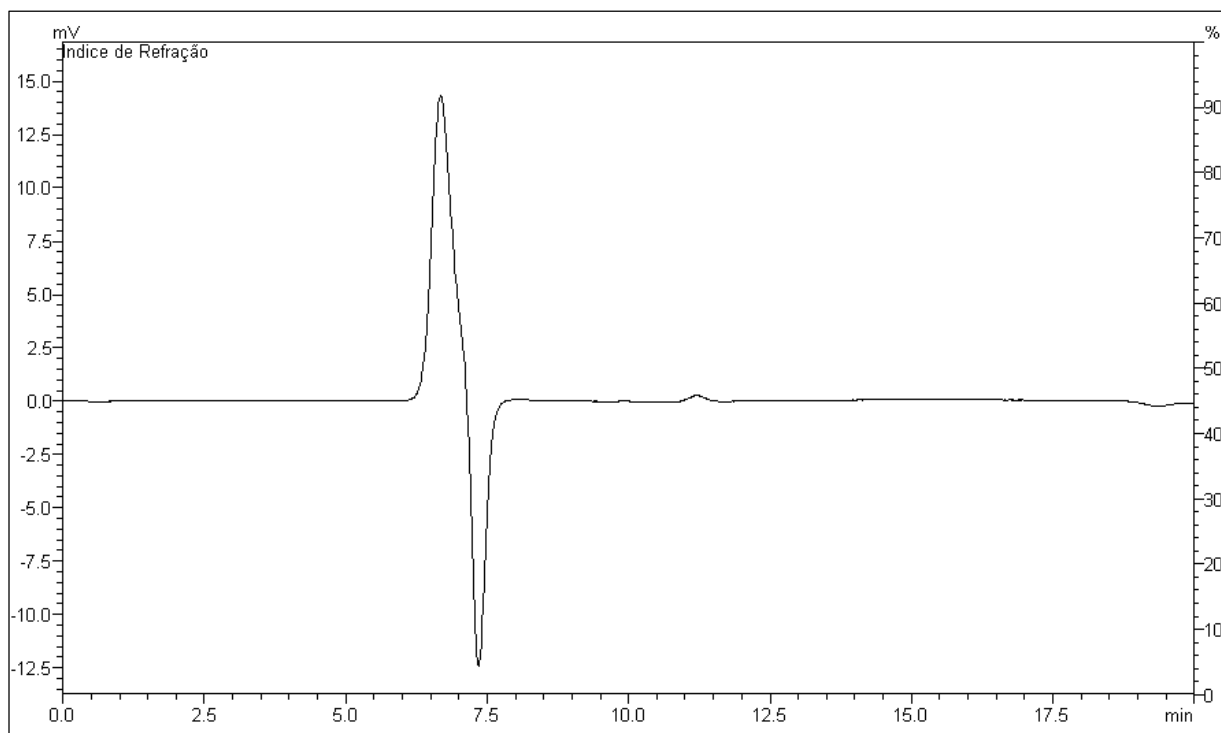


Figura 9 - Análise dos extratos de EPS de *L. kefiranofaciens* 1P3 por cromatografia de troca iônica.

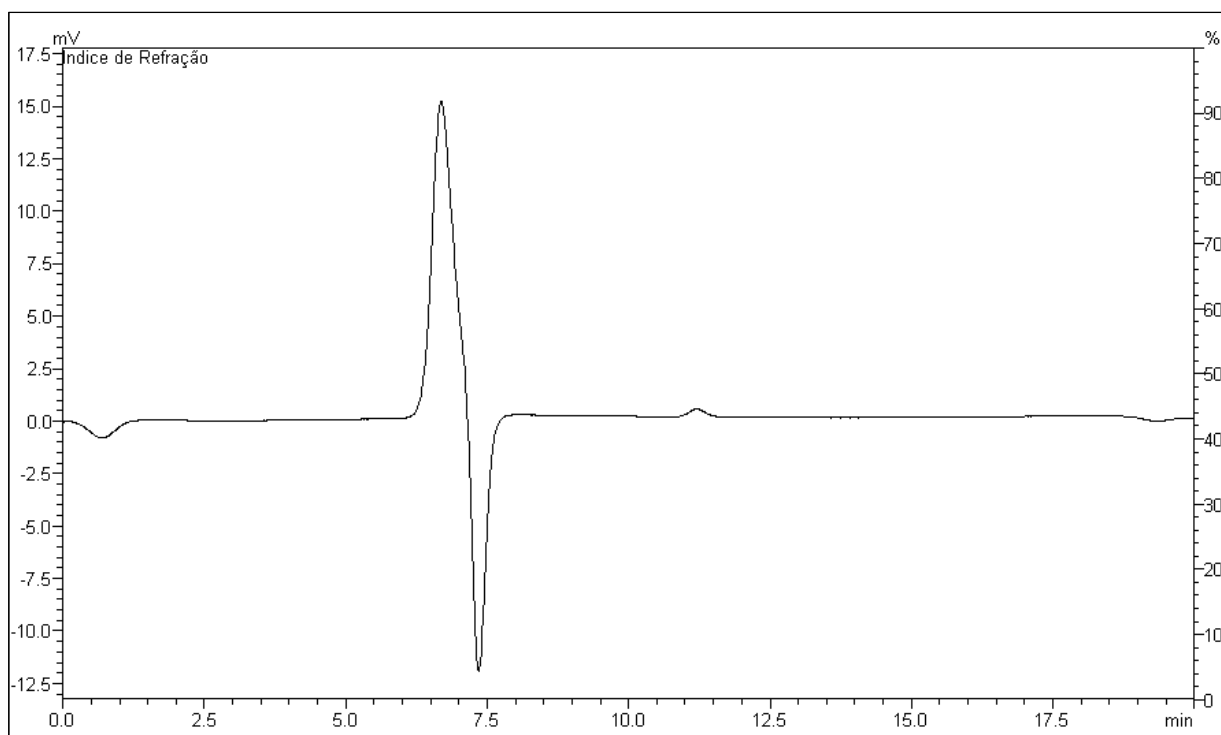


Figura 10 - Análise dos extratos de EPS de *L. satsumensis* 10P por cromatografia de troca iônica.

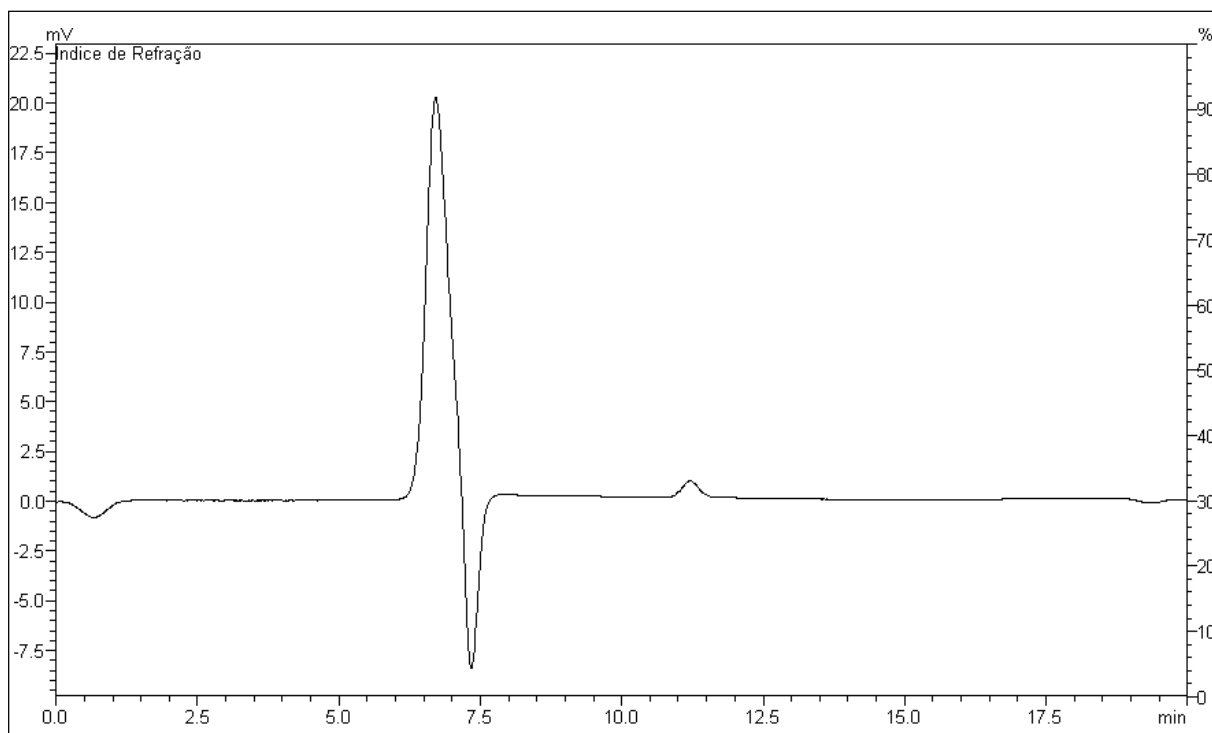


Figura 11 - Análise dos extratos de EPS de *L. satsumensis* 10P2 por cromatografia de troca iônica.

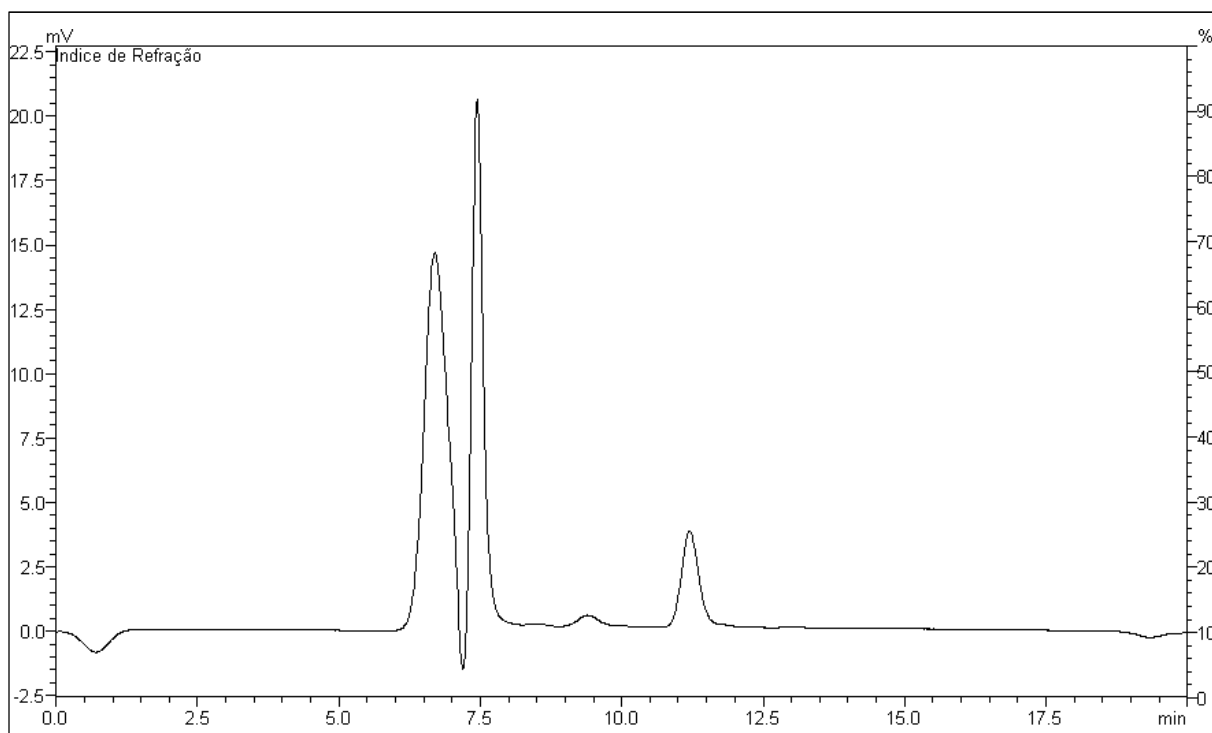


Figura 12 - Análise dos extratos de EPS de *L. parafarraginis* 12P por cromatografia de troca iônica.

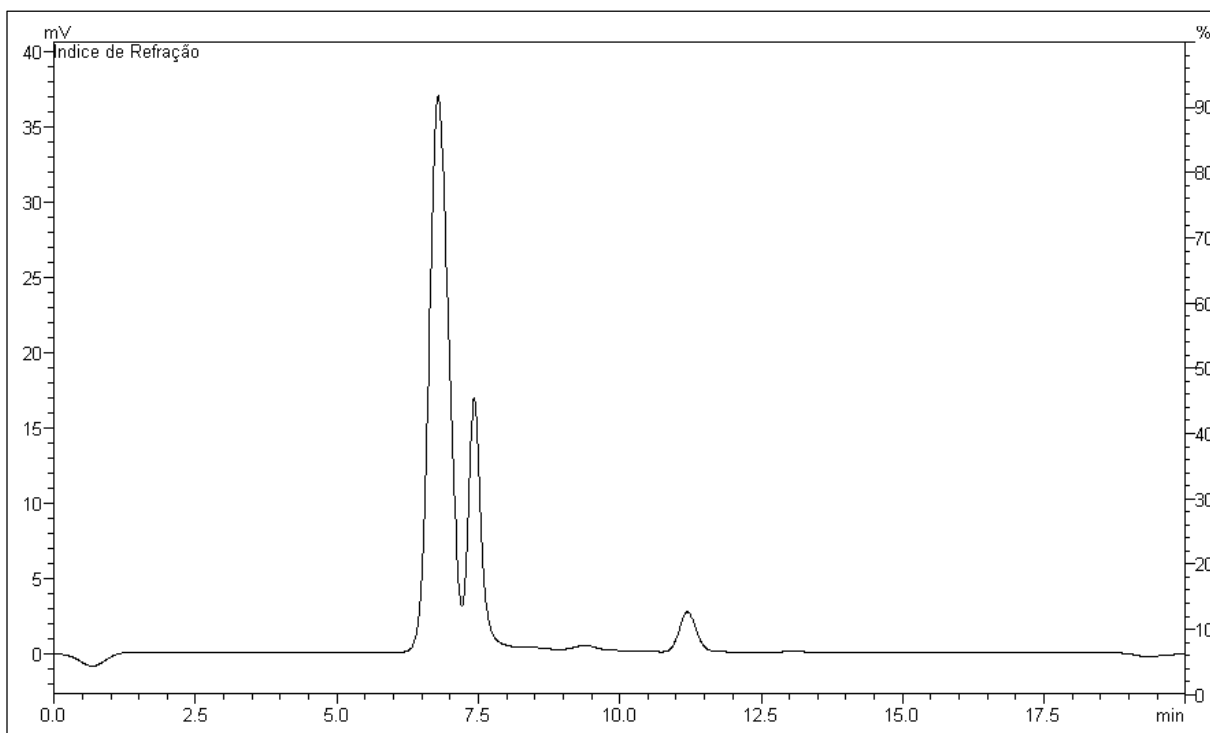


Figura 13 - Análise dos extratos de EPS de *L. mali* 19U por cromatografia de troca iônica.

5.7 Avaliação da capacidade imunomodulatória dos exopolissacarídeos

Os extratos de dextrano dos *L. kefiranofaciens* 1P3 e *L. satsumensis* 10P e 10P2 tiveram a capacidade imunomodulatória avaliada em camundongos CV pela produção de IgA no íleo e de citocinas em todo intestino delgado. Os dextranos 1P3, 10P e 10P2 apresentaram características estruturais muito semelhantes: (i) açúcar constituinte da cadeia polimérica; (ii) tipos e proporções das ligações que unem os resíduos de açúcar; (iii) fator de retenção que determina a massa molecular dos polissacarídeos; e (iv) pureza dos extratos (Tabela 7). Desta forma, os resultados dos grupos tratados com estes dextranos poderiam ser analisados também em conjunto.

O cálculo da dosagem para a administração dos dextranos foi realizado com base no peso corporal dos camundongos, os quais apresentaram em média 14 g na primeira metade do experimento e 17 g na segunda metade.

Tabela 7 - Características estruturais e de pureza dos extratos de dextrano utilizados para a avaliação da capacidade imunomodulatória.

EPS	Açúcares da cadeia	Ligações glicosídicas		Massa molecular em KDa (Rt)	Pureza dos extratos	
		Tipo	%		Proteína	Açúcares
1P3	Glicose	$\alpha(1,6) / \alpha(1,4)$	92,06 / 7,94	>500 (5,218 min)	<25 $\mu\text{g/mL}$	Glicose
10P	Glicose	$\alpha(1,6) / \alpha(1,4)$	91,24 / 8,76	>500 (5,223 min)	<25 $\mu\text{g/mL}$	Glicose
10P2	Glicose	$\alpha(1,6) / \alpha(1,4)$	93,07 / 6,93	>500 (5,236 min)	<25 $\mu\text{g/mL}$	Glicose

Para o experimento de determinação da produção de IgA foram utilizados cinco animais de cada um dos grupos teste e cinco do grupo controle tratado com salina. Na Figura 14 a presença de IgA pode ser visualizada pelos pontos fluorescentes nas imagens dos cortes histológicos de íleo. É possível observar uma fluorescência muito mais intensa na imagem representativa do grupo teste do que na do grupo controle.

As imunoglobulinas do tipo A constituem os principais agentes de defesa no trato respiratório e gastrointestinal, impedindo a adesão e a absorção de bactérias e toxinas nas mucosas. São produzidas por plasmócitos e secretadas através de vesículas (transcitose) na forma de IgA secretora (sIgA) que é definida pelo complexo formado entre componente secretório (CS) e dímero de IgA (complexo dímero:IgA-CS) (ABBAS; LICHTMAN, 2005; MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010).

Muitos trabalhos têm mostrado a capacidade que algumas bactérias e leveduras possuem em estimular a produção de sIgA em camundongos como *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Saccharomyces* e *Salmonella*. Entretanto esta estimulação não ocorre da mesma forma entre os diferentes microrganismos (PERDIGÓN et al., 1999; MARTINS et al., 2009; STEINBERG et al., 2012). De acordo com Vinderola et al. (2006) e Medrano et al. (2011) alguns exopolissacarídeos, como o kefirano também apresentam a capacidade de estimular a produção de sIgA.

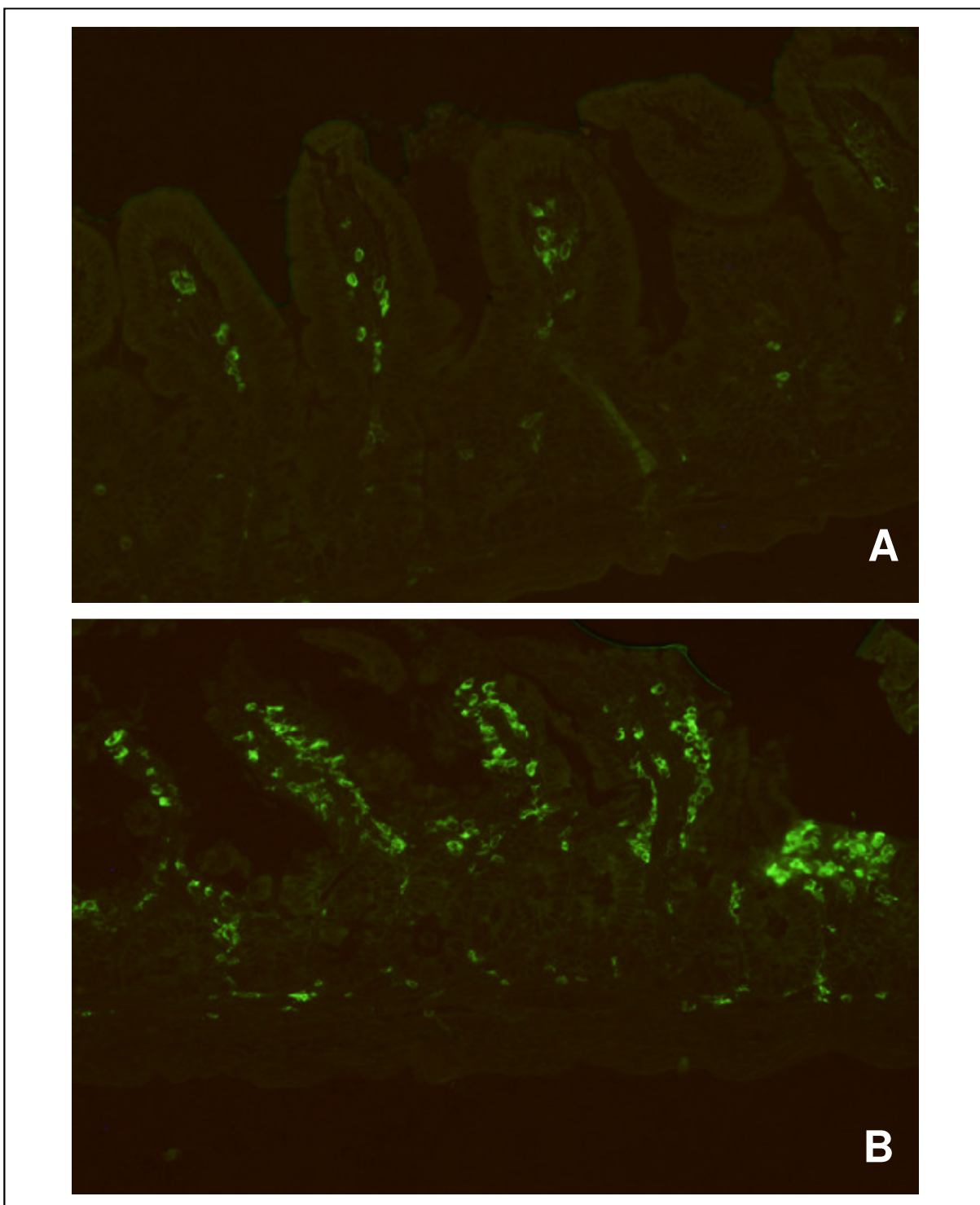


Figura 14 - Visualização de IgA através de imunofluorescência direta em cortes representativos de íleo de animais do grupo salina (A) e do grupo tratado com dextrano 10P2 (B).

Os resultados descritos na Figura 15 comprovam que o houve aumento significativo na produção de IgA ($p < 0,001$) nos animais tratados com dextransos ($1,86\% \pm 0,98$) em comparação com os tratados com salina ($0,19\% \pm 0,14$).

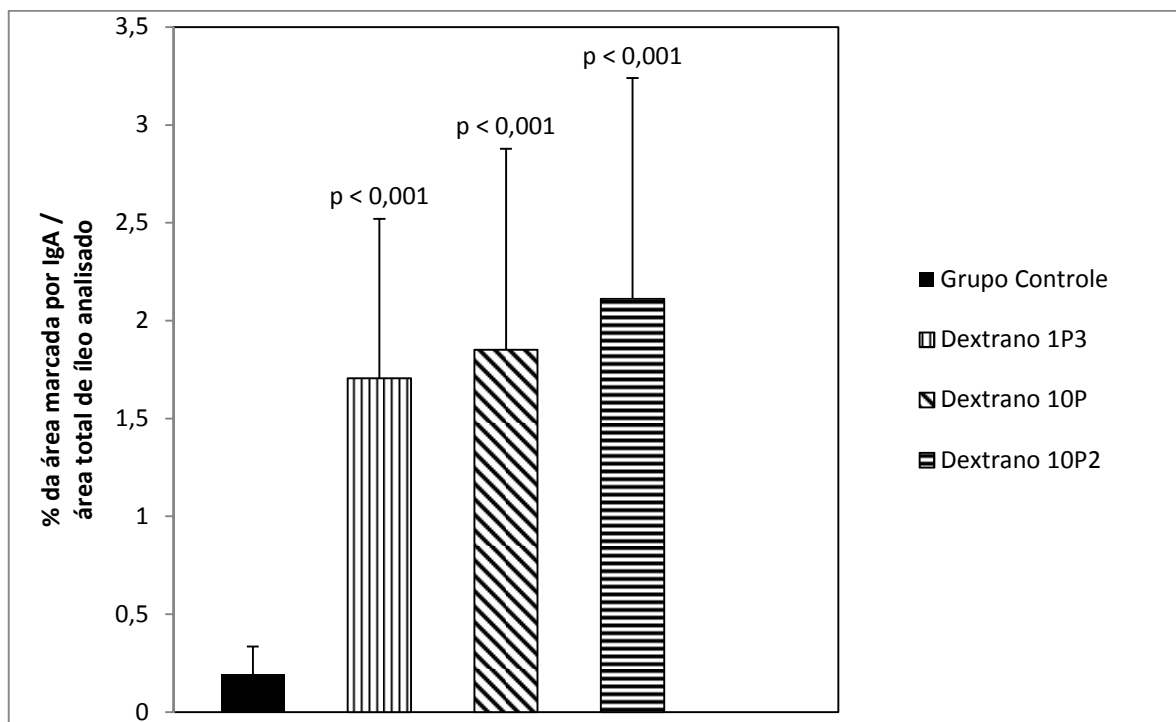


Figura 15 - Efeito do dextrano no íleo de camundongos CV sobre a produção de IgA. Os valores da tabela indicam a porcentagem de área marcada por IgA em relação a área total das porções ílicas analisadas.

Algumas citocinas desempenham um importante papel na regulação da produção de sIgA como IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-15, TGF- β e IFN- γ . A IL-6, por exemplo, induz um aumento na secreção de sIgA bem como de outros isotipos de imunoglobulinas, enquanto o TGF- β induz aumento apenas de sIgA e suprime a secreção de IgG e IgM, além de induzir a mudança de classe de células B IgM⁺/IgD⁺ para células B IgA⁺ (GOODRICH; MCGEE, 1999; MEDRANO et al., 2011).

Para o experimento de quantificação da expressão dos genes das citocinas foram utilizados inicialmente 7 animais de cada grupo tratado com dextrano e 6 do grupo salina. Após a extração de RNA das porções de 1-2 cm de duodeno, jejuno e íleo, foram avaliados os resultados da quantificação por espectrofotometria e da resolução de bandas em gel de agarose. Todos os RNA extraídos apresentaram concentração superior a 500 ng/ μ L com exceção de uma amostra do grupo teste,

que foi excluída, contendo apenas 184,3 ng/ μ L de RNA e todas as amostras apresentaram RNA com pureza adequada (A260/280 entre 1,7 e 2,1). A resolução dos mesmos em gel de agarose permitiu a constatação de que algumas amostras apresentaram RNA parcialmente degradado. Duas amostras do grupo teste foram excluídas porque os RNA estavam totalmente degradados.

De acordo com Giulietti et al. (2001) o desenho de iniciadores para RT-qPCR deve ser realizado de modo que os pares *forward* e *reverse* não anelem num mesmo éxon, prevenindo assim a co-amplificação com resíduos de DNA genômico que frequentemente são encontrados após a extração de RNA. Todavia os iniciadores utilizados para amplificação de Actb e Gapdh amplificam também DNA genômico. Por isso foi realizado o tratamento com DNase para a degradação deste contaminante, que não prejudica significativamente a qualidade das amostras de RNA.

O cálculo do NRE dos genes das citocinas testadas foi realizado pela fórmula da Equação 1 (item 4.7.5) que utiliza como calibrador a média dos dados de expressão do grupo salina e os genes de referência Actb e Gapdh, que são expressos de maneira constante entre os diferentes tecidos e não são alterados de forma significativa pelos tratamentos experimentais (GIULIETTI et al., 2001). Além disso, no trabalho de padronização da RT-qPCR utilizada neste trabalho foi constatado que reações com eficiência entre 80-110%, mesmo fora da faixa descrita por Livak e Shimittgen (2001) de 90-110%, apresentaram bons parâmetros de especificidade e reprodutibilidade (STEINBERG et al., 2012).

Os efeitos dos dextranos sobre a expressão gênica das citocinas IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p40, IL-17, IFN- γ , TGF- β e TNF- α estão expressos graficamente nas Figuras de 16 a 23 e foram estatisticamente relevantes para IL-10, TGF- β e TNF- α . Os camundongos do grupo tratado com dextrano 1P3 apresentaram uma redução de IL-10 ($p = 0,015$) e TGF- β ($p = 0,042$) enquanto os do grupo tratado com dextrano 10P2 apresentaram um aumento de TNF- α ($p = 0,050$) quando comparado com o grupo controle.

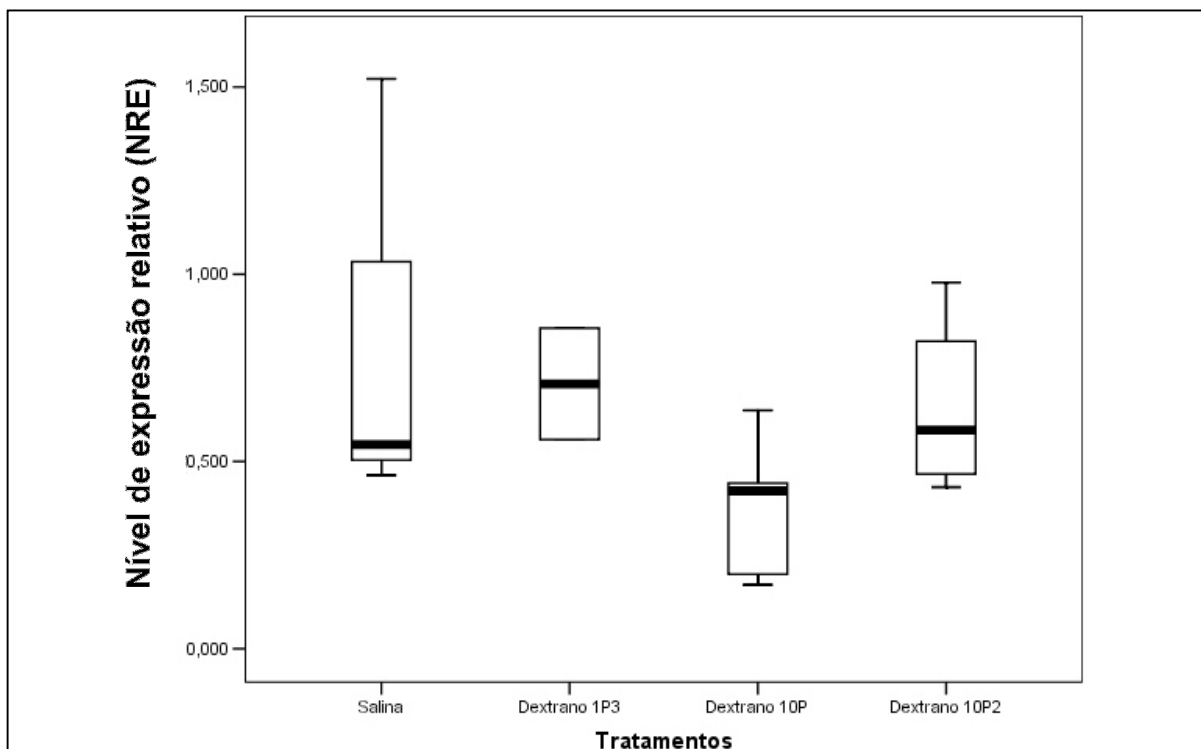


Figura 16 - Efeito dos dextrans no intestino delgado sobre a produção de IL-5 em camundongos CV. Os valores da tabela indicam o nível relativo de expressão da IL-5 nos grupos testes comparado com o grupo salina.

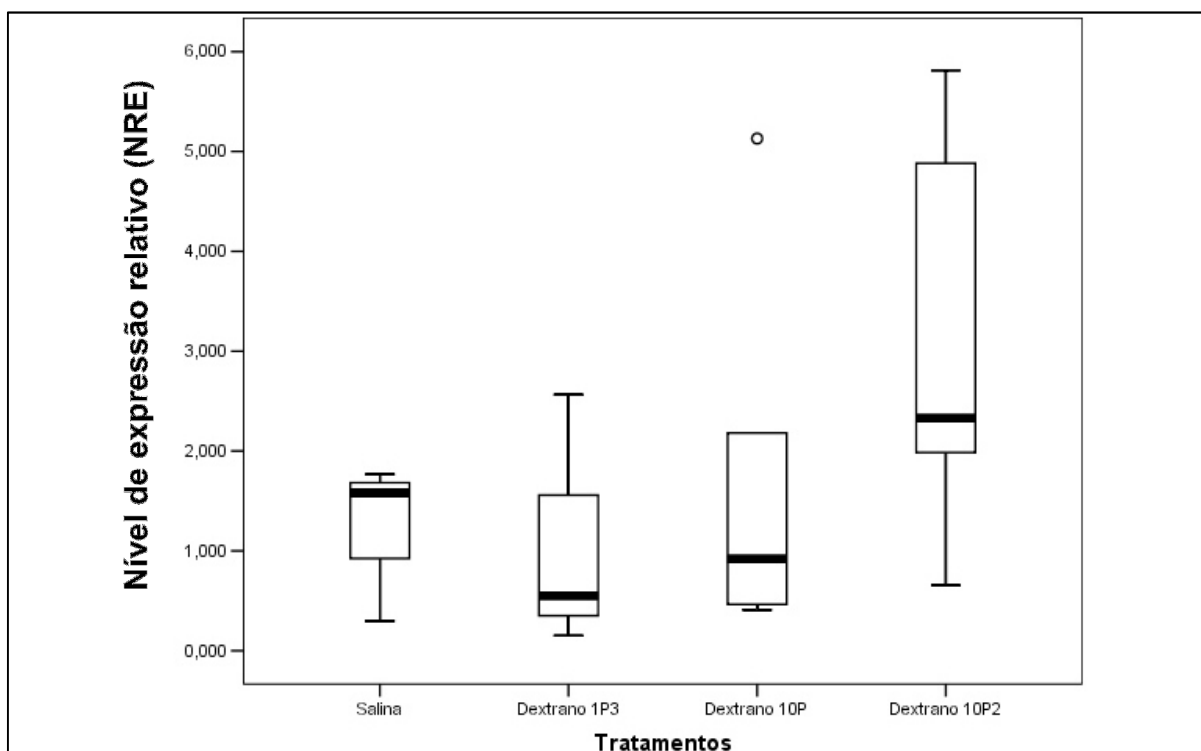


Figura 17 - Efeito dos dextrans no intestino delgado sobre a produção de IL-6 em camundongos CV. Os valores da tabela indicam o nível relativo de expressão da IL-6 nos grupos testes comparado com o grupo salina.

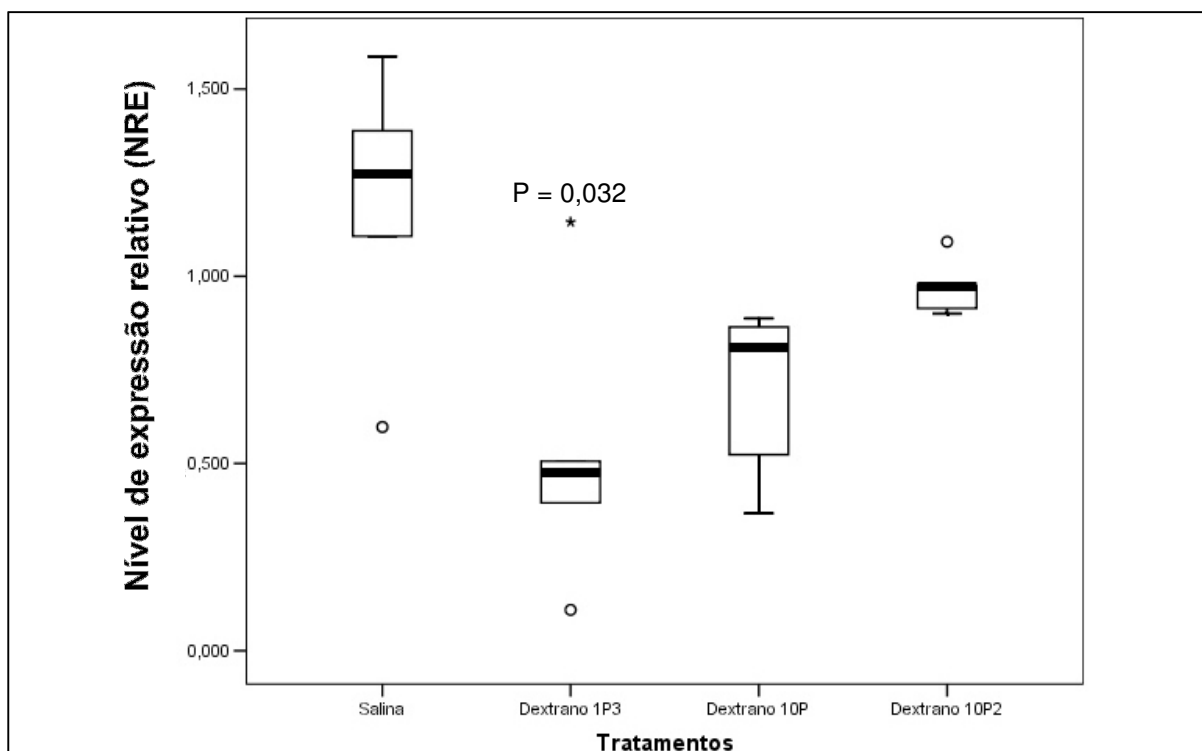


Figura 18 - Efeito dos dextrans no intestino delgado sobre a produção de IL-10 em camundongos CV. Os valores da tabela indicam o nível relativo de expressão da IL-10 nos grupos testes comparado com o grupo salina.

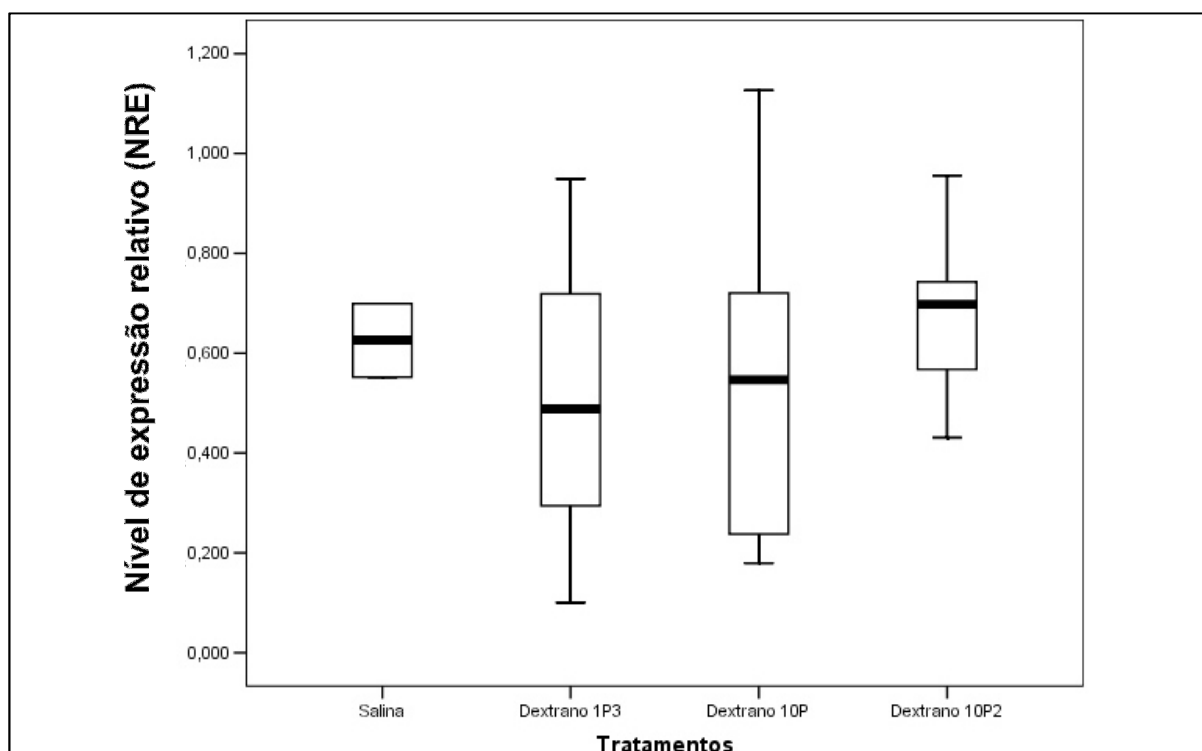


Figura 19 - Efeito dos dextrans no intestino delgado sobre a produção de IL-12p40 em camundongos CV. Os valores da tabela indicam o nível relativo de expressão da IL-12p40 nos grupos testes comparado com o grupo salina.

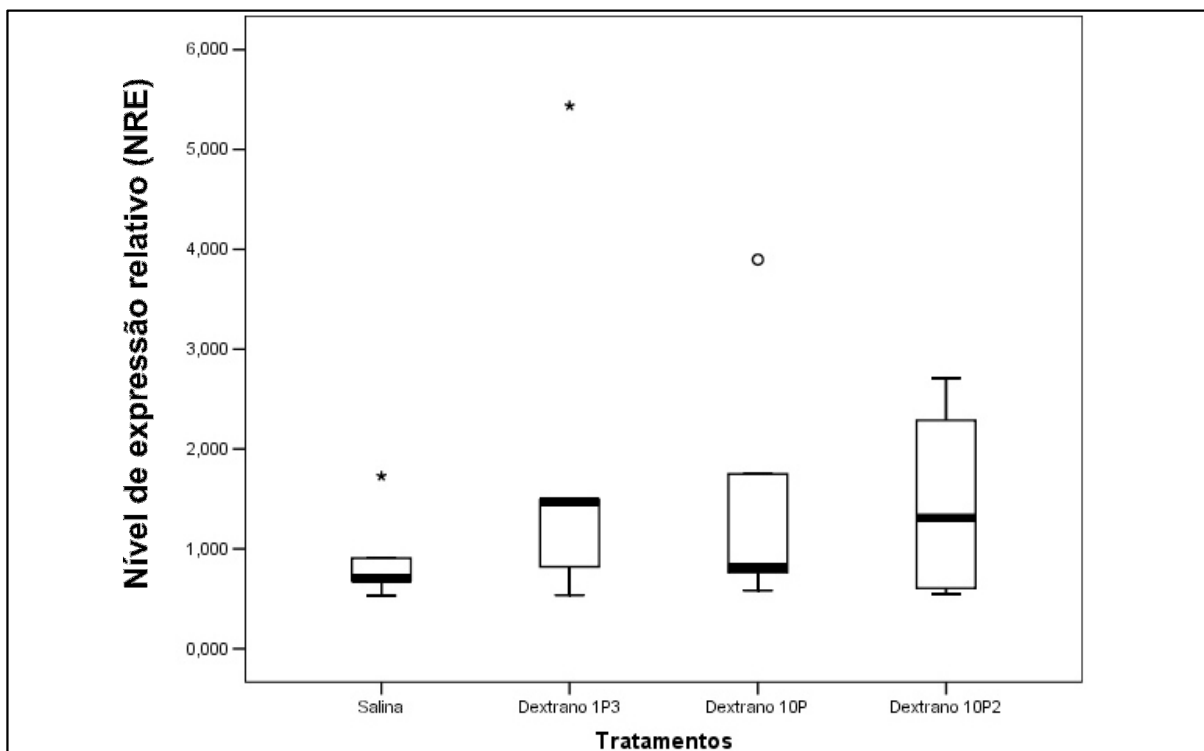


Figura 20 - Efeito dos dextrans no intestino delgado sobre a produção de IL-17 em camundongos CV. Os valores da tabela indicam o nível relativo de expressão da IL-17 nos grupos testes comparado com o grupo salina.

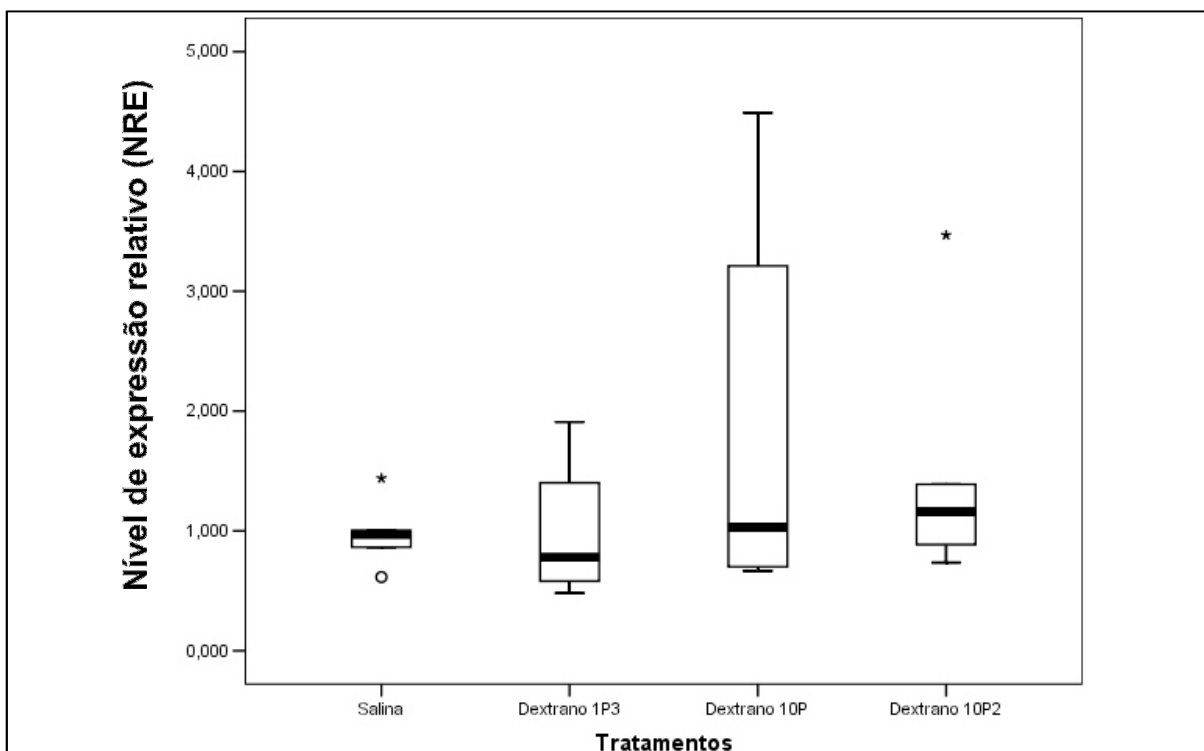


Figura 21 - Efeito dos dextrans no intestino delgado sobre a produção de IFN- γ em camundongos CV. Os valores da tabela indicam o nível relativo de expressão do IFN- γ nos grupos testes comparado com o grupo salina.

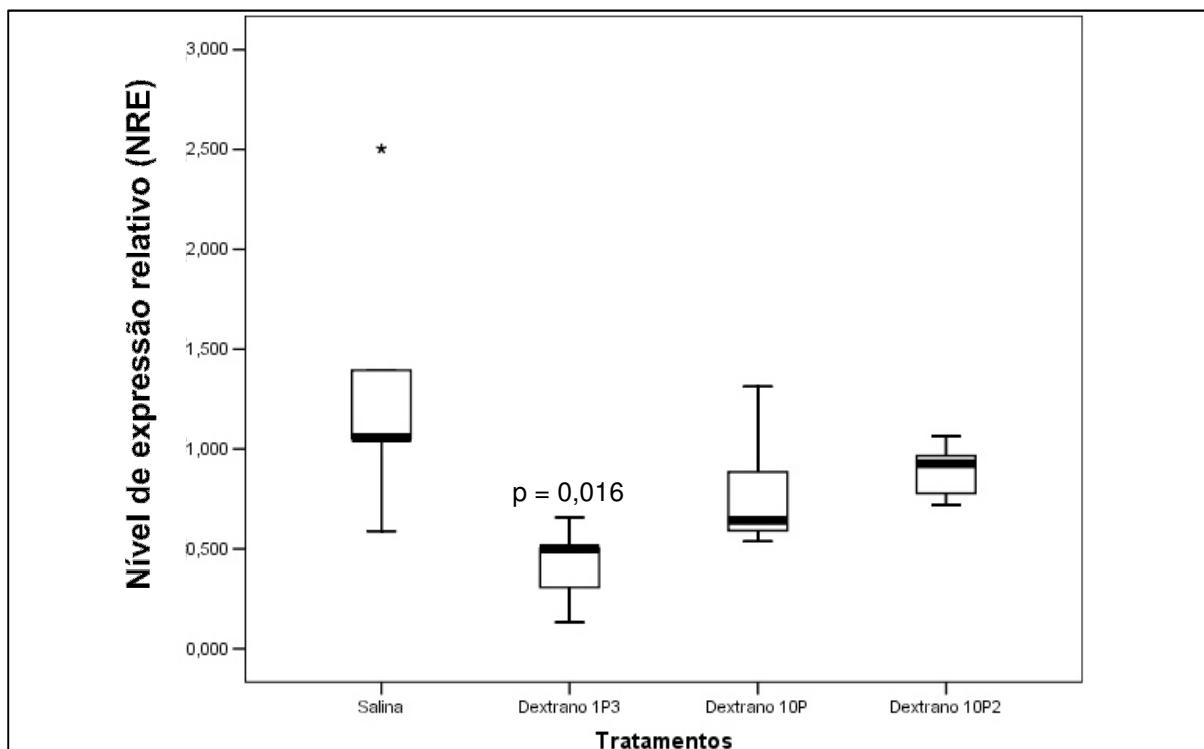


Figura 22 - Efeito dos dextransos no intestino delgado sobre a produção de TGF- β em camundongos CV. Os valores da tabela indicam o nível relativo de expressão do TGF- β nos grupos testes comparado com o grupo salina.

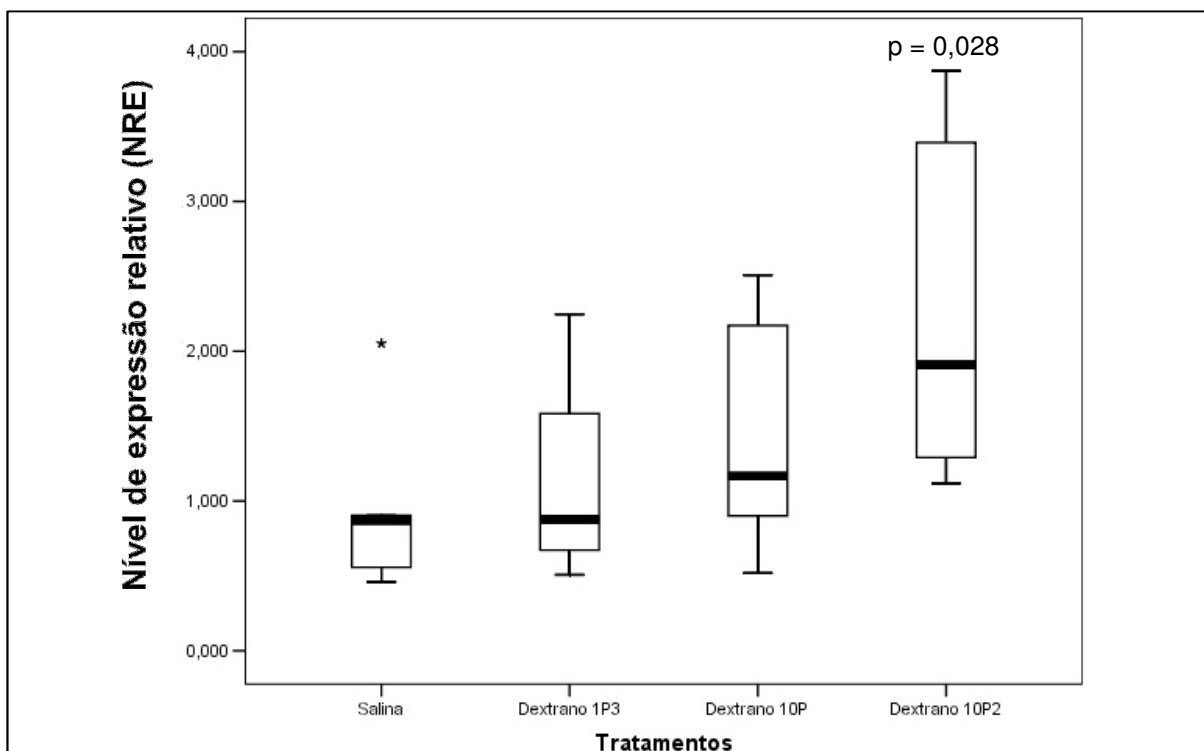


Figura 23 - Efeito dos dextransos no intestino delgado sobre a produção de TNF- α em camundongos CV. Os valores da tabela indicam o nível relativo de expressão do TNF- α nos grupos testes comparado com o grupo salina.

A IL-10 é descrita como uma citocina reguladora da resposta inflamatória. Esta característica é bastante evidenciada por experimentos em camundongos IL-10 *knockout* (IL-10^{-/-}) em que é observado o desenvolvimento de enterocolites crônicas, constituindo um dos principais modelos animais para o estudo das doenças inflamatórias intestinais (O'FARRELL et al., 1998). Da mesma forma o TGF- β atua no controle da ativação de macrófagos e tem sido amplamente utilizado como um mecanismo para o controle de inflamações e de doenças autoimunes (CHEN; SHARON; WAHL, 1999). Já o TNF- α é uma citocina que está altamente relacionada a processos inflamatórios, sendo utilizado como marcador de processos inflamatórios em pacientes com doenças inflamatórias intestinais (BRAEGGER et al., 1992).

Desta forma, os dextrans em questão provavelmente apresentam atividade pro-inflamatória. Mesmo nos grupos onde não houve diferenças significativas foi possível observar uma tendência de redução de IL-10 e TGF- β e aumento de TNF- α . No entanto, nos cortes histológicos de íleo corados com hematoxilina e eosina (HE) não foi identificada nenhuma anormalidade no padrão histológico, indicando que a administração dos dextrans não modificou a arquitetura do tecido, nem contribuiu para alterações inflamatórias exacerbadas.

O aumento da expressão de TNF- α é indicativo de um maior número de macrófagos na *lamina propria* o que pode facilitar a apresentação de antígeno para células Th2, que estão envolvidas na diferenciação de células B para plasmócitos. Isto pode ser uma possível explicação para o aumento observado na produção de IgA (MEDRANO et al. 2011).

Bittencourt et al. (2006) demonstraram que moléculas de α -glicanos produzidas pelo fungo *Pseudallescheria boydii* desencadearam a ativação de macrófagos por um mecanismo diferente dos β -glicanos, uma vez que o receptor dectina-1 não foi essencial para o processo. A resposta imune contra a infecção por *P. boydii* é caracterizada por uma forte inflamação, fagocitose e eliminação do invasor. Desta forma foi observado a indução na secreção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α por macrófagos.

Vinderola et al. (2006) estudaram o efeito de um heteropolímero produzido por *L. kefiranofaciens* pela administração por 2, 5 e 7 dias. Foi observado um aumento

significativo nas populações de células produtoras de IgA no intestino delgado em apenas 2 dias de tratamento. Estes EPS também tiveram efeitos na produção de citocinas no intestino delgado, aumentando IL-10 apenas no dia 7 e IL-6 e IL-12 nos dias 5 e 7. Portanto, se faz necessário um estudo dos efeitos imunomodulador destes dextranos em diferentes tempos, bem como em diferentes doses.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram a identificação de 16 cepas produtoras de exopolissacarídeos, pertencente ao gênero *Lactobacillus* e isolados de amostras brasileiras de grãos de Kefir de água e de leite.

Dentre as cepas produtoras de exopolissacarídeo, os *L. kefiranofaciens* 1P3, *L. satsumensis* 10P e 10P2 e *L. parafarraginis* 12P tiveram seus genes *gtf* caracterizados. As sequências de nucleotídeo destas 4 cepas apresentaram alta identidade entre si (99-100%) e baixa identidade (74-75%) com o gene *gtf* da cepa de *L. hilgardii* TMW1828 que coincidentemente foi isolada de grãos de Kefir de água.

A caracterização estrutural dos exopolissacarídeos produzidos por *L. kefiranofaciens* 1P3, *L. satsumensis* 10P e 10P2, *L. parafarraginis* 12P e *L. mali* 19U comprovou que se tratam de moléculas de dextrano muito semelhantes constituídas por resíduos de D-glicose unidos em média por 92% de ligações glicosídicas $\alpha(1,6)$ e 8% de ramificações $\alpha(1,4)$. A massa molecular destes biopolímeros foi superior a 500 KDa.

O tratamento por 7 dias com dextrano foi capaz modular a resposta imune em camundongos. Foi observado uma estimulação na produção de IgA e TNF- α além de uma redução de IL-10 e TGF- β , indicando uma possível atividade pro-inflamatória não exacerbada no intestino delgado.

Portanto, os grãos de Kefir são uma fonte constante de exopolissacarídeos produzidos por bactérias do ácido láctico, que apresentam grande potencial biotecnológico. Todavia a busca por novos polímeros e por novas aplicações deve caminhar em conjunto com uma adequada caracterização estrutural destas moléculas.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia Celular e Molecular**. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2005.

ALANDER, M.; SATOKARI, R.; KORPELA, R.; VILPPONEN-SALMELA, T.; MATTILA-SANDHOLM, T.; VON WRIGHT, A. Persistence of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG, after oral consumption. **Applied and environmental microbiology**, v. 65, n. 1, p. 351-354, 1999.

ARANTES, R. M.; NOGUEIRA, A. M. Distribution of enteroglucagon and peptide YY-immunoreactive cells in the intestinal mucosa of germ-free and conventional mice. **Cell and Tissue Research**, v. 290, n.1, p. 61-69, 1997.

AZEREDO, J.; OLIVEIRA, R. A New Method for Precipitating Bacterial Exopolysaccharides. **Biotechnology Techniques**, v. 10, n. 5, p. 341-344, 1996.

BADEL, S.; BERNARDI, T.; MICHAUD, P. New perspectives for Lactobacilli exopolysaccharides. **Biotechnology advances**, v. 29, n. 1, p. 54-66, 2011.

BARAN, Z. The Caucasus: Ten years after independence. **The Washington Quarterly**, v. 25, n. 1, p. 221-234, 2002.

BELDER A. N. **Dextran**. Amersham Biosciences, Edition AA, 2003.

BERNARDEAU, M.; VERNOUX, J. P.; HENRI-DUBERNET, S.; GUÉGUEN, M. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Lactobacillus* genus. **International journal of food microbiology**, v. 126, n. 3, p. 278-85, 2008.

BITTENCOURT, V. C. B.; FIGUEIREDO, R. T.; SILVA, R. B.; MOURÃO-SÁ, D. S.; FERNANDEZ, P. L.; SASSAKI, G. L.; MULLOY, B.; BOZZA, M. T.; BARRETO-BERGTER, E. An alpha-glucan of *Pseudallescheria boydii* is involved in fungal phagocytosis and Toll-like receptor activation. **The Journal of biological chemistry**, v. 281, n. 32, p. 22614-22623, 2006.

BOUNAIX, M. S.; GABRIEL, V.; MOREL, S.; ROBERT, H.; RABIER, P.; REMAUD-SIMÉON, M.; GABRIEL, B.; FONTAGNÉ-FAUCHER, C. Biodiversity of exopolysaccharides produced from sucrose by sourdough lactic acid bacteria. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, n. 22, p. 10889-10897, 2009.

BRAEGGER, C. P.; NICHOLLS, S.; MURCH, S. H.; STEPHENS, S.; MACDONALD, T. T. Tumour necrosis factor alpha in stool as a marker of intestinal inflammation. **The Lancet**, v. 339, p. 89-91, 1992.

BRADFORD M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.7, n.72, p.248-254, 1976.

CAZY. Carbohydrate-Active Enzymes Database. Disponível em: < <http://www.cazy.org>> Acesso em 09/01/2013.

CHAN, G. C. F.; CHAN, W. K.; SZE, D. M. Y. The effects of beta-glucan on human immune and cancer cells. **Journal of hematology & oncology**, v. 2, p. 1-11, 2009.

CHEIRSILP, B.; SHOJI, H.; SHIMIZU, H.; SHIOYA, S. Interactions between *Lactobacillus Kefiranofaciens* and *Saccharomyces cerevisiae* in mixed culture for Kefiran production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 96, n. 3, p. 279-284, 2003.

CHEN, W.; WAHL, S. M. Manipulation of TGF-beta to control autoimmune and chronic inflammatory diseases. **Microbes and infection**, v. 1, n. 15, p. 1367-1380, 1999.

CÔTÉ G. L. Acceptor products of alternansucrase with gentiobiose. Production of novel oligosaccharides for food and feed and elimination of bitterness. **Carbohydrate Research**, v. 344, n 2, p. 187-190, 2009.

EBAY. Disponível em <<http://www.ebay.com>>. Acesso em 15/01/2013.

ENIKEEV, R. Development of a new method for determination of exopolysaccharide quantity in fermented milk products and its application in technology of Kefir production. **Food Chemistry**, v. 134, n. 4, p. 2437-2441, 2012.

EUZÉBY, J. P. List of Prokaryotic names with standing in nomenclature. Genus *Lactobacillus* (2013). Disponível em <<http://www.bacterio.cict.fr/l/lactobacillus.html>>. Acesso em 22/01/2013.

EYERICH, S.; EYERICH, K.; CAVANI, A.; SCHMIDT-WEBER, C. IL-17 and IL-22: siblings, not twins. **Trends in immunology**, v. 31, n. 9, p. 354-361, 2010.

FELIS, G. E.; DELLAGLIO, F. Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria. **Current Issues in Intestinal Microbiology**, v. 8, p. 44-61, 2005.

FONTÁN, M. C. G.; MARTÍNEZ, S.; FRANCO, I.; CARBALLO, J. Microbiological and chemical changes during the manufacture of Kefir made from cows' milk, using a commercial starter culture. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 7, p. 762-767, 2006.

FRENGOVA, G. I.; SIMOVA, E. D.; BESHKOVA, D. M.; SIMOV, Z. I. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria of Kefir grains. **Zeitschrift für Naturforschung. C**, v. 57, n. C, p. 805-810, 2002.

FURUNO, T.; NAKANISHI, M. Kefiran suppresses antigen-induced mast cell activation. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 35, n. 2, p. 178-183, 2012.

GARNER, R. E.; CHILDRESS, A. M.; HUMAN, L. G.; DOMER, J. E. Characterization of *Candida albicans* mannan-induced, mannan-specific delayed hypersensitivity suppressor cells. **Infection and immunity**, v. 58, n. 8, p. 2613-2620, 1990.

GARROTE, G. L.; ABRAHAM, A. G.; ANTONI, G. L. DE. Chemical and microbiological characterisation of Kefir grains. **Journal of Dairy Research**, v. 68, n. 4, p. 639-652, 2001.

GEVERS, D.; HUYS, G.; SWINGS, J. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. **FEMS microbiology letters**, v. 205, p. 31-36, 2001.

GIBSON, G. R.; RASTALL, R. A. **Prebiotics: Development & Application**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2006.

GIULIETTI, A.; OVERBERGH, L.; VALCKX, D.; DECALLONNE, B.; BOUILLON, R.; MATHIEU, C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 386-401, 2001.

GÜVEN, A.; GÜVEN, A.; GÜLMEZ, M. The effect of Kefir on the activities of GSH-Px, GST, CAT, GSH and LPO levels in carbon tetrachloride-induced mice tissues. **Journal of veterinary medicine**, v. 50, n. 8, p. 412-6, 2003.

HAMMES, W. P.; VOGEL, R. F. **The genus *Lactobacillus***. Glasgow, UK: Blackie Academic & Professional, 1995.

HELLEMANS, J.; MORTIER, G.; PAEPE, A. D.; SPELEMAN, F.; VANDESOMPELE, J. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. **Genome Biology**, v. 8, n. 2, p. R19, 2007.

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

HSIEH, H. H.; WANG, S. Y.; CHEN, T. L.; HUANG, Y. L.; CHEN, M. J. 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, n. 1, p. 73-81, 2012.

KALKA-MOLL, W. M.; TZIANABOS, A. O.; BRYANT, P. W.; NIEMEYER, M.; PLOEGH, H. L.; KASPER, D. L. Zwitterionic polysaccharides stimulate T cells by MHC class II-dependent interactions. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 169, n. 11, p. 6149-6153, 2002.

KOOIMAN, P. The chemical structure of Kefiran, the water-soluble polysaccharide of the Kefir grain. **Carbohydrate Research**, v. 7, n. 2, p. 200-211, 1968.

KRALJ, S.; GEEL-SCHUTTEN, G. H. VAN; RAHAOUI, H.; LEER, R. J.; FABER, E. J.; VAN DER MAAREL, M. J. E. C.; DIJKHUIZEN, L. Molecular Characterization of a Novel Glucosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* Strain 121 Synthesizing a Unique , Highly Glucosidic Bonds. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 9, p. 4283-4291, 2002.

KRALJ, S.; VAN GEEL-SCHUTTEN, G. H.; VAN DER MAAREL, M. J. E. C.; DIJKHUIZEN, L. Efficient Screening Methods for Glucosyltransferase Genes in *Lactobacillus* Strains. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 21, n. 4-5, p. 181-187, 2003.

KRALJ, S.; GEEL-SCHUTTEN, G. H. VAN; FABER, E. J.; MAAREL, M. J. E. C. VAN DER; DIJKHUIZEN, L. Rational transformation of *Lactobacillus reuteri* 121 reuteransucrase into a dextransucrase. **Biochemistry**, v. 44, n. 25, p. 9206-9216, 2005.

LAMOTHE, G. T.; JOLLY, L.; MOLLET, B.; STINGELE, F. Genetic and biochemical characterization of exopolysaccharide biosynthesis by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. **Archives of microbiology**, v. 178, n. 3, p. 218-228, 2002.

LAROUI, H.; INGERSOLL, S. A.; LIU, H. C.; BAKER, M. T.; AYYADURAI, S.; CHARANIA, M. A.; LAROUI, F.; YAN, Y.; SITARAMAN, S. V.; MERLIN, D. Dextran sodium sulfate (DSS) induces colitis in mice by forming nano-lipocomplexes with medium-chain-length fatty acids in the colon. **PloS one**, v. 7, n. 3, p. e32084, 2012.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

LOPITZ-OTSOA, F.; REMENTERIA, A.; ELGUEZABAL, N.; GARAIZAR, J. Kefir: A symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 23, n. 2, p. 67-74, 2006.

LUTZ, M. L. Recherches biologique sur la constitution du Tibi. **Bulletin de la Société Mycologique de France**, v. 15, p. 68-72, 1899.

MAEDA, H.; ZHU, X.; SUZUKI, S.; SUZUKI, K.; KITAMURA, S. Structural characterization and biological activities of an exopolysaccharide Kefiran produced by *Lactobacillus Kefiranofaciens* WT-2B(T). **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 52, n. 17, p. 5533-5538, 2004.

MAGALHÃES, K. T.; PEREIRA, G. V. M.; CAMPOS, C. R.; DRAGONE, G.; SCHWAN, R. F. Brazilian Kefir: structure, microbial communities and chemical composition. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 693-702, 2011.

MALIK, A.; RADJI, M.; KRALJ, S.; DIJKHUIZEN, L. Screening of lactic acid bacteria from Indonesia reveals glucansucrase and fructansucrase genes in two different *Weissella confusa* strains from soya. **FEMS microbiology letters**, v. 300, n. 1, p. 131-138, 2009.

MARTINS, F. S.; SILVA, A. A.; VIEIRA, A. T.; BARBOSA, F. H. F.; ARANTES, R. M. E.; TEIXEIRA, M. M.; NICOLI, J. R. Comparative study of *Bifidobacterium animalis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus casei* and *Saccharomyces boulardii* probiotic properties. **Archives of Microbiology**, v. 191, n. 8, p. 623-630, 2009.

MEDRANO, M.; HAMET, M. F.; ABRAHAM, A. G.; PÉREZ, P. F. Kefiran protects Caco-2 cells from cytopathic effects induced by *Bacillus cereus* infection. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 96, n. 4, p. 505-513, 2009.

MEDRANO, M.; RACEDO, S. M.; ROLNY, I. S.; ABRAHAM, A. G.; PÉREZ, P. F. Oral administration of Kefiran induces changes in the balance of immune cells in a murine model. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, n. 10, p. 5299-5304, 2011.

MICHELI, L.; UCCELLETTI, D.; PALLESCHI, C.; CRESCENZI, V. Isolation and characterisation of a ropy *Lactobacillus* strain producing the exopolysaccharide Kefiran. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 53, n. 1, p. 69-74, dez 1999.

MONCHOIS, V.; WILLEMOT, R. M.; MONSAN, P. Glucansucrases: mechanism of action and structure-function relationships. **FEMS microbiology reviews**, v. 23, n. 2, p. 131-151, 1999.

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

MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. **Imunobiologia de Janeway**. 7 ed. São Paulo: Artemed. 2010.

O'FARRELL, A. M.; LIU, Y.; MOORE, K. W.; MUI, A. L. F. IL-10 inhibits macrophage activation and proliferation by distinct signaling mechanisms: evidence for Stat3-dependent and -independent pathways. **The EMBO journal**, v. 17, n. 4, p. 1006-18, 1998.

PATEL, S.; MAJUMDER, A.; GOYAL, A. Potentials of Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria. **Indian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 3-12, 2011.

PERDIGÓN, G.; ALVAREZ, S.; MEDINA, M.; VINTIÑI, E.; ROUX, E. Influence of the oral administration of lactic acid bacteria on IgA producing cells associated to bronchus. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 12, n. 2, p. 97-102, 1999.

PETROVSKY, N.; COOPER, P. D. Carbohydrate-based immune adjuvants. **Expert Review of Vaccines**, v. 10, n. 4, p. 523-537, 2011.

PIERMARIA, J. A.; PINOTTI, A.; GARCIA, M. A.; ABRAHAM, A. G. Films based on kefir, an exopolysaccharide obtained from kefir grain: Development and characterization. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 684-690, 2009.

PIDOUX, M.; BRILLOUET, J. M.; QUEMENER, B. Characterization of the polysaccharides from a *Lactobacillus brevis* and from sugary Kefir grains. **Biotechnology Letters**, v. 10, n. 6, p. 415-420, 1988.

PONTES, D. S.; LIMA-BITTENCOURT, C. I.; CHARTONE-SOUZA, E.; NASCIMENTO, A. M. A. Molecular approaches: advantages and artifacts in assessing bacterial diversity. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 34, n. 7, p. 463-73, 2007.

PORPORATTO, C.; BIANCO, I. D.; CORREA, S. G. La modulación del sistema inmune de mucosas con polisacáridos. **Inmunología**, v. 41, n. 2, p. 203-212, 2007.

PUERARI, C.; MAGALHÃES, K. T.; SCHWAN, R. F. New cocoa pulp-based Kefir beverages: Microbiological, chemical composition and sensory analysis. **Food Research International**, v. 48, n. 2, p. 634-640, 2012.

RAZALI, N. M.; WAH, Y. B. Power comparisons of Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors and Anderson-Darling tests. **Journal of Statistical Modeling and Analytics**, v. 2, n. 1, p. 21-33, 2011.

RIZOLI, S. B.; RHIND, S. G.; SHEK, P. N.; INABA, K.; FILIPS, D.; TIEN, H.; BRENNEMAN, F.; ROTSTEIN, O. The Immunomodulatory Effects of Hypertonic Saline Resuscitation in Patients Sustaining Traumatic Hemorrhagic Shock. **Annals of Surgery**, v. 243, n. 1, p. 47-57, 2006.

ROBYT, J. F.; KIMBLE, B. K.; WALSETH, T. F. The mechanism of Dextranucrase action: Direction of Dextran Biosynthesis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 165, v. 2, p. 634-640, 1974.

ROBYT, J. F.; TANIGUCHI, H. The Mechanism of dextranucrase action. Biosynthesis of branch linkages by acceptor reactions with dextran. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 174, n. 1, p.129-135, 1976.

RODRIGUES, K. L.; CAPUTO, L. R. G.; CARVALHO, J. C. T.; EVANGELISTA, J.; SCHNEEDORF, J. M. Antimicrobial and healing activity of Kefir and Kefiran extract. **International journal of antimicrobial agents**, v. 25, n. 5, p. 404-408, 2005.

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

SHIOMI, M.; SASAKI, K.; MUROFUSHI, M.; AIBARA, K. Antitumor activity in mice of orally administered polysaccharide from Kefir grain. **Japanese Journal of Medical Science & Biology**, v.35, n.2, p. 75-80, 1982.

SHUKLA, R.; SHUKLA, S.; BIVOLARSKI, V.; ILIEV, I.; IVANOVA, I.; GOYAL, A. Structural Characterization of Insoluble Dextran Produced by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1149 in the Presence of Maltose. **Food Technology and Biotechnology**, v. 49, n. 3, p. 291-296, 2011.

STEINBERG, R. S.; LIMA, M. T.; ABATEMARCO JUNIOR, M.; OLIVEIRA, N. L. G.; SOUZA, T. C.; CAMPOS, M. H. A.; MIYOSHI, A.; NICOLI, J. R.; NEUMANN, E.; NUNES, A. C. Immunomodulatory profile of two strains of cattle *Lactobacillus* in a salmonellosis murine model using RT-qPCR. In: 58º Congresso brasileiro de Genética, Foz do Iguaçu, PR. Anais (GM026), 2012, p. 192.

STILES, M. E.; HOLZAPFEL, W. H. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 1-29, 1997.

TZIANABOS, A. O. Polysaccharide Immunomodulators as Therapeutic Agents: Structural Aspects and Biologic Function Polysaccharide Immunomodulators as Therapeutic Agents: Structural Aspects and Biologic Function. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 4, p. 523-533, 2000.

VAN HIJUM, S. A. F. T.; VAN GEEL-SCHUTTEN, G. H.; RAHAOUI, H.; VAN DER MAAREL, M. J. E. C.; DIJKHUIZEN, L. Characterization of a Novel Fructosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* That Synthesizes High-Molecular-Weight Inulin and Inulin Oligosaccharides. **Applied and environmental microbiology**, v. 68, n. 9, p. 4390-4398, 2002.

VINDEROLA, G.; PERDIGÓN, G.; DUARTE, J.; FARNWORTH, E.; MATAR, C. Effects of the oral administration of the products derived from milk fermentation by Kefir microflora on immune stimulation. **The Journal of dairy research**, v. 73, n. 4, p. 472-429, 2006.

VUYST, L. D.; DEGEEST, B. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. **FEMS microbiology reviews**, v. 23, n. 2, p. 153-177, 1999.

WALDHERR, F. W.; DOLL, V. M.; MEISSNER, D.; VOGEL, R. F. 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, n. 5, p. 672-678, 2010.

WANG, Y.; AHMED, Z.; FENG, W.; LI, C.; SONG, S. Physicochemical properties of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus Kefiranofaciens* ZW3 isolated from Tibet Kefir. **International journal of biological macromolecules**, v. 43, n. 3, p. 283-288, 2008.

WARD, H. M. The ginger-beer plant, and the organisms composing it: A contribution to the study of fermentation-yeasts and bacteria. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, v. 183, p. 125-197, 1892.

YÜKSEKDAG, Z. N.; BEYATH, Y.; ASLIM, B. Metabolic activities of *Lactobacillus* spp. strains isolated from Kefir. **Die Nahrung**, v. 48, n. 3, p. 218-220, 2004.

ZANIRATI, D. F.; ABATEMARCO Jr. M.; SANDES, S. H. C.; PAIVA, I. M.; NICOLI, J. R.; NUNES, A. C.; NEUMANN, E. Characterization of Lactic Acid Bacteria from Brazilian Kefir Milk and Sugar Kefir Grains by Culture-Dependent and Culture-Independent Methods. In. XI Congresso Latinoamericano de Microbiología e Higiene de Alimentos, Buenos Aires, Anais (0290), 2012, p.94.

APÊNDICE

Apêndice A - Alinhamento das sequências de nucleotídeos e aminoácidos dos *amplicons* da região do gene *gtf* que codifica o centro catalítico das glicosiltransferases pertencente à bactérias isoladas de grãos de Kefir do gênero *Lactobacillus* com as sequências depositadas no *GenBank* utilizando os algoritmos nucleotide BLAST e protein BLAST.

>003_(*L. Kefiranofaciens* 1P3 reverse)

```
GTGCATAGACGAGGGATGTTGTATGCGGTATACTTTTTATCAGCCTGTAATTCGTCAAGATTGTAAT
CTTAAAGGCTTGTGCAATTTCTTCAGGGGTCACGGTCAATCCGTCAGAGTTTGGATTAATGTGATCTT
TAATAATCTGTGCAATAACGGTCTGGACCTCGCTATCATGCGCCCGAATAAAAGAATAATTGGGTTGC
GCTCCGCTTTCAGCTGCATTATCATTGTACGATTAAGCTGGTCGTCAGATTGGCTTCTAAGTT
GCTCCGCTGACCCAGTGGCGTATTCAATGAGTATTTAAGCGCTAAGTGAATCGGAAAATCCATTGTTA
ATTGATTATTTCCATGTTCTTTAACATAAGCTGCGTCACTGCTCTCCAGTCTTCTAGGATTGATAAA
TGACGATTGGCGTTAGCATCGTTCTGATTAGTTCCATATGCAGCTTTAAAATAATCACCTGCAATTTG
TAACAAATCGGCATCAACATTATCGACTGCATCGACGCGATAACCATCAAAGTTGGCACTTGAATCAT
TGCCAGCAATAGTTCGGATATTCATCATATAATACAGCCAGTTCAGCTGTTCTGCCTGCACCACCGGA
TCCCAATT
```

[emb|FN662554.1|](#) *Lactobacillus hilgardii* *gtf* gene for **glucosyltransferase**, strain TMW 1.828

Length = 6719

Score = 396 bits (438), Expect = $1 * 10^{-106}$

Identities = 449/602 (75%), Gaps = 0/602 (0%)

Strand = Plus/Minus

```
Query 12 AGGGATGTTGTATGCGGTATACTTTTTATCAGCCTGTAATTCGTCAAGATTGTAATCTT 71
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 2814 AGGAATATATAAGCGGTATATTGTTTATTAGCTAATAATTCATCGGAGTTGTATATTTT 2755

Query 72 AAAGGCTTGTGCAATTTCTTCAGGGGTCACGGTCAATCCGTCAGAGTTTGGATTAATGTG 131
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 2754 AAAAGCCTGACTTATTTCACTAGGGGTAAGTGTCAATCCATCAGAATTAGGGTCAATTTT 2695

Query 132 ATCTTTAATAATCTGTGCAATAACGGTCTGGACCTCGCTATCATGCGCCCGAATAAAAGA 191
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 2694 ATCCTTAATAATCTGTGCAATAACTGTCTGTACTTCACTATCATGTGCTCTTATAAATGA 2635

Query 192 ATAATTGGGTTGCGCTCCGCTTTCAGCTGCATTATCATTGTACGATTAAGCTGGT 251
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 2634 ATAGTTTGGTTGTGCAATATTTTCGGTTGAATCATCACCAGACCGATTGACCAAACCTAGT 2575

Query 252 CGTCAGATTGGCTTCTAAGTTGCTCCGCTGACCCAGTGGCGTATTCAATGAGTATTTAAG 311
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 2574 TGTTAATCTGGTTCTAAGCCACTACGTTGATCTACTGGCATATTTAATGAGTACTTAAT 2515
```

```

Query 312 CGCTAAGTGAATCGGAAAATCCATTGTTAATTGATTATTTCCATGTTCTTTAACATAAGC 371
      ||||| ||||| || ||||| || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct 2514 AGCTAAATGAACAGGGAAATCCATGGATAATTGATTATTTCCATTTTCTTTAACAGATGT 2455

Query 372 TGCCTCACTGCTCTCCCAGTCTTCTAGGATTGATAAATGACGATTGGCGTTAGCATCGTT 431
      || ||| ||| | ||| ||||| ||||| ||||| ||| || || ||||| ||
Sbjct 2454 TGGATCATCGCTATTCCAATCTTCTAGTATTGATAAATGTTTATTAGCATTGGCATCATT 2395

Query 432 CTGATTAGTTCATATGCAGCTTTAAAATAATCACCTGCAATTTGTAACAAATCGGCATC 491
      ||||| ||| || ||| | || ||||| || || ||||| | ||||| |||||
Sbjct 2394 TTGATTGTTTGTACGCATCCTTGCTATAATCAGCGGCTATTTGAAGCAAATCGGCATC 2335

Query 492 AACATTATCGACTGCATCGACGCGATAACCATCAAAGTTGGCACTTGAATCATTGCCAGC 551
      ||||| || || || || || || ||||| || || ||||| ||||| |||
Sbjct 2334 TACATTATCAACGGCGTCTACTCGGTAACCATCGAAATTAGCACTTGAATCATTAGCAGT 2275

Query 552 AATAGTTCGATATTCATCATATAATACAGCCAGTTCAGCTGTTCTGCCTGCACCACCGG 611
      ||| | ||| ||||| ||||| ||||| ||| | ||||| || || || || ||
Sbjct 2274 AATTGATCCAATATTCATCATATAATATAGCCAATTTAATTGTTCCGCTTGAACACTG 2215

Query 612 AT 613
      ||
Sbjct 2214 AT 2213

```

>003aa_(*L. Kefiranofaciens* 1P3)

**LNWLYYMMNIGTIAGNDSSANFDGYRVDVNDVDADLLQIAGDYFKAAYGTNQN DANANRHLSILEDW
ESSDAAYVKEHGNNQLTMDFP IHLALKYSLNTP LGQRSNLEANLTTSLVNRTNDNAAESGAQPNYSFI
RAHDSEVQTVIAQIIKDHINPNSDGLTVTPEEIAQAFKIYNLDELQADKKYTAYNIPRLC**

emb|CBJ19544.1| **glucosyltransferase** [Lactobacillus hilgardii]

Length = 1448

Score = 319 bits (817), Expect = $6 * 10^{-98}$

Identities = 155/193 (80%), Gaps = 0/193 (0%)

Positives = 170/193(88%)

```

Query 1 LNWLYYMMNIGTIAGNDSSANFDGYRVDVNDVDADLLQIAGDYFKAAYGTNQN DANANR 60
      LNWLYYMMNIG+I--NDSSANFDGYRVDVNDVDADLLQIA-DY-K-AY-TNQN DANAN+
Sbjct 518 LNWLYYMMNIGSITANDSSANFDGYRVDVNDVDADLLQIAADYSKDAYKTNQN DANANANK 577

Query 61 HLSILEDWESSDAAYVKEHGNNQLTMDFP IHLALKYSLNTP LGQRSNLEANLTTSLVNRT 120
      HLSILEDW-S-D---VKE+GNNQL+MDFP+HLA+KYSLN-P+-QRS-LE--LTTSLVNR+
Sbjct 578 HLSILEDWNSDDPTSVKENGNNQLSMDFPVHLA IKYSLNMPVDQRSGLPELTTSLVNRS 637

Query 121 NDNAAESGAQPNYSFIRAHDSEVQTVIAQIIKDHINPNSDGLTVTPEEIAQAFKIYNLDE 180
      -D++-E+-AQP NYSFIRAHDSEVQTVIAQIIKD-I+PNSDGLTVTP-EI+QAFKIYN-DE
Sbjct 638 GDDSTENIAQPNYSFIRAHDSEVQTVIAQIIKDKIDPNSDGLTVTPSEISQAFKIYNSDE 697

Query 181 LQADKKYTAYNIP 193
      L-A+K+YTAYNIP
Sbjct 698 LLANKQYTAYNIP 710

```



```

Query 552 AATAGTTCGATATTCATCATATAATACAGCCAGTTCAGCTGTTCTGCCTGCACCACCGG 611
      ||| | ||| ||||| ||||| ||||| ||| | ||||| || || || || ||
Sbjct 2274 AATTGATCCAATATTCATCATATAATATAGCCAATTTAATTGTTCCGCTTGAACACTGG 2215

Query 612 AT 613
      ||
Sbjct 2214 AT 2213

```

>042aa_(*L. satsumensis* 10P)

**LNWLYYMMNIGTIAGNDSSANFDGYRVDVAVDNVDADLLQIAGDYFKAAYGTNQN DANANRHLSILEDW
ESSDAAYVKEHGNNQLTMDFP IHLALKYSLNTP LGQRSNLEANLT TSLVNR TNDNAAESGAQPNYSFI
RAHDSEVQTVIAQI IKDHINPNSDGLTVTP E EIAQAFKIYNHVELQADKKYTAYNIPRLC**

[emb|CBJ19544.1| glucosyltransferase \[Lactobacillus hilgardii\]](#)

Length = 1448

Score = 317 bits (812), Expect = $3 * 10^{-97}$

Identities = 154/193 (80%), Gaps = 0/193 (0%)

Positives = 169/193(87%)

```

Query 1 LNWLYYMMNIGTIAGNDSSANFDGYRVDVAVDNVDADLLQIAGDYFKAAYGTNQN DANANR 60
      LNWLYYMMNIG+I--NDSSANFDGYRVDVAVDNVDADLLQIA-DY-K-AY-TNQN DANAN+
Sbjct 518 LNWLYYMMNIGSITANDSSANFDGYRVDVAVDNVDADLLQIAADYSKDAYKTNQN DANANK 577

Query 61 HLSILEDWESSDAAYVKEHGNNQLTMDFP IHLALKYSLNTP LGQRSNLEANLT TSLVNR T 120
      HLSILEDW-S-D---VKE+GNNQL+MDFP+HLA+KYSLN-P+-QRS-LE--LT TSLVNR+
Sbjct 578 HLSILEDWNSDDPTSVKENGNNQLSMDFPVHLAIKYSLNMPVDQRSGLPELTTSLVNR S 637

Query 121 NDNAAESGAQPNYSFIRAHDSEVQTVIAQI IKDHINPNSDGLTVTP E EIAQAFKIYNHVE 180
      -D+++E+-AQPNYSFIRAHDSEVQTVIAQI IKD-I+PNSDGLTVTP-EI+QAFKIYN--E
Sbjct 638 GDDSTENIAQPNYSFIRAHDSEVQTVIAQI IKDKIDPNSDGLTVTPSEISQAFKIYNSDE 697

Query 181 LQADKKYTAYNIP 193
      L-A+K+YTAYNIP
Sbjct 698 LLANKQYTAYNIP 710

```

>043_(*L. satsumensis* 10P2 reverse)

**GTGCATAGACGAGGGATGTTGTATGCGGTATACTTTTTATCAGCCTGTAATTCGACATGATTGTAAT
CTTAAAGGCTTGTGCAATTTCTTCAGGGGTCACGGTCAATCCGTCAGAGTTTGGATTAATGTGATCTT
TAATAATCTGTGCAATAACGGTCTGGACCTCGCTATCATGCGCCCGAATAAAAGAATAATTGGGTTC
GCTCCGCTTTCAGCTGCATTATCATTGTACGATTAACCTAAGCTGGTCGTCAGATTGGCTTCTAAGTT
GCTCCGCTGACCCAGTGGCGTATTCAATGAGTATTTAAGCGCTAAGTGAATCGGAAAATCCATTGTTA
ATTGATTATTTCCATGTTCTTTAACATAAGCTGCGTCACTGCTCTCCAGTCTTCTAGGATTGATAAA
TGACGATTGGCGTTAGCATCGTTCTGATTAGTTCCATATGCAGCTTTAAAATAATCACCTGCAATTTG
TAACAAATCGGCATCAACATTATCGACTGCATCGACGCGATAACCATCAAAGTTGGCACTTGAATCAT
TGCCAGCAATAGTTCCGATATTCATCATATAATACAGCCAGTTCAGCTGTTCTGCCTGCACCACCGGA
TCCCAATT**

emb|FN662554.1| Lactobacillus hilgardii gtf gene for **glucosyltransferase**, strain TMW 1.828

Length = 6719

Score = 392 bits (434), Expect = $2 * 10^{-105}$

Identities = 448/602 (74%), Gaps = 0/602(0%)

Strand = Plus/Minus

```

Query 12      AGGGATGTTGTATGCGGTATACTTTTTATCAGCCTGTAATTCGACATGATTGTAAATCTT 71
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 2814     AGGAATATTATAAGCGGTATATTGTTTATTAGCTAATAATTCATCGGAGTTGTATATTTT 2755

Query 72      AAAGGCTTGTGCAATTTCTTCAGGGGTCACGGTCAATCCGTCAGAGTTTGGATTAATGTG 131
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 2754     AAAAGCCTGACTTATTTCACTAGGGGTAACGTCAATCCATCAGAATTAGGGTCAATTTT 2695

Query 132     ATCTTTAATAATCTGTGCAATAACGGTCTGGACCTCGCTATCATGCGCCGAATAAAAAGA 191
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 2694     ATCCTTAATAATCTGTGCAATAACTGTCTGTACTTCACTATCATGTGCTCTTATAAATGA 2635

Query 192     ATAATTGGGTTGCGCTCCGCTTTCAGCTGCATTATCATTTGTACGATTAAGCTGGT 251
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 2634     ATAGTTTGGTTGTGCAATATTTTCGGTTGAATCATCACCAGACCGATTGACCAAACTAGT 2575

Query 252     CGTCAGATTGGCTTCTAAGTTGCTCCGCTGACCCAGTGGCGTATTCAATGAGTATTTAAG 311
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 2574     TGTTAATCTGGTTCTAAGCCACTACGTTGATCTACTGGCATATTTAATGAGTACTTAAT 2515

Query 312     CGCTAAGTGAATCGGAAAATCCATTGTTAATTGATTATTTCCATGTTCTTTAACATAAGC 371
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 2514     AGCTAAATGAACAGGGAATCCATGGATAATTGATTATTTCCATTTTCTTTAACAGATGT 2455

Query 372     TCGTCACTGCTCTCCAGTCTTCTAGGATTGATAAATGACGATTGGCGTTAGCATCGTT 431
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 2454     TGGATCATCGCTATTCCAATCTTCTAGTATTGATAAATGTTTATTAGCATTGGCATCATT 2395

Query 432     CTGATTAGTTCATATGCAGCTTTAAAATAATCACCTGCAATTTGTAACAAATCGGCATC 491
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 2394     TTGATTGTTTGTACGCATCCTTGCTATAATCAGCGGCTATTTGAAGCAAATCGGCATC 2335

Query 492     AACATTATCGACTGCATCGACGCGATAACCATCAAAGTTGGCACTTGAATCATTGCCAGC 551
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 2334     TACATTATCAACGGCGTCTACTCGGTAACCATCGAAATTAGCACTTGAATCATTAGCAGT 2275

Query 552     AATAGTTCGATATTCATCATATAATACAGCCAGTTCAGCTGTTCTGCCTGCACCACCGG 611
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 2274     AATTGATCCAATATTCATCATATAATATAGCCAATTTAATTGTTCCGCTTGAACACTGG 2215

Query 612     AT 613
          ||
Sbjct 2214     AT 2213

```

>043aa_(*L. satsumensis* 10P2)

LNWLYYMMNIGTIAGNDSSANFDGYRVDAVDNVDADLLQIAGDYFKAAYGTNQNNDANANRHLSILEDW
ESSDAAYVKEHGNNQLTMDFP IHLALKYSLNTPLGQRSNLEANLTTSLVNRTNDNAAESGAQPNYSFI
RAHDSEVQTVIAQIIKDHINPNSDGLTVTPEEIAQAFKIYNHVELQADKKYTAYNIPRLC

emb|CBJ19544.1| glucosyltransferase [Lactobacillus hilgardii]

Length = 1448

Score = 317 bits (812), Expect = $3 * 10^{-97}$

Identities = 154/193 (80%), Gaps = 0/193 (0%)

Positives = 169/193 (87%)

```

Query 1 LNWLYYMMNIGTIAGNDSSANFDGYRVDVAVDNDADLLQIAGDYFKAAYGTNQNDANANR 60
LNWLYYMMNIG+I--NDSSANFDGYRVDVAVDNDADLLQIA-DY-K-AY-TNQNDANAN+
Sbjct 518 LNWLYYMMNIGSITANDSSANFDGYRVDVAVDNDADLLQIAADYSKDAYKTNQNDANANK 577

Query 61 HLSILEDWESSDAAYVKEHGNNQLTMDFFIHLALKYSLNTPLGQRSNLEANLTSLVNRT 120
HLSILEDW-S-D---VKE+GNNQL+MDFP+HLA+KYSLN-P+-QRS-LE--LTSLVNR+
Sbjct 578 HLSILEDWNSDDPTSVKENGNNQLSMDFFVHLAIKYSLNMPVDQRSGLEPELTSLVNRS 637

Query 121 NDNAAESGAQPNYSFIRAHDSEVQTVIAQIIKDHINPNSDGLTVTPEEIAQAFKIYNHVE 180
-D++-E+-AQPNYSFIRAHDSEVQTVIAQIIKD-I+PNSDGLTVTP-EI+QAFKIYN--E
Sbjct 638 GDDSTENIAQPNYSFIRAHDSEVQTVIAQIIKDKIDPNSDGLTVTPEEISQAFKIYNSDE 697

Query 181 LQADKKYTAYNIP 193
L-A+K+YTAYNIP
Sbjct 698 LLANKQYTAYNIP 710

```

>047_(L. parafarraginis 12P reverse)

```

GTGCATAGACGAGGGATGTTGGTATGCGGTATACTTTTTATCAGCCTGTAATTCGACATGATTGTAAA
TCTTAAAGGCTTGTGCAATTTCTTCAGGGTCACGGTCAATCCGTCAGAGTTTGGATTAATGTGATCT
TTAATAATCTGTGCAATAACGGTCTGGACCTCGCTATCATGCGCCGAATAAAAGAATAATTGGGTTG
CGCTCCGCTTTCAGCTGCATTATCATTGTACGATTAACCTAAGCTGGTCGTCAGATTGGCTTCTAAGT
TGCTCCGCTGACCCAGTGGCGTATTCAATGAGTATTTAAGCGCTAAGTGAATCGGAAAATCCATTGTT
AATTGATTATTTCCATGTTCTTTAACATAAGCTGCGTCACTGCTCTCCAGTCTTCTAGGATTGATAA
ATGACGATTGGCGTTAGCATCGTTCTGATTAGTTCCATATGCAGCTTTAAATAATCACCTGCAATTT
GTAACAAATCGGCATCAACATTATCGACTGCATCGACGCGATAACCATCAAAGTTGGCACTTGAATCA
TTGCCAGCAATAGTTCCGATATTCATCATATAATACAGCCAGTTCAGCTGTTCTGCCTGCACCACCGG
ATCCCCATT

```

emb|FN662554.1| Lactobacillus hilgardii gtf gene for glucosyltransferase, strain TMW 1.828

Length = 6719

Score = 387 bits (428), Expect = $7 * 10^{-104}$

Identities = 441/592 (74%), Gaps = 0/592 (0%)

Strand = Plus/Minus

```

Query 23 TATGCGGTATACTTTTTATCAGCCTGTAATTCGACATGATTGTAAATCTTAAAGGCTTGT 82
|| ||||| ||| ||||| ||| ||||| ||| ||||| ||| |||
Sbjct 2804 TAAGCGGTATATTGTTTATTAGCTAATAATTCATCGGAGTTGTATATTTTAAAGCCTGA 2745

Query 83 GCAATTTCTTCAGGGGTCACGGTCAATCCGTCAGAGTTTGGATTAATGTGATCTTTAATA 142
||||| ||||| || ||||| ||||| ||| ||| ||| |||||
Sbjct 2744 CTTATTTCACTAGGGGTAAGTGTCAATCCATCAGAATTAGGGTCAATTTTATCCTTAATA 2685

Query 143 ATCTGTGCAATAACGGTCTGGACCTCGCTATCATGCGCCGAATAAAAGAATAATTGGGT 202
||||| ||||| || ||||| ||| ||| ||||| ||| |||
Sbjct 2684 ATCTGTGCAATAACTGTCTGTACTTCACTATCATGTGCTCTTATAAATGAATAGTTGGT 2625

```

```

Query 203 TGCCTCCGCTTTCAGCTGCATTATCATTGTACGATTAAGCTGGTCGCAGATTG 262
      || ||      |||| | || | || | || | || | || | || | || | || |
Sbjct 2624 TGTGCAATATTTTCGGTTGAATCATCACCAGACCGATTGACCAAAGTGTGTTAATTCT 2565

Query 263 GCTTCTAAGTTGCTCCGCTGACCCAGTGGCGTATTCAATGAGTATTTAAGCGCTAAGTGA 322
      | ||||| | || | || | | || | || | || | || | || | || | || | || |
Sbjct 2564 GGTTCTAAGCCACTACGTTGATCTACTGGCATATTTAATGAGTACTTAATAGCTAAATGA 2505

Query 323 ATCGGAAAATCCATTGTTAATTGATTATTTCCATGTTCTTTAACATAAGCTGCGTCACTG 382
      | || ||||| | || | || | || | || | || | || | || | || | || |
Sbjct 2504 ACAGGGAAAATCCATGGATAAATTGATTATTTCCATTTTCTTTAACAGATGTTGGATCATCG 2445

Query 383 CTCTCCCAGTCTTCTAGGATTGATAAATGACGATTGGCGTTAGCATCGTTCTGATTAGTT 442
      || | || | || | || | || | || | || | || | || | || | || | || |
Sbjct 2444 CTATTCCAATCTTCTAGTATTGATAAATGTTTATTAGCATTGGCATCATTTTGATTGTT 2385

Query 443 CCATATGCAGCTTTAAATAATCACCTGCAATTTGTAACAAATCGGCATCAACATTATCG 502
      || || | || | || | || | || | || | || | || | || | || | || |
Sbjct 2384 TTGTACGCATCCTTGCTATAATCAGCGGCTATTTGAAGCAAATCGGCATCTACATTATCA 2325

Query 503 ACTGCATCGACGCGATAACCATCAAAGTTGGCACTTGAATCATTGCCAGCAATAGTTCCG 562
      || || | || | || | || | || | || | || | || | || | || | || |
Sbjct 2324 ACGGCGTCTACTCGGTAACCATCGAAATTAGCACTTGAATCATTAGCAGTAATTGATCCA 2265

Query 563 ATATTCATCATATAATACAGCCAGTTCAGCTGTCTGCCTGCACCACCGGAT 614
      ||||| ||||| || | || | || | || | || | || | || | || | || |
Sbjct 2264 ATATTCATCATATAATATAGCCAATTTAATTGTTCCGCTTGAAGTACTGGAT 2213

```

>047aa_(L. parafarraginis 12P)

**MGDPVVQAEQLNWLYYMMNIGTIAGNDSSANFDGYRVDVNDVADLLQIAGDYFKAAYGTNQNDANA
NRHLSILEDWESSDAAYVKEHGNNQLTMDFP IHLALKYSLNTPLGQRSNLEANLTTSLVNRTNDNAAE
SGAQPNYSFIRAHDSEVQTVIAQIIKDHINPNSDGLTVPTEEIAQAFKIYNHVELQADKKYTAYQHP
SMH**

emb|CBJ19544.1| glucosyltransferase [Lactobacillus hilgardii]

Length = 1448

Score = 329 bits (844), Expect = $2 * 10^{-101}$

Identities = 161/203 (79%), Gaps = 0/203 (0%)

Positives = 177/203 (87%)

```

Query 3 DPVVQAEQLNWLYYMMNIGTIAGNDSSANFDGYRVDVNDVADLLQIAGDYFKAAYGTN 62
      +PVVQAEQLNWLYYMMNIG+I--NDSSANFDGYRVDVNDVADLLQIA-DY-K-AY-TN
Sbjct 510 NPVVQAEQLNWLYYMMNIGSITANDSSANFDGYRVDVNDVADLLQIAADYSKDAYKTN 569

Query 63 QNDANANRHL SILEDWESSDAAYVKEHGNNQLTMDFP IHLALKYSLNTPLGQRSNLEANL 122
      QNDANAN+HLSILEDW-S-D---VKE+GNNQL+MDFP+HLA+KYSLN-P+-QRS-LE--L
Sbjct 570 QNDANANKHLSILEDWNSDDPTSVKENGNNQLSMDFPVHLAIKYSLNMPVDQRSGLPEL 629

Query 123 TTSLVNRTNDNAEAESGAQPNYSFIRAHDSEVQTVIAQIIKDHINPNSDGLTVPTEEIAQA 182
      TTSLVNR+-D+-E+-AQPNYSFIRAHDSEVQTVIAQIIKD-I+PNSDGLTVP-EI+QA
Sbjct 630 TTSLVNRSGDDSTENIAQPNYSFIRAHDSEVQTVIAQIIKDKIDPNSDGLTVPSEISQA 689

```

```

Query 183 FKIYNHVELQADKKYTAYQHPSS 205
          FKIYN--EL-A+K+YTAY--PSS
Sbjct 690 FKIYNSDELLANKQYTAYNIPSS 712

```

>Comp_(*L. Kefiranofaciens* 1P3 reverse)_(*L. satsumensis* 10P reverse)

Length = 621 (*L. Kefiranofaciens* 1P3 reverse), Length = 621 (*L. satsumensis* 10P reverse)

Score = 1112 bits (1232), Expect = 0.0

Identities = 619/621 (99%), Gaps = 0/621 (0%)

Strand = Plus/Plus

```

Query 1   GTGCATAGACGAGGGATGTTGTATGCGGTATACTTTTTATCAGCCTGTAATTCGTCAAGA 60
          |||
Sbjct 1   GTGCATAGACGAGGGATGTTGTATGCGGTATACTTTTTATCAGCCTGTAATTCGACATGA 60

Query 61  TTGTAAATCTTAAAGGCTTGTGCAATTTCTTCAGGGGTACGGTCAATCCGTCAGAGTTT 120
          |||
Sbjct 61  TTGTAAATCTTAAAGGCTTGTGCAATTTCTTCAGGGGTACGGTCAATCCGTCAGAGTTT 120

Query 121 GGATTAATGTGATCTTTAATAATCTGTGCAATAACGGTCTGGACCTCGCTATCATGCGCC 180
          |||
Sbjct 121 GGATTAATGTGATCTTTAATAATCTGTGCAATAACGGTCTGGACCTCGCTATCATGCGCC 180

Query 181 CGAATAAAAGAATAAATTGGGTTGCGCTCCGCTTTCAGCTGCATTATCATTGTACGATTA 240
          |||
Sbjct 181 CGAATAAAAGAATAAATTGGGTTGCGCTCCGCTTTCAGCTGCATTATCATTGTACGATTA 240

Query 241 ACTAAGCTGGTCGTCAGATTGGCTTCTAAGTTGCTCCGCTGACCCAGTGGCGTATTCAAT 300
          |||
Sbjct 241 ACTAAGCTGGTCGTCAGATTGGCTTCTAAGTTGCTCCGCTGACCCAGTGGCGTATTCAAT 300

Query 301 GAGTATTTAAGCGCTAAGTGAATCGGAAAATCCATTGTTAATTGATTATTTCCATGTTCT 360
          |||
Sbjct 301 GAGTATTTAAGCGCTAAGTGAATCGGAAAATCCATTGTTAATTGATTATTTCCATGTTCT 360

Query 361 TTAACATAAGCTGCGTCACTGCTCTCCAGTCTTCTAGGATTGATAAATGACGATTGGCG 420
          |||
Sbjct 361 TTAACATAAGCTGCGTCACTGCTCTCCAGTCTTCTAGGATTGATAAATGACGATTGGCG 420

Query 421 TTAGCATCGTTCTGATTAGTTCCATATGCAGCTTTAAAATAATCACCTGCAATTTGTAAC 480
          |||
Sbjct 421 TTAGCATCGTTCTGATTAGTTCCATATGCAGCTTTAAAATAATCACCTGCAATTTGTAAC 480

Query 481 AAATCGGCATCAACATTATCGACTGCATCGACGCGATAACCATCAAAGTTGGCACTTGAA 540
          |||
Sbjct 481 AAATCGGCATCAACATTATCGACTGCATCGACGCGATAACCATCAAAGTTGGCACTTGAA 540

Query 541 TCATTGCCAGCAATAGTTCCGATATTCATCATATAATACAGCCAGTTCAGCTGTTCTGCC 600
          |||
Sbjct 541 TCATTGCCAGCAATAGTTCCGATATTCATCATATAATACAGCCAGTTCAGCTGTTCTGCC 600

Query 601 TGCACCACGGATCCCCAATT 621
          |||
Sbjct 601 TGCACCACGGATCCCCAATT 621

```

>Comp_(*L. satsumensis* 10P reverse)_ (*L. satsumensis* 10P2 reverse)

Length = 621 (*L. satsumensis* 10P reverse), Length = 621 (*L. satsumensis* 10P2 reverse)
 Score = 1147 bits (621), Expect = 0.0
 Identities = 621/621 (100%), Gaps = 0/621 (0%)
 Strand = Plus/Plus

```

Query 1  GTGCATAGACGAGGGATGTTGTATGCGGTATACTTTTTATCAGCCTGTAATTCGACATGA 60
          |||
Sbjct 1  GTGCATAGACGAGGGATGTTGTATGCGGTATACTTTTTATCAGCCTGTAATTCGACATGA 60

Query 61  TTGTAAATCTTAAAGGCTTGTGCAATTTCTTCAGGGGTACGGTCAATCCGTCAGAGTTT 120
          |||
Sbjct 61  TTGTAAATCTTAAAGGCTTGTGCAATTTCTTCAGGGGTACGGTCAATCCGTCAGAGTTT 120

Query 121  GGATTAATGTGATCTTTAATAATCTGTGCAATAACGGTCTGGACCTCGCTATCATGCGCC 180
          |||
Sbjct 121  GGATTAATGTGATCTTTAATAATCTGTGCAATAACGGTCTGGACCTCGCTATCATGCGCC 180

Query 181  CGAATAAAAAGAATAAATTGGGTTGCGCTCCGCTTTCAGCTGCATTATCATTGTACGATTA 240
          |||
Sbjct 181  CGAATAAAAAGAATAAATTGGGTTGCGCTCCGCTTTCAGCTGCATTATCATTGTACGATTA 240

Query 241  ACTAAGCTGGTCGTCAGATTGGCTTCTAAGTTGCTCCGCTGACCCAGTGGCGTATTCAAT 300
          |||
Sbjct 241  ACTAAGCTGGTCGTCAGATTGGCTTCTAAGTTGCTCCGCTGACCCAGTGGCGTATTCAAT 300

Query 301  GAGTATTTAAGCGCTAAGTGAATCGGAAAATCCATTGTTAATTGATTATTTCCATGTTCT 360
          |||
Sbjct 301  GAGTATTTAAGCGCTAAGTGAATCGGAAAATCCATTGTTAATTGATTATTTCCATGTTCT 360

Query 361  TTAACATAAGCTGCGTCACTGCTCTCCAGTCTTCTAGGATTGATAAATGACGATTGGCG 420
          |||
Sbjct 361  TTAACATAAGCTGCGTCACTGCTCTCCAGTCTTCTAGGATTGATAAATGACGATTGGCG 420

Query 421  TTAGCATCGTTCTGATTAGTTCCATATGCAGCTTTAAAATAATCACCTGCAATTTGTAAC 480
          |||
Sbjct 421  TTAGCATCGTTCTGATTAGTTCCATATGCAGCTTTAAAATAATCACCTGCAATTTGTAAC 480

Query 481  AAATCGGCATCAACATTATCGACTGCATCGACGCGATAACCATCAAAGTTGGCACTTGAA 540
          |||
Sbjct 481  AAATCGGCATCAACATTATCGACTGCATCGACGCGATAACCATCAAAGTTGGCACTTGAA 540

Query 541  TCATTGCCAGCAATAGTTCCGATATTCATCATATAATACAGCCAGTTCAGCTGTTCTGCC 600
          |||
Sbjct 541  TCATTGCCAGCAATAGTTCCGATATTCATCATATAATACAGCCAGTTCAGCTGTTCTGCC 600

Query 601  TGCACCACCGGATCCCCAATT 621
          |||
Sbjct 601  TGCACCACCGGATCCCCAATT 621

```

>Comp_(*L. satsumensis* 10P2 reverse)_ (*L. parafarraginis* 12P reverse)

Length = 621 (*L. satsumensis* 10P2 reverse), Length = 622 (*L. parafarraginis* 12P reverse)
 Score = 1136 bits (615), Expect = 0.0
 Identities = 620/622 (99%), Gaps = 1/622 (0%)
 Strand = Plus/Plus

```

Query 311 GTGCATAGACGAGGGATGTT-GTATGCGGTATACTTTTTATCAGCCTGTAATTCGACATG 369
          |||
Sbjct 1 GTGCATAGACGAGGGATGTTGGTATGCGGTATACTTTTTATCAGCCTGTAATTCGACATG 60

Query 370 ATTGTAAATCTTAAAGGCTTGTGCAATTTCTTCAGGGGTCACGGTCAATCCGTCAGAGTT 429
          |||
Sbjct 61 ATTGTAAATCTTAAAGGCTTGTGCAATTTCTTCAGGGGTCACGGTCAATCCGTCAGAGTT 120

Query 430 TGGATTAATGTGATCTTTAATAATCTGTGCAATAACGGTCTGGACCTCGCTATCATGCGC 489
          |||
Sbjct 121 TGGATTAATGTGATCTTTAATAATCTGTGCAATAACGGTCTGGACCTCGCTATCATGCGC 180

Query 490 CCGAATAAAAAGAATAATTGGGTTGCGCTCCGCTTTCAGCTGCATTATCATTGTACGATT 549
          |||
Sbjct 181 CCGAATAAAAAGAATAATTGGGTTGCGCTCCGCTTTCAGCTGCATTATCATTGTACGATT 240

Query 550 AACTAAGCTGGTCGTCAGATTGGCTTCTAAGTTGCTCCGCTGACCCAGTGGCGTATTCAA 609
          |||
Sbjct 241 AACTAAGCTGGTCGTCAGATTGGCTTCTAAGTTGCTCCGCTGACCCAGTGGCGTATTCAA 300

Query 610 TGAGTATTTAAGCGCTAAGTGAATCGGAAAATCCATTGTTAATTGATTATTTCCATGTTC 669
          |||
Sbjct 301 TGAGTATTTAAGCGCTAAGTGAATCGGAAAATCCATTGTTAATTGATTATTTCCATGTTC 360

Query 670 TTTAACATAAGCTGCGTCACTGCTCTCCCAGTCTTCTAGGATTGATAAATGACGATTGGC 729
          |||
Sbjct 361 TTTAACATAAGCTGCGTCACTGCTCTCCCAGTCTTCTAGGATTGATAAATGACGATTGGC 420

Query 730 GTTAGCATCGTTCTGATTAGTTCCATATGCAGCTTTAAAATAATCACCTGCAATTTGTAA 789
          |||
Sbjct 421 GTTAGCATCGTTCTGATTAGTTCCATATGCAGCTTTAAAATAATCACCTGCAATTTGTAA 480

Query 790 CAAATCGGCATCAACATTATCGACTGCATCGACGCGATAACCATCAAAGTTGGCACTTGA 849
          |||
Sbjct 481 CAAATCGGCATCAACATTATCGACTGCATCGACGCGATAACCATCAAAGTTGGCACTTGA 540

Query 850 ATCATTGCCAGCAATAGTTCCGATATTCATCATATAATACAGCCAGTTCAGCTGTTCTGC 909
          |||
Sbjct 541 ATCATTGCCAGCAATAGTTCCGATATTCATCATATAATACAGCCAGTTCAGCTGTTCTGC 600

Query 910 CTGCACCACCGGATCCCCAATT 931
          |||
Sbjct 601 CTGCACCACCGGATCCCCCATT 622

```

Apêndice B - Produção de EPS em ágar sMRS contendo 8% de sacarose. Visualização de colônias com aspecto viscoso.

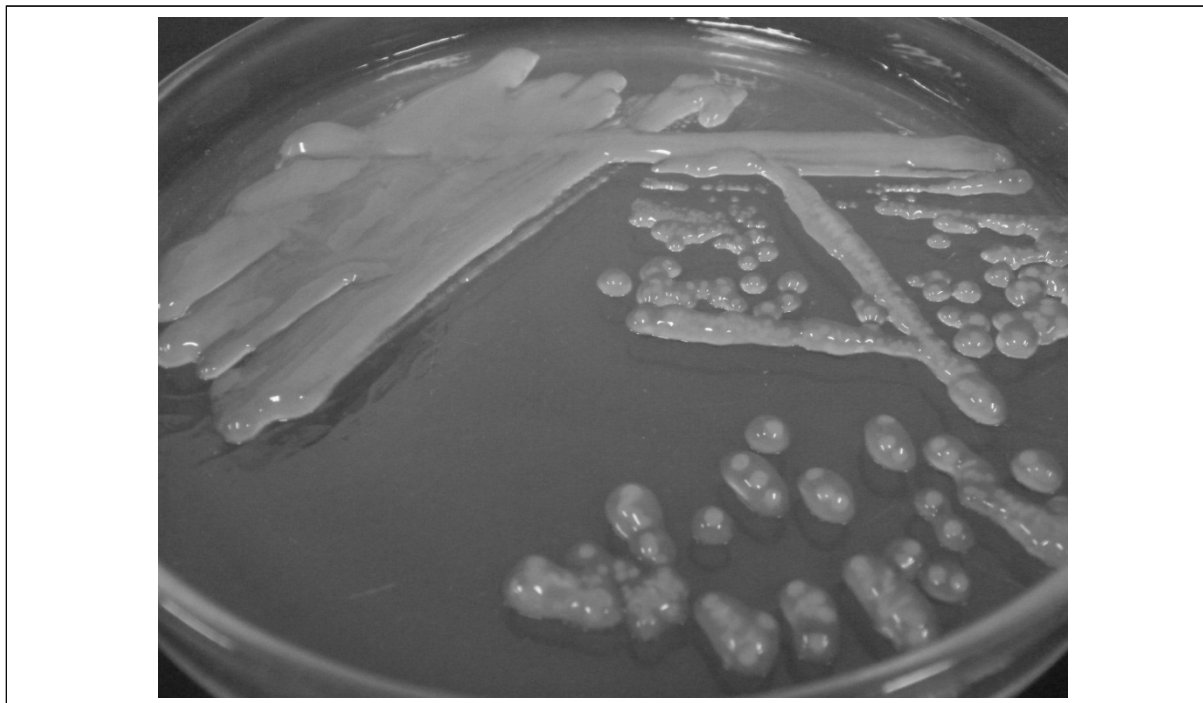


Figura 24 - *L. kefiranofaciens* 1P3 cultivado em ágar sMRS.

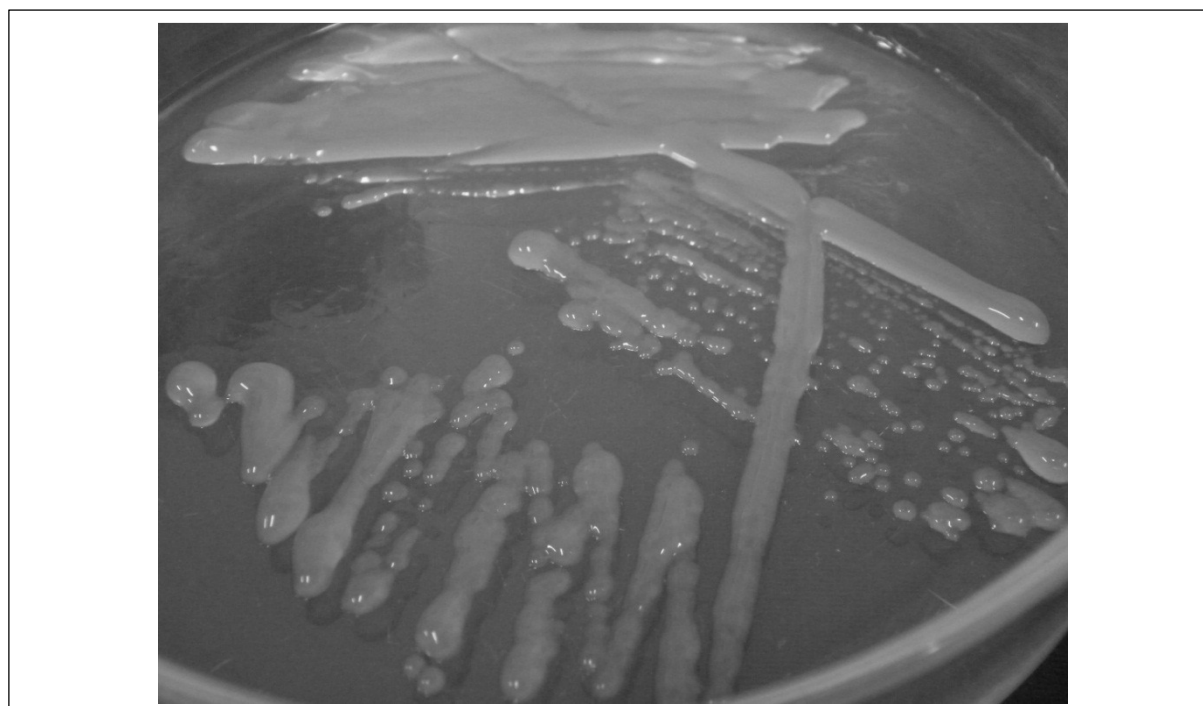


Figura 25 - *L. satsumensis* 10P cultivado em ágar sMRS.



Figura 26 - *L. parafarraginis* 12P cultivado em ágar sMRS.



Figura 27 - *L. mali* 19U cultivado em ágar sMRS.

Apêndice C - Análise dos EPS por espectrometria de ressonância magnética nuclear unidirecional de ^1H , realizado em D_2O a 70°C . Os valores acima e abaixo do sinal são referentes ao deslocamento químico expresso em ppm e à intensidade expresso pela área respectivamente.

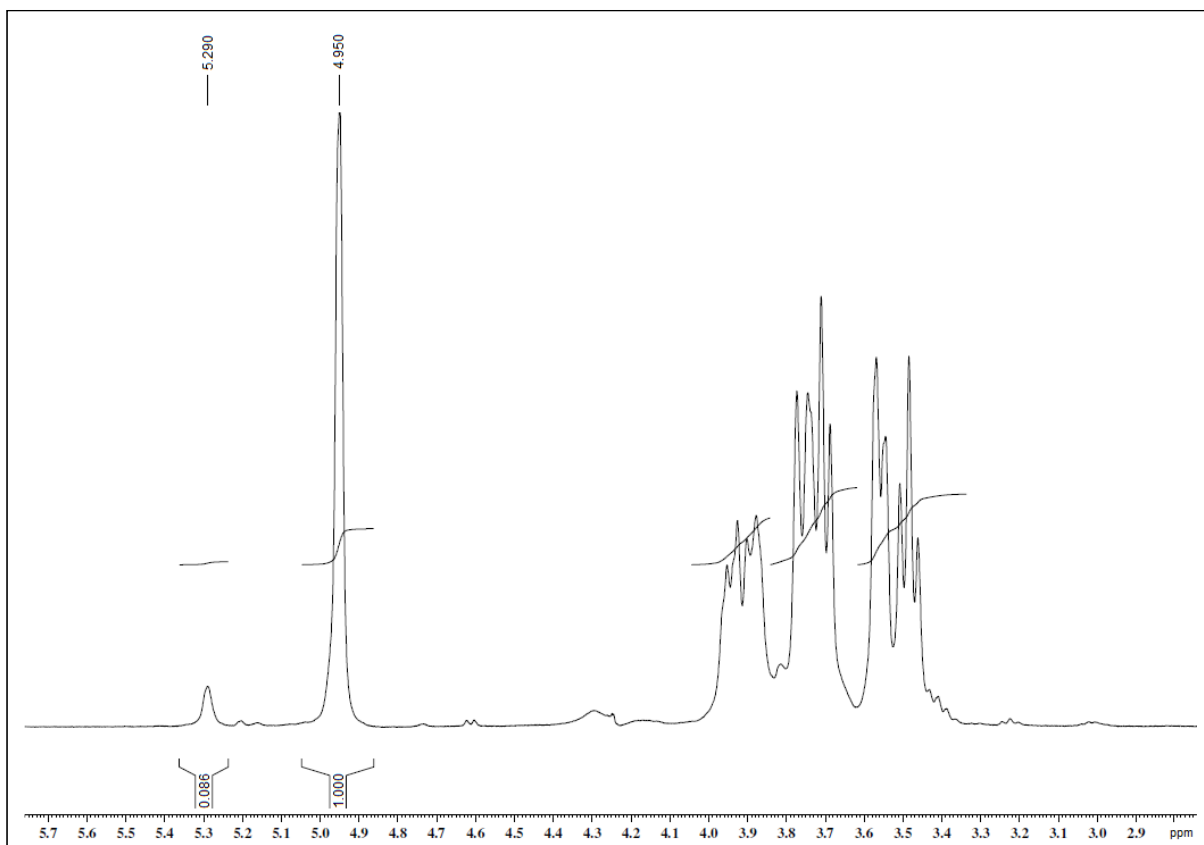


Figura 28 - Espectros de ^1H -RMN do EPS de *L. kefirnofaciens* 1P3.

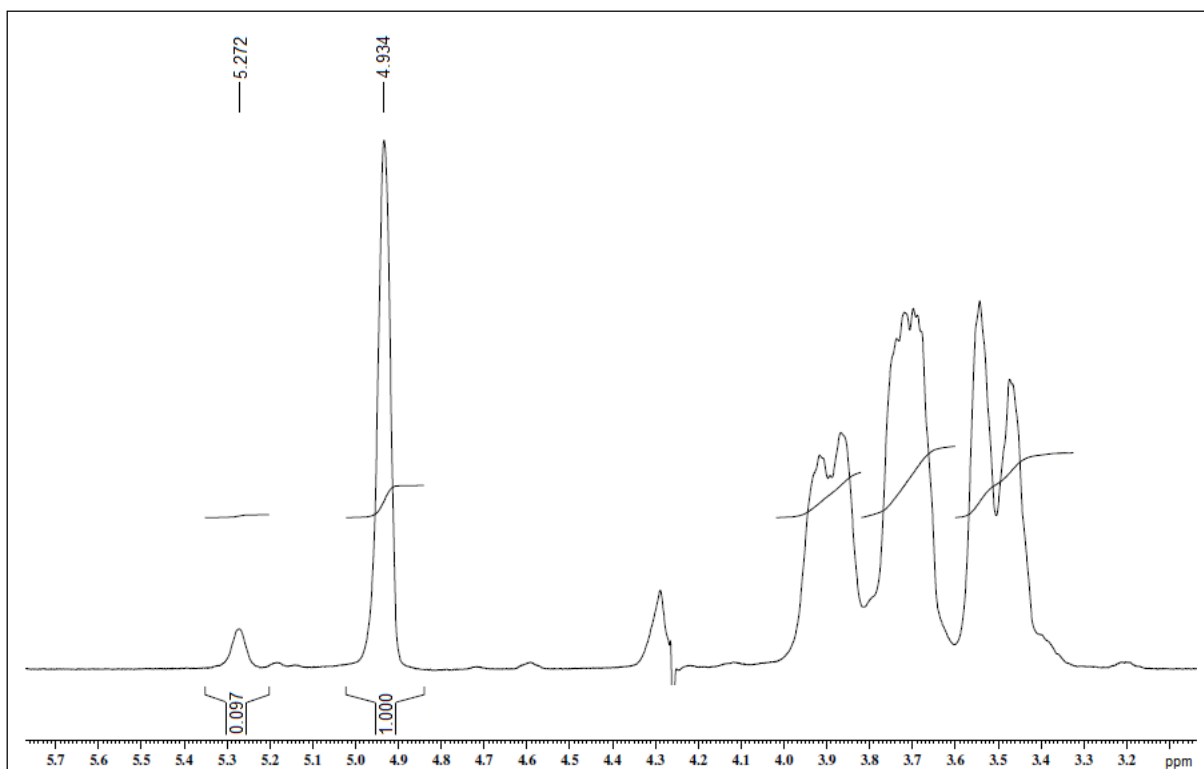


Figura 29 - Espectros de ¹H-RMN do EPS de *L. satsumensis* 10P.

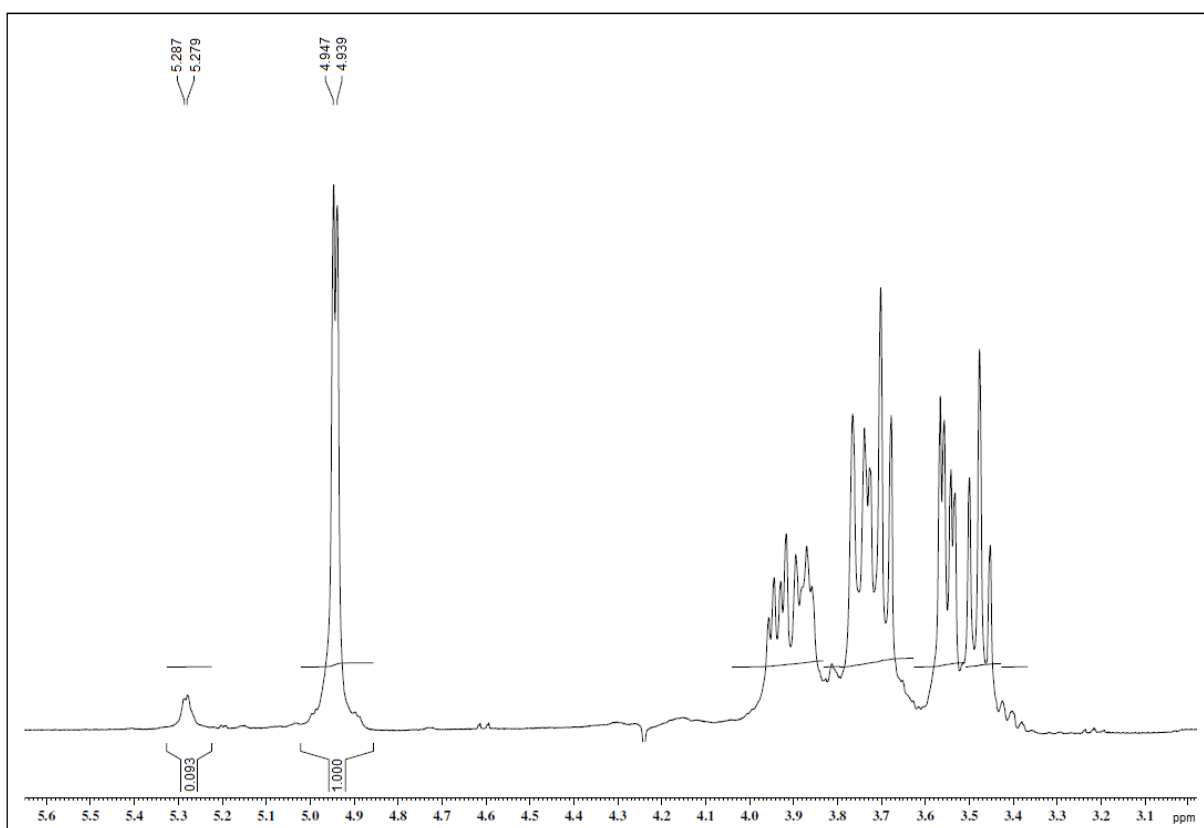


Figura 30 - Espectros de ¹H-RMN do EPS de *L. parafarraginis* 12P.

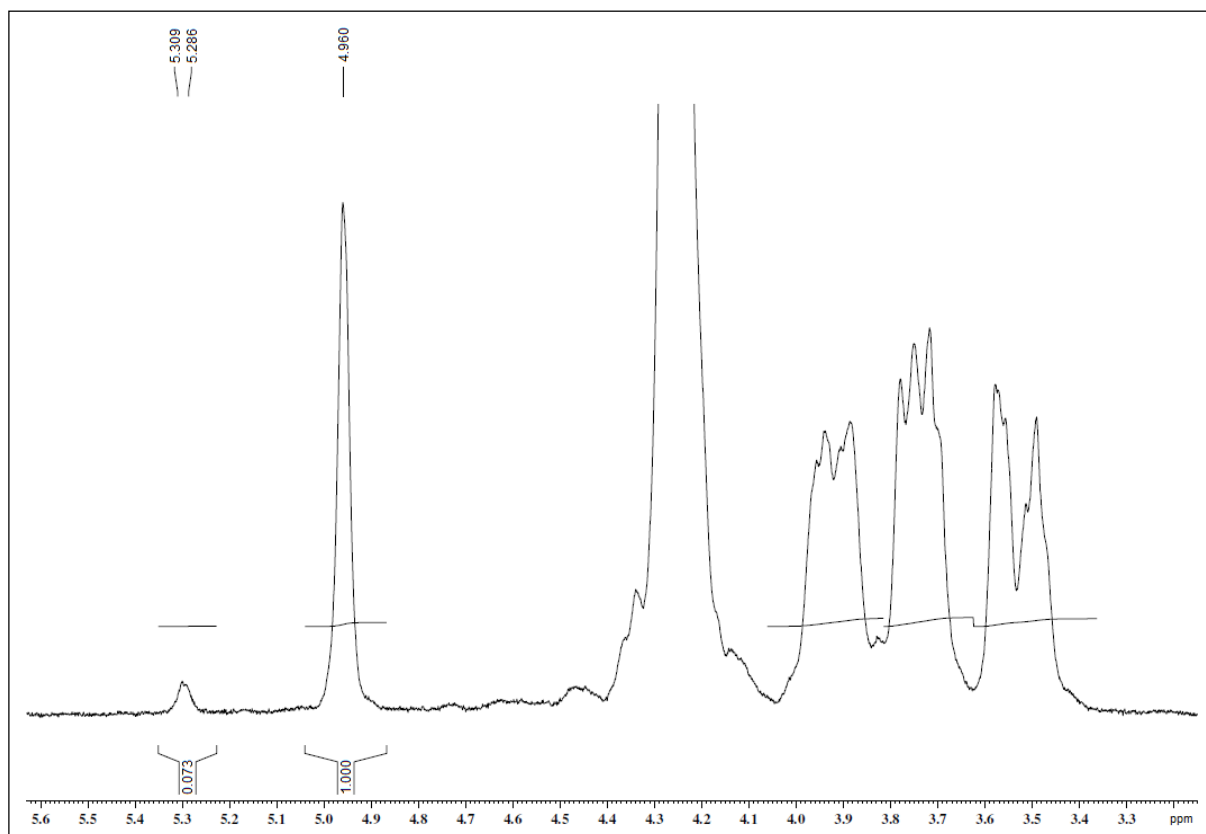


Figura 31 - Espectros de ^1H -RMN do EPS de *L. mali* 19U.