

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

Daniela Carolina De Bastiani

**Efeito de xilooligossacarídeos na produção de bactérias ácido-láticas com
potencial probiótico**

Porto Alegre

2017

Daniela Carolina De Bastiani

Efeito de xilooligossacarídeos na produção de bactérias ácido-láticas com potencial probiótico

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial e obrigatório para a obtenção do título de Bacharela em Biotecnologia.

Área de habilitação: Biotecnologia Molecular

Orientador: Marco Antônio Záchia Ayub

Porto Alegre

2017

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Ayub, por ter me orientado desde 2016, por todo o conhecimento e liberdade na pesquisa, e por sempre ter mostrado que é preciso fazer ciência com consciência e responsabilidade ambiental.

Ao Paulo, pela orientação no dia a dia e toda a troca de conhecimento, discussões científicas, paciência e apoio.

Aos meus colegas de laboratório, por todas risadas, ajudas, conversas. Principalmente a Laísa, que sempre deixou o ambiente de trabalho mais leve e descontraído.

Aos meus amigos, em especial Bruna, Luana e Karina, que apesar da distância física, sempre me apoiaram e ajudaram no que era possível, pelas risadas e palavras de conforto.

Aos meus amigos do intercâmbio, Diego, Fernando, Luana e Wagner, que por pouco mais de um ano foram minha “família australiana”, se tornando essenciais na minha vida.

A minha família, minha mãe, meu pai e meus irmãos, por serem meu porto seguro. Por todo o suporte durante a graduação, por entenderem minha ausência, apoiarem minhas escolhas e pelo amor incondicional.

Resumo

Xilooligossacarídeos (XOs) são moléculas prebióticas, presentes em baixa concentração em alimentos como frutas e vegetais, que podem proporcionar diversas melhorias na saúde do consumidor. Uma maneira de obter maior concentração de XOS é a partir da hidrólise enzimática de resíduos agroindustriais ricos em xilana, tais como a fibra de soja, utilizando enzimas como xilanase e arabinofuranosidase. Pelas características apresentadas por este prebiótico, e sua resistência a pH ácido e a altas temperaturas, este pode ser utilizado como aditivo alimentar. Visto que algumas bactérias ácido-láticas (BAC), microrganismos com potencial probiótico, são capazes de metabolizar este prebiótico, e que parte da comunidade de microrganismos formadora de grãos kefir são BAC, neste trabalho investigou-se os efeitos da adição de XOs produzidos a partir da fibra de soja na fermentação de grãos kefir. Os resultados encontrados mostram que XOs influenciam positivamente no crescimento dos grãos, quando na presença de lactose, indicando seu potencial prebiótico. Contudo, quando na ausência de lactose, XOs não ocasionam os mesmos efeitos. Além disso, estes também não influenciam na produção de ácido lático, visto que a presença de XOs no meio é indiferente para a produção deste. Os resultados encontrados mostram que XOs podem ser utilizados como ingredientes funcionais na fermentação de kefir, porém mais estudos são necessários para analisar sua eficácia e influência na produção de outros metabólitos na produção de kefir.

Palavras chave: xilooligossacarídeos, grãos kefir, bactérias ácido-láticas, ácido lático.

Abstract

Xylooligosaccharides (XOs) are prebiotic molecules, present in low concentrations in some foods, including fruits and vegetables, and they may provide several improvements in consumer health. To achieve higher XOs concentration, it is possible to produce them by enzymatic hydrolysis of xylan-rich agroindustrial residues, such as soybean fiber, using the enzymes xylanase and arabinofuranosidase. According to the characteristics presented by this prebiotic and its resistance to acid pH and high temperatures, it can be used as a food additive. Lactic acid bacteria (LAB) are microorganisms showing probiotic potential and are able to metabolize prebiotics. One source of LAB is found in the community of microorganisms forming kefir grains. Therefore, in this work it was investigated the effects of the addition of XOs produced from soy fiber, under the fermentation of kefir grains. The results show that XOs positively influenced grain growth in the presence of lactose, indicating its prebiotic potential. However, when in the absence of lactose, XOs do not cause the same effects. The results show that XOs may be used as functional ingredients in the fermentation of kefir, but more studies are needed to analyze its efficacy and influence in the production of other metabolites during kefir production.

Key words: xylooligosaccharides, kefir grains, lactic acid bacteria, lactic acid.

Sumário

1. Introdução	7
1.1. Prebióticos	7
1.2. Xilooligossacarídeos	9
1.3. Bactérias ácido-láticas	12
1.4. Kefir e seu valor nutricional	13
2. Justificativa	17
3. Objetivos.....	18
3.1. Objetivo Geral	18
3.2. Objetivos Específicos	18
4. Materiais e Métodos.....	19
4.1. Microrganismos e Biomassa	19
4.2. Produção Enzimas	19
4.3. Obtenção extrato enzimático bruto e Quantificação Enzimática	20
4.4. Produção de XOS utilizando combinação enzimática	21
4.5. Extração e quantificação XOs	21
4.6. Fermentação de XOs por grãos kefir in vitro	21
4.7. Produção de ácido lático	22
4.8. Análises grão kefir.....	22
4.9. Análises Estatísticas	23
5. Resultados.....	24
5.2. Produção de xilooligossacarídeos.....	24
5.3. Crescimento de grãos kefir	25
5.4. Produção ácido lático	27
6. Conclusão.....	29
7. Referências.....	30

1. Introdução

1.1. Prebióticos

Agentes prebióticos foram descritos por Gibson & Roberfroid (1995) como aditivos alimentares que não são digeridos no trato gastrointestinal e que afetam positivamente a saúde do hospedeiro. Estes efeitos benéficos são consequências da estimulação de atividade metabólica proveniente, principalmente, do crescimento de um ou mais microrganismos presentes no cólon, já que estas moléculas são utilizadas em diferentes rotas metabólicas destes. Entretanto, o conceito de prebióticos foi recentemente atualizado, e para um composto ser considerado tal, este precisa preencher três requisitos, os quais são: resistência a ácido gástrico, para que estes cheguem até o intestino, onde os microrganismos estão; fermentação do composto pela microflora intestinal; possuir capacidade de estimular o crescimento e/ou atividade de bactérias benéficas para a saúde do hospedeiro (ROBERFROID, 2007), limitando assim o número de moléculas com ação prebiótica.

Muito se confunde entre fibras digestivas e prebióticos. Isso ocorre porque fibras digestivas são descritas como porções de plantas resistentes a enzimas digestivas, incluindo alguns polissacarídeos, lignina e oligossacarídeos. Porém, é importante notar que apesar de não serem digeridas pelo organismo, estas não são necessariamente fermentadas pelas bactérias presentes no intestino ou apresentam benefícios quanto ao crescimento ou metabolismo destas (ANDERSON *et al.*, 2009). Logo, conclui-se que prebióticos são fibras digestivas, como, por exemplo, os oligossacarídeos, entretanto fibras digestivas não são necessariamente prebióticos, tais como a lignina.

Sabe-se que alimentos ricos em prebióticos vêm sendo consumidos desde a pré-história (LEACH, SOBOLIK, 2010), sendo que este consumo vem diminuindo com o tempo, e, atualmente, é consideravelmente menor devido a drásticas mudanças alimentares que ocorrem com o desenvolvimento da população, incluindo um menor consumo de frutas e vegetais. Todavia, é importante salientar que a utilização de prebióticos pode resultar em diversos benefícios para a saúde do organismo (Figura I). Estes incluem a redução da duração e intensidade de algumas

condições, tais como diarreia e inflamações intestinais, além de exercerem efeito preventivo ao câncer colorretal (SWENNEN *et al.*, 2006), e aumentarem a biodisponibilidades e absorção de minerais de grande importância, como, por exemplo, cálcio, magnésio e ferro (ABRAMS *et al.*, 2005). Estes compostos também são capazes de amenizar alguns fatores de risco de doenças cardiovasculares, ocasionar uma leve diminuição na pressão sanguínea, promover saciedade e perda de peso, podendo ser utilizados para prevenir, em alguns casos, doenças como a obesidade (AL-SHERAJI *et al.*, 2013; SLAVIN, 2013). Além disso, os prebióticos podem induzir as bactérias a produzirem substâncias como ácidos graxos de cadeia curta, que afetam de maneira positiva o sistema imune (SARTOR, 2004).

De maneira geral, a ação positiva de prebióticos provém do fato de que organismos mutualísticos presentes na flora do consumidor e bactérias probióticas, que podem ser adicionadas a alimentos, são beneficiadas com a fermentação destas moléculas, afetando de maneira positiva o hospedeiro (GIBSON, ROBERFROID, 1995). Logo, é possível utilizá-los como fonte de nutrientes, acarretando a produção de metabólitos que auxiliam na manutenção do organismo. Sendo assim, prebióticos e probióticos possuem uma correlação direta no balanço microbiano intestinal, permitindo a utilização concomitante dos mesmos como ingredientes funcionais de alimentos (ROBERFROID, 2000).

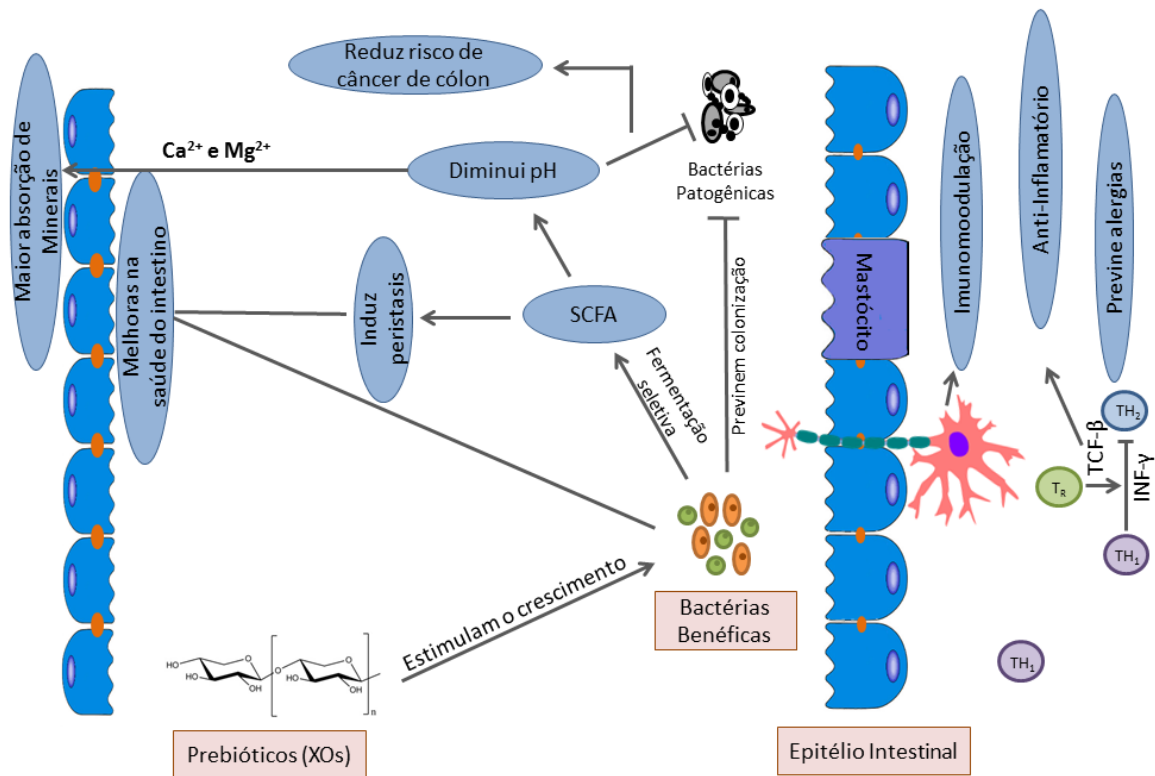


Figura I. Ilustração demonstrando benefícios que podem ser ocasionados pelo consumo de prebióticos. Estas moléculas possuem capacidade de estimular o crescimento de bactérias benéficas do trato gastrointestinal, o que ocasiona a produção de ácidos graxos de cadeias curtas (SCFA), diminuição do pH gastrointestinal, inibindo o desenvolvimento de bactérias patogênicas e aumentando a absorção de minerais. Em conjunto, estes fatores causam melhoras na saúde do intestino, diminuem o risco de câncer de cólon e modulam a resposta imune do organismo. (Adaptado de: ŚLIŻEWSKA *et al.*, 2012)

1.2. Xilooligosacarídeos

Xilooligosacarídeos (XOs) são uma emergente potencial fonte de prebióticos, por serem utilizados como substrato para populações comensais de bactérias e apresentarem resistência à hidrólise por enzimas digestivas de mamíferos, ou seja, são resistentes ao processo digestivo. Estes compostos estão presentes em baixa concentração em alimentos como frutas, vegetais, leite e mel (VÁZQUEZ *et al.*, 2000; JAIN *et al.*, 2015), entretanto, é possível produzi-los a partir da hemicelulose

de resíduos agroindustriais ricos em xilana, tais como a fibra de soja (HECK *et al.*, 2002; YUAN *et al.*, 2004).

XOs são classificados como oligômeros de açúcar funcionais formados por ligações β -1,4 entre duas a vinte unidades de xiloses (YUAN *et al.*, 2004). Todavia, somente oligômeros contendo de 2 a 7 unidades possuem metabolização por microrganismos. Além disso, sabe-se que xilobiase, xilotriose e xilotetraose, os quais contêm 2, 3 e 4 resíduos de xilose, respectivamente, são os melhores para aplicação na indústria de alimentos como ingredientes funcionais, com destaque a xilobiase que apresenta um índice de assimilação mais rápido pelos microrganismos intestinais (CHEN *et al.*, 1997; UÇKUN KIRAN *et al.*, 2013). Além disso, sua estrutura pode conter diversos substituintes nas cadeias laterais, tais como grupos acetila, ácido urônico e unidades de arabinose (CAPARRÓS *et al.*, 2007), dependendo da fonte utilizada para sua produção.

Dentre as propriedades de XOs, encontram-se: alta estabilidade em pH ácido, tais como o pH do suco gástrico, e a temperaturas de até 100 °C, sendo considerados então açúcares não digestíveis (VÁZQUES *et al.*, 2000). Graças a estabilidade destas moléculas, elas são capazes de passar por processos industriais sem perder suas propriedades (OKU & NAKAMURA, 2002). Visto isso, XOs são considerados moléculas com valor prebiótico agregado, podendo ser utilizados na indústria de alimentos como aditivos alimentares e agentes fortificadores. Além disso, estas moléculas apresentam uma alta gama de benefícios para a saúde, tais como melhoramento do funcionamento do intestino, efeitos antioxidantes, aumento da biodisponibilidade de minerais como o cálcio, redução do risco de alguns cânceres e de efeitos citotóxicos em células de leucemia (JAIN *et al.*, 2015). Por conseguinte, estes oligossacarídeos são uma ótima fonte de carbono que é metabolizada por microrganismos probióticos, sendo bactérias ácido-láticas parte dos microrganismos capazes de metabolizá-los. Além de estimularem o crescimento destes, XOs também induzem os microrganismos a produzirem ácidos graxos de cadeia pequena e outros compostos, como o ácido láctico, auxiliando na manutenção do pH e na absorção de minerais, resultando na modulação da função intestinal e do sistema imune, por possuir características antimicrobianas, anti-inflamatórias e ação imunomodulatória (MOURE *et al.*, 2006; VÁZQUEZ *et al.*, 2000).

Devido às características apresentadas de XOs, existe a possibilidade de utilização destes em muitos ramos comerciais. No Japão, por exemplo, diversos alimentos simbióticos possuem adição de XOs, e produtos contendo esta fonte de prebiótico foram lançados em alguns países ao longo dos anos (VÁZQUEZ *et al.*, 2000; MÄKELÄINEN *et al.*, 2010). Visto isto, XOs podem ser aplicados tanto na indústria de alimentos quanto na farmacêutica e também na agroindústria, e devido a sua estabilidade, estes prebióticos apresentam vantagens em relação a outros, fazendo com que este mercado esteja em alta atualmente (Figura II).

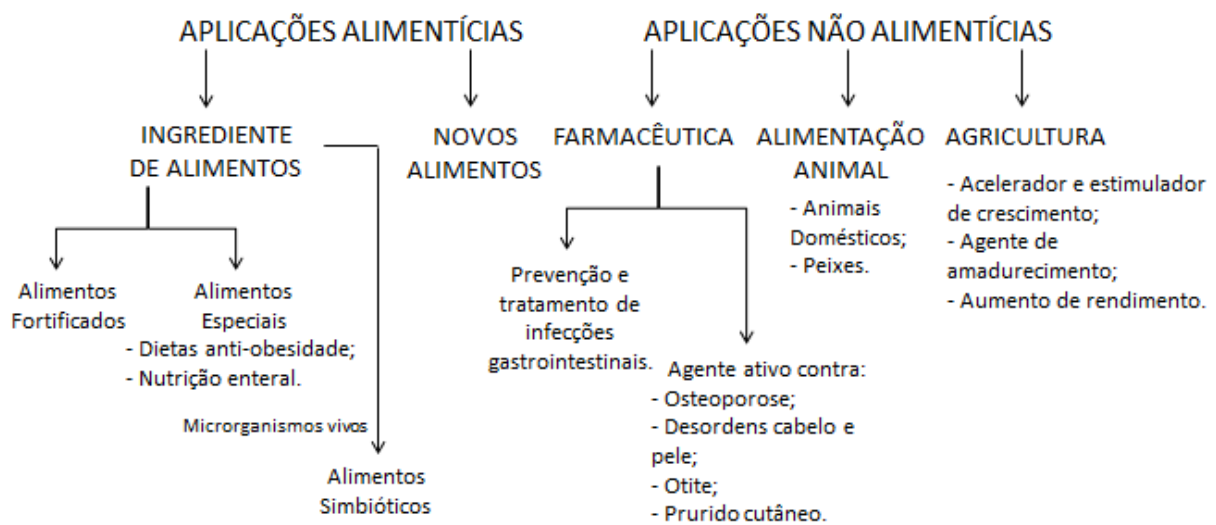


Figura II. Esquema demonstrando ampla aplicabilidade de XOs, do uso como ingrediente de alimentos ao uso na agricultura. (Adaptado de: VÁZQUEZ *et al.*, 2000).

A produção de XOs pode ser feita a partir da hidrólise enzimática da xilana. Xilanase e arabinofuranosidase são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas na cadeia de xilana, resultando na formação de monômeros de xilose, arabinose e XOs. A primeira, xilanase, cliva as ligações β -1,4 entre resíduos de xilose (MOTTA *et al.*, 2013); já a segunda, remove cadeias laterais de arabinose da xilose (SAHA, 2000). A utilização de *Aspergillus nidulans* geneticamente modificados contendo a inserção de genes codificadores destas enzimas, um com endoxilanase (*xynC*) de *Penicillium funiculosum* e outro com α -L-arabinofuranosidase (*abfB*) de *Aspergillus niger*, traz diversas vantagens na produção de XOs por hidrólise enzimática (GONÇALVES *et al.*, 2012). Dado que a superexpressão destes genes

ocasiona uma maior produção das enzimas de interesse, xilanase e arabinofuranosidase, e através do cultivo em estado sólido da fibra de soja (resíduo agroindustrial rico em xilana), pode-se obter extratos enzimáticos brutos ricos nas enzimas em questão, os quais podem ser aplicados na produção do prebiótico de interesse, também utilizando a fibra de soja como fonte de substrato enzimático.

1.3. Bactérias ácido-láticas

Ao longo dos anos, a utilização de prebióticos e probióticos vem aumentando. Probióticos são definidos como microrganismos que afetam a saúde do hospedeiro positivamente, melhorando o balanço microbiano intestinal (FULLER, 1989). Estes organismos, ao serem ingeridos, ocasionam benefícios para a saúde do hospedeiro, podendo ou não colonizar o trato gastrointestinal, o que depende da sobrevivência das mesmas aos processos digestivos (SÁNCHEZ *et al.*, 2017). A associação de prebióticos e probióticos pode beneficiar o hospedeiro, pois estes agem de maneira simbiótica: as bactérias probióticas utilizam como substrato prebióticos, produzindo metabólitos que auxiliam em diversos processos do organismo. As funções dos probióticos são muito amplas, e incluem reduzir o potencial danoso de alguns metabólitos e microrganismos patogênicos no hospedeiro, além de influenciarem na mobilidade gastrointestinal e em sua microbiota, e possuírem papel chave na modulação da resposta imune (ROBERFROID, 2000; REDDY & KRISHNAN, 2016).

Dentro do contexto de probióticos, podemos encontrar algumas bactérias ácido-láticas (BAL). Estas são um grupo heterogêneo de microrganismos procariotos caracterizados por serem Gram-positivos e pela sua capacidade de fermentar hexoses e produzir ácido lático. Estes microrganismos podem ser encontrados na forma de cocos ou bacilos (MAKAROVA *et al.*, 2006). BAL estão tipicamente presentes em leites e seus produtos derivados (onde possuem a capacidade de coagulação), carnes, bebidas e vegetais, e podem ser encontradas na microbiota de mamíferos (JENSEN *et al.*, 2012).

Os gêneros mais importantes que compõem o grupo de BAL são os *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus* e *Bifidobacterium* (Klein *et al.*, 1998). Esta classe de microrganismos é amplamente utilizada na indústria farmacêutica, cada espécie individualmente ou em diversas combinações (FOOKS *et al.*, 1999). As bactérias que apresentam maior utilização como prebióticos são as do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (ROBERFROID, 2000). Estes gêneros, além de serem encontradas na flora gastrointestinal, também podem ser encontrados em alimentos fermentados, como, por exemplo, iogurte, kombucha e kefir (TEUSINK, MOLENAAR, 2017; DE ROOS, DE VUYST, 2018).

BAL apresentam diversas características que as fazem ter um imenso valor industrial e comercial. Primeiramente, elas são resistentes a pH ácidos e à bile, e apresentam crescimento em diferentes temperaturas (FULLER, 1989). Outras características importantes deste grupo de bactérias são sua capacidade de sobrevivência em diferentes concentrações de NaCl, fermentação de diferentes carboidratos, crescimento em diferentes meios nutritivos e resistência a antibióticos (KLEIN *et al.*, 1998).

Além disso, estudos demonstram que o crescimento de *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. pode ser estimulado por XOs, devido a sua metabolização (LI *et al.*, 2015; LIN *et al.*, 2016), tornando possível a utilização de agregados contendo essas espécies, tais como grãos kefir, concomitantemente com XOs para provar o seu valor prebiótico.

1.4. Kefir e seu valor nutricional

Kefir são bebidas probióticas, consumidas a milhares de anos, e produzidas a partir de fermentação de líquidos, assim como leite. Estas podem ser caracterizadas como alimentos funcionais por apresentarem inúmeros efeitos benéficos para o organismo, tanto em questão de melhoramento da microflora quanto em questão de

entrega de metabólitos para o consumidor (GUZEL-SEYDIM *et al.*, 2011; NALBANTOGLU *et al.*, 2014; NIELSEN *et al.*, 2014; PRADO *et al.*, 2015).

Estas bebidas são fermentadas utilizando grãos kefir, os quais foram primeiramente produzidos por tribos da Rússia (GUZEL-SEYDIM *et al.*, 2011). Estes grãos são comunidades de microrganismos, e são formados principalmente por bactérias ácido-láticas, leveduras, fungos filamentosos e bactérias ácido-acéticas, as quais coexistem de forma simbiótica (ZHOU *et al.*, 2009; POGAČIĆ *et al.*, 2013). A composição da microbiota formadora dos grãos kefir apresenta uma grande diversidade entre as regiões do mundo, sendo que esta é extremamente dependente do local de origem, das condições de cultura e das condições de armazenamento dos grãos (GARROTE *et al.*, 2001; ROSA *et al.*, 2017). A comunidade de microrganismos dos grãos é unida por uma matriz, chamada *kefiran*, que é uma cadeia composta de polissacarídeos e proteínas secretada pelos mesmos, acarretando na formação dos aglomerados (GUZEL-SEYDIM *et al.*, 2011).

Para a produção da bebida, os grãos kefir são adicionados ao leite, onde são incubados em temperatura ambiente por aproximadamente 22 h. Durante a fermentação, ocorre a produção de metabólitos, e estes compostos causam mudanças físico-químicas na bebida (GUZEL-SEYDIM *et al.*, 2011). O resultado do processo de fermentação é uma bebida carbonatada, com sabor peculiar devido aos compostos gerados. Uma peculiaridade desta bebida é que os grãos podem ser recuperados e utilizados novamente, todavia, pode haver uma mudança nos organismos que os compõem com o passar do tempo (NIELSEN *et al.*, 2014). Embora possa-se encontrar grãos kefir de forma liofilizada comercialmente, com composição de microrganismos otimizada, normalmente os grãos são passados de pessoa a pessoa no Brasil (LEITE *et al.*, 2013).

O consumo de bebidas fermentadas vem sendo associada com melhoras na saúde, e os agentes dessas melhoras são as bactérias ácido-láticas e as moléculas produzidas pelas mesmas que estão presentes nestas bebidas. Os compostos gerados durante a fermentação dos grãos são variados, e incluem principalmente ácido lático, etanol, ácidos orgânicos, peptídeos, bacteriocinas, peróxido de hidrogênio e gás carbônico (FARNWORTH, 2005; ROSA *et al.*, 2017). A presença destes metabólitos, de microrganismos, e dos compostos gerados pela quebra da

matriz dos grãos faz com que esta bebida seja considerada um alimento bioativo, e além dos compostos conferirem certa viscosidade e acidez à bebida, eles também proporcionam inibição de patógenos e contaminantes e geram diversos benefícios para a saúde do consumidor (Figura III), os quais incluem atividade antitumoral (VINDEROLA *et al.*, 2005), antimicrobiana (RODRIGUES *et al.*, 2005), antiinflamatória e antialérgica (LEE *et al.*, 2007). Em adição, a geração destes metabólitos é essencial para o crescimento dos grãos, os quais aumentam lentamente em peso e tamanho durante o processo de fermentação (GARROTE *et al.*, 2001; LEITE *et al.*, 2013).

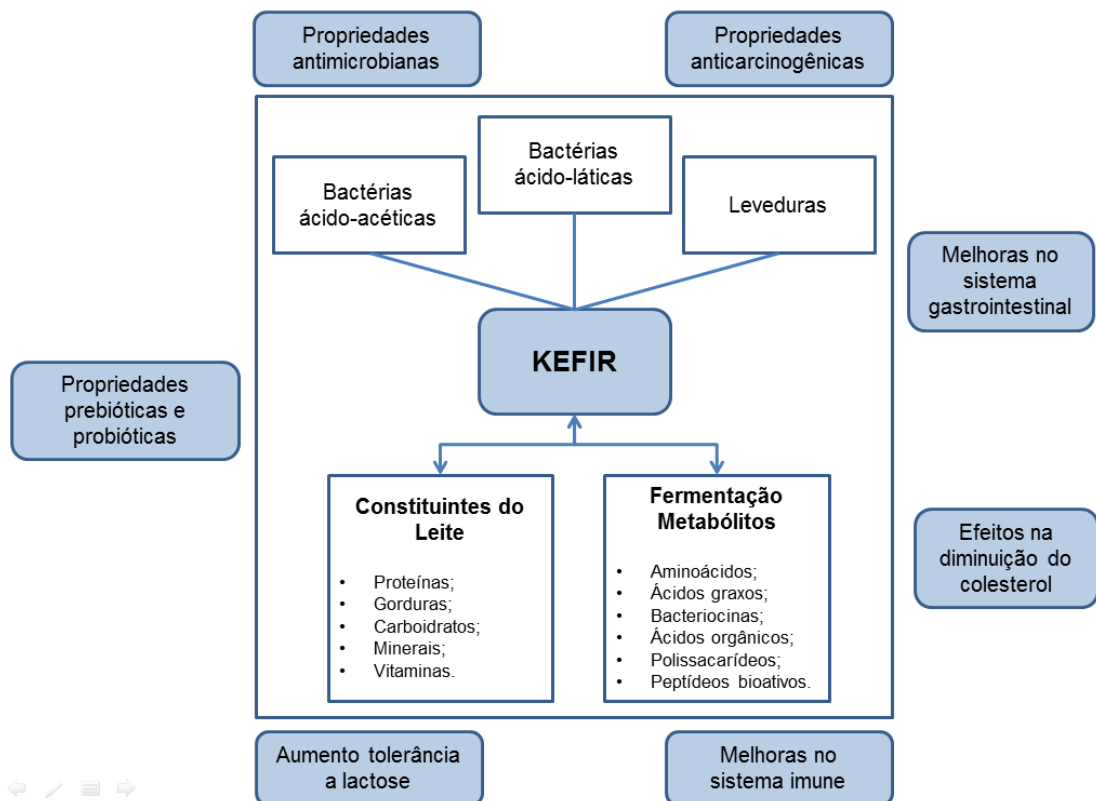


Figura III. Diagrama esquemático das propriedades funcionais apresentadas por kefir. (Adaptado de: GUZEL-SEYDIM *et al.*, 2011)

Como foi citado anteriormente, diversos microrganismos probióticos são capazes de metabolizar XOs, e é possível que os grãos kefir possuam esta capacidade, visto que estudos mostram que diversas bactérias ácido-láticas presentes em diferentes grãos, tais como *Lactobacillus plantarum*, *L. acidophilus* e *L. fermentum*, os consomem (CHAPLA *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2015). Em virtude disso, é

possível aliar a utilização de XOs produzidos a partir do cultivo em estado sólido de fibra de soja por fungos, com a fermentação destes por grãos kefir para um aumento dos valores prebióticos e probióticos dos produtos gerados a partir destes.

2. Justificativa

O crescimento da população gera a necessidade do aumento de produção de alimentos, o que acaba gerando uma maior quantidade de resíduos agroindustriais. Um exemplo disso é o cultivo de soja no Brasil, que anualmente rende aproximadamente 95 milhões de toneladas, e por consequência gera uma grande quantidade de resíduos, como a fibra de soja. Visto que uma alternativa ao descarte da fibra de soja é a utilização da mesma para produzir XOs, moléculas prebióticas que proporcionam diversos benefícios a saúde, e que parte dos microrganismos presentes em grãos kefir são bactérias ácido-lática, as quais possuem capacidade de metabolizar este prebiótico, é possível que a utilização concomitante de grãos de kefir e de XOs resulte na produção de um fermentado com um maior valor nutricional agregado.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

O objetivo deste projeto é analisar a capacidade de metabolização por bactérias ácido-láticas, microrganismos presentes em grãos kefir, de xilooligossacarídeos provenientes de fibra de soja previamente fermentada.

3.2. Objetivos Específicos

Produzir XOs em fibra de soja utilizando xilanase e arabinofuranosidase provenientes de *Aspergillus nidullans* recombinantes;

Avaliar a atividade prébiotica dos XOs produzidos anteriormente durante o cultivo de bactérias ácido-láticas;

Analisar o crescimento de grãos kefir na presença de XOs e a produção de ácido lático durante o cultivo dos mesmos.

4. Materiais e Métodos

4.1. Microrganismos e Biomassa

Este estudo utilizou dois *Aspergillus nidulans* ATT7 geneticamente modificados. O primeiro, com a inserção do gene heterólogo hendo-1,4-xilanase (*xynC*), e o segundo, do gene α -L-arabinofuranosidase (*abfB*); genes que codificam enzimas responsáveis pela produção de XOs, xilanase e arabinofuranosidase, respectivamente (SEGATO *et al.*, 2012). Os fungos foram gentilmente cedidos pela Universidade de Campinas (UniCamp). Ambos microrganismos foram mantidos em meio mínimo, composto por NaNO₃ (6,0 g.L⁻¹), KCl (0,52 g.L⁻¹), MgSO₄·7 H₂O (0,52 g.L⁻¹), KH₂PO₄ (1,52 g.L⁻¹) (GONÇALVES *et al.*, 2012). Além disso, solução de elementos traços (2 mL.L⁻¹), piridoxina (0,1 g.L⁻¹), maltose (20 g.L⁻¹), glicose (10 g.L⁻¹) e ágar (15 g.L⁻¹) também foram adicionados ao meio, sendo que este teve pH ajustado a 6,5 utilizando-se NaOH 0,1 M. As culturas foram incubadas por 72 h a 37°C.

Os grãos kefir foram provenientes de uma cultura doada por uma residência privada de Porto Alegre, e foram mantidos em meio composto por 10 g.L⁻¹ de leite em pó. Anteriormente aos experimentos, os grãos foram cultivados por 24 horas a 27 °C, 180 rpm.

A biomassa, fibra de soja, foi doada pela empresa DuPont, Esteiro.

4.2. Produção Enzimas

As enzimas necessárias para este estudo foram produzidas por meio de cultivo em estado sólido em frascos tipo Erlenmeyer 125 mL, contendo um total de 5 g de fibra de soja. O cultivo foi feito separadamente para cada microrganismo citado anteriormente. Para isto, adicionou-se umidade de 70% a fibra de soja, obtida através de adição de meio mínimo com 100 mM de tampão HEPES, e posteriormente o resíduo já úmido foi autoclavado. Para o inóculo do cultivo, fez-se

suspensão de esporos com água e Tween 80, e contagem dos mesmos em câmara de Neubauer. Após contagem, adicionou-se volume da suspensão equivalente a 10^6 esporos g^{-1} de fibra de soja. O cultivo foi feito a 37 °C em estado estático. Para os microrganismos contendo o gene heterólogo *xync*, fez-se extração das enzimas após 72 h de cultivo, e para o contendo *abfb*, após 96 h (PEREIRA, 2017).

4.3. Obtenção extrato enzimático bruto e Quantificação Enzimática

A extração das enzimas foi feita utilizando-se 30 mL de tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0. Atividade enzimática do extrato enzimático total foi avaliada a partir do método ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) descrito por Miller (1959).

Para ambos, a extração fez-se adicionando 6 mL⁻¹ de tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0, mantendo-se frascos em agitador orbital a 30 °C, 180 rpm por 30 min. Posteriormente, os extratos enzimáticos brutos foram recolhidos para quantificação das enzimas de interesse (PEREIRA, 2017).

Para a quantificação das enzimas de interesse, primeiramente fez-se uma reação enzimática em tubos de ensaio utilizando-se 500 µL de amostra e 500 µL de uma solução 1 % de xilana, para quantificação de xilanase, ou de uma solução 1 % de arabinana, para quantificação de arabinofuranosidase. A reação foi incubada em banho à 50 °C por 30 min. Após, adicionou-se 1 mL de solução ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) aos tubos, e estes permaneceram por 5 min a 100 °C (Miller, 1959). A absorbância da reação foi lida em um comprimento de onda de 540 nm e o resultado foi comparado a uma curva de calibração utilizando xilose e arabinose como padrões. Uma unidade (U) de xilanase ou arabinofuranosidase foi definida como a liberação de 1 µmol de xilose ou arabinose por minuto sob as condições do método.

4.4. Produção de XOS utilizando combinação enzimática

Dados não publicados obtidos no laboratório indicam que a fibra de soja possui cerca de 0,16 g de xilana por g de fibra de soja. Para cada grama do substrato enzimático, xilana, foram utilizadas 100 U de xillanase e 100 U de arabinofuranosidase. Além disso, adicionou-se 40 mL de tampão acetato de sódio 50 mM pH 4,75 a cada 5 g de fibra de soja. A reação foi feita em frascos tipo Erlenmeyer de 125 mL e mantida em agitador orbital a 50 °C durante 8 h.

4.5. Extração e quantificação XOs

Primeiramente, a inativação das enzimas foi feita colocando-se os erlenmeyer da reação em banho a 100 °C durante 15 min. Posteriormente, a extração de XOs foi feita, de forma sequencial. Adicionou-se 20 mL de água destilada ao primeiro frasco, o qual permaneceu em agitador orbital a 30 °C e 180 rpm durante 15 min. Após, o conteúdo do frasco foi centrifugado a 4000 g durante 10 min. O sobrenadante foi recolhido e 20 mL deste foram transferidos para o próximo frasco. Este procedimento repetiu-se até o 6º frasco, o qual teve seu sobrenadante recolhido e mantido em frasco a -20 °C.

Em seguida, 2 mL do sobrenadante foram filtrados em membrana de acetato de celulose 0,22 µm, e o filtrado foi analisado por Cromatografia Gasosa de Alta Eficiência (HPLC). Nesta análise, a coluna Aminex HPX 42A, a qual analisa oligossacarídeos da amostra, foi utilizada. Como fase móvel, utilizou-se água ultrapura, com fluxo de 0,6 mL.min⁻¹ e temperatura de forno de 85 °C. O volume de injeção de amostra foi 20 µL. XOs foram identificados através dos padrões xilose (X1), xilobiose (X2), xilotriose (X3), xilotetraose (X4), xilopentose (X5) e xilohexaose (X6).

4.6. Fermentação de XOs por grãos kefir *in vitro*

O cultivo dos grãos kefir foi feito em tubos de ensaio contendo 4 mL de meio mínimo composto por 2,5 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 5 g.L⁻¹ de peptona, com ou

sem a adição de 1 mL de extrato de XOs e/ou 1 mL de uma solução 5 g.L⁻¹ de lactose, obtendo-se uma concentração final de 1 g.L⁻¹ de lactose. No controle negativo, adicionou-se 1 mL de água destilada estéril. XOs utilizados foram previamente filtrados em membrana de acetato de celulose 0,22 µm para manter meio estéril. A cada tubo de ensaio, adicionou-se 1 grão kefir, o qual foi previamente lavado com água destilada estéril, tendo umidade externa removida utilizando-se papel filtro estéril. Após remoção de umidade superficial, os grãos foram pesados em balança analítica.

O crescimento dos grãos kefir foi analisado em diferentes tempos de cultivo (6h, 12h). Para isto, comparou-se o peso pré e pós-cultivo, sendo que após o cultivo, os grãos foram novamente lavados e secos, para anotação do peso final e posterior comparação.

4.7. Produção de ácido láctico

A produção de ácido láctico foi analisada por HPLC. Após tempo de fermentação de 0, 6 e 12 h, amostras foram coletadas e filtradas em membrana de acetato e celulose 0,22 µm. As amostras foram quantificadas utilizando a coluna Aminex HPX 87H, coluna ideal para análise de ácidos orgânicos. A fase móvel utilizada foi uma solução de ácido sulfúrico 5 mM (H₂SO₄), nas condições de fluxo de 0,6 mL min⁻¹ e temperatura de forno de 45 °C. O volume de injeção de amostra foi 20 µL.

4.8. Análises grão kefir

Peso seco dos grãos kefir foi analisado pesando os grãos antes e após secagem em estufa a 70 °C, até peso permanecer constante.

4.9. Análises Estatísticas

Todos os experimentos foram feitos em triplicados e os os resultados foram avaliados por teste Tukey, utilizando o pacote de estatística Sisvar 5.6 para Windows.

5. Resultados

5.1. Produção das enzimas xilanase e arabinofuranosidase

A utilização de cultivo em estado sólido utilizando-se resíduos agroindustriais como fonte de carbono para o crescimento de fungos filamentosos e produção de enzimas apresenta diversas vantagens quanto a outras formas de cultivo. Entre estas, estão a necessidade de utilizar pouca água, baixo risco de contaminação e a possibilidade de utilizar este cultivo para a produção de enzimas, ácidos orgânicos, aminoácidos, etanol, alcaloides, metabólitos secundários, entre outros (LEIFA *et al.*, 2000; FARINAS, 2015; MANSOUR *et al.*, 2016). Devido à composição da hemicelulose da fibra de soja, que é rica em xilana (HECK *et al.*, 2002), este é um excelente resíduo para a produção de xilanase e arabinofuranosidase. Aliando isto aos benefícios da utilização dos organismos geneticamente modificados, ambos possuindo um promotor induzido por maltose (GONÇALVES *et al.*, 2012), a qual é biodisponível na fibra de soja (dados não mostrados), pode-se obter um alto nível de expressão dos genes codificadores destas proteínas. No presente trabalho, obteve-se 23,9 U.mL⁻¹ de xilanase e 12,09 U.mL⁻¹ de arabinofuranosidase.

5.2. Produção de xilooligossacarídeos

Ainda devido a sua composição, que apresenta grande quantidade de xilana, a utilização da fibra de soja para a produção de XOs também é possível, visto que as enzimas produzidas hidrolisam esse substrato (SAHA, 2000; GONÇALVES *et al.*, 2012; MOTTA *et al.*, 2013). Os extratos enzimáticos brutos contendo as enzimas heterólogas, xilanase e arabinofuranosidase, foram utilizados na produção de XOs. As melhores condições de temperatura e concentração enzimática foram analisadas em trabalho anterior (PEREIRA, 2017). Seguindo as condições de temperatura, agitação e umidade e tempo propostos pelo estudo anterior, e o método de extração sequencial de XOs proposto por este trabalho, obteve-se um extrato composto por 2,737 mg.mL⁻¹ de xilobiose, 1,611 mg.mL⁻¹ de xilotriose, 0,700 mg.mL⁻¹ de xilotetraose, 0,640 mg.mL⁻¹ de xilopentose e 0,570 mg.mL⁻¹ de xilohexaose (Tabela

1). A obtenção de um extrato contendo maior concentração de xilobiose e xilotriose em comparação aos XOs com um maior grau de polarização é vantajoso pois ambos, xilobiose e xilotriose, possuem maior aplicabilidade, devido a sua metabolização por um maior número de BAC (CHEN *et al.*, 1997; UÇKUN KIRAN *et al.*, 2013).

Tabela 1. Análise quantitativa de XOS produzidos por hidrólise enzimática de fibra de soja.

XOS	Concentração (mg/mL)
Xilobiose	2,737 (\pm 0,121)
Xilotriose	1,611 (\pm 0,175)
Xilotetraose	0,700 (\pm 0,181)
Xilopentose	0,640 (\pm 0,115)
Xilohexose	0,579 (\pm 0,157)

5.3. Crescimento de grãos kefir

Kefir é uma bebida artesanal amplamente consumida no Brasil, sendo que nesta região esta é gerada a partir da fermentação do leite ou de uma solução contendo açúcar mascavo (GARROTE *et al.*, 2001). Os grãos de kefir utilizados neste trabalho apresentavam consistência gelatinosa, coloração esbranquiçada, com uma superfície irregular contendo diversos lóbulos, similar a pipoca ou couve-flor (Figura 1). O peso úmido dos grãos apresentou grande variação devido à diversidade de tamanho dos mesmos, porém, estes eram compostos por 87 % (\pm 2,3) de água, tendo características similares as encontradas em outros estudos (ABRAHAM, DE ANTONI, 1999; GARROTE *et al.*, 2001; OTLES, CAGINDI, 2003).

Sabendo-se que grãos kefir são compostos por BAL e que XOs possuem capacidade de estimular o crescimento de algumas BAL, o crescimento dos grãos kefir na presença deste prebiótico foi analisado. Observou-se que o crescimento do kefir é maior na presença de XOs e lactose, enquanto somente na presença de XOs, o crescimento é menos expressivo e se dá de forma similar quando não há lactose no meio (Figura 2). Isto provavelmente acontece pelo fato de XOs ser um aditivo alimentar; um estimulante de crescimento, logo, o metabolismo dos microrganismos precisa estar ativado para estes consumirem o prebiótico em questão.



Figura 1. Estrutura macroscópica de grãos kefir.

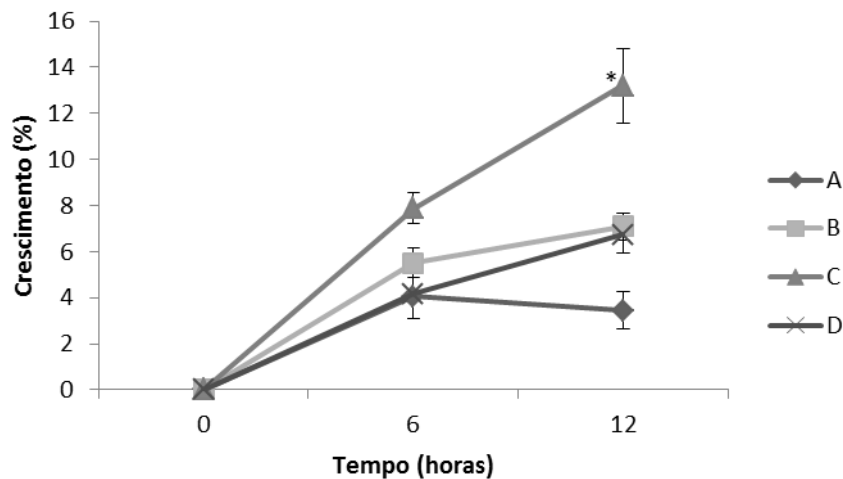


Figura 2. Crescimento dos grãos kefir. As letras indicam os tratamentos utilizados, sendo fermentação em A (♦) controle, B (■) com lactose, C (▲) com lactose e XOs e D (×) com XOs. Observa-se que no tratamento C há maior crescimento dos grãos. As barras representam a média \pm erro padrão. Asterisco indica diferença significativa pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$).

5.4. Produção ácido lático

Ácido lático é o principal ácido orgânico produzido durante a fermentação do leite pelos grãos kefir e de laticínios em geral. Este ácido ocasiona mudanças sensoriais e qualitativas do produto (URBACH, 1995), além de proporcionar um maior tempo de prateleira para os fermentados, por diminuir o pH do meio, inibindo o crescimento de bactérias patogênicas, e facilitar a digestão de componentes do leite (MARTINEZ *et al.*, 2013). Ele deriva principalmente da lactose presente no meio, e estudos mostram que quando os grãos kefir são fermentados utilizando leite como substrato, parte da lactose total é transformada em ácido lático (ALM, 1982; ROSA *et al.*, 2017). No presente trabalho, a maior produção de ácido lático ocorreu na fermentação na presença de XOs e lactose, tendo valor máximo de 20 mg.L^{-1} em 12 h de cultivo. O baixo rendimento pode ser relacionado com a composição do meio, pobre em lactose. Além disso, não houve diferença estatística na produção de ácido lático na presença ou ausência de XOs, logo, este não influenciou a produção deste composto (Figura 3). É possível que XOs estimulem a produção de outros ácidos orgânicos que não foram analisados neste trabalho, uma vez que na presença de

outros oligossacarídeos, isomalto-oligossacarídeo e frutooligossacarídeo, os grãos kefir produzem mais compostos ácidos (OH *et al.*, 2013). Observou-se também que mesmo na ausência de lactose no meio, houve produção do composto em questão, o que pode ser ocasionado por um metabolismo tardio de lactose presente no meio em que os grãos se encontravam anteriormente aos experimentos.

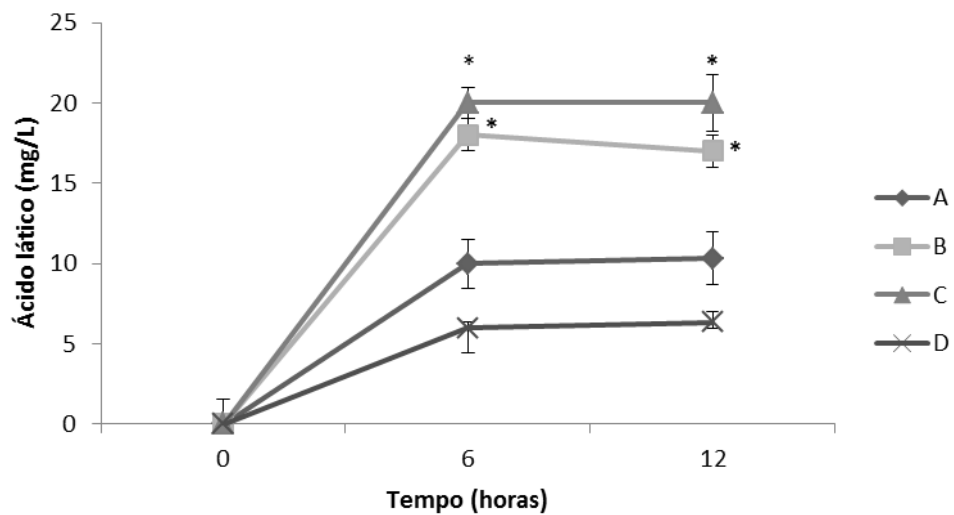


Figura 3. Produção de ácido láctico durante a fermentação pelos grãos kefir. As letras indicam os tratamentos utilizados, sendo fermentação em A (◆) controle, B (■) com lactose, C (▲) com lactose e XOs e D (×) com XOs. Observa-se que na presença de lactose há maior produção de ácido láctico, independente da presença de XOs no meio. As barras representam a média \pm erro padrão. Asterisco indica diferença significativa pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$).

6. Conclusão

De acordo com os resultados encontrados neste trabalho, xilooligossacarídeos possuem potencial para serem utilizados como ingredientes funcionais na preparação de kefir, por proporcionarem maior crescimento da cultura, o que também foi demonstrado no uso de outros compostos funcionais, tais como frutooligossacarídeos, maltodextrina, oligofrutose e polidextrose (DE SOUZA OLIVEIRA *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2009; OH *et al.*, 2013). Entretanto, este composto não possui influência na produção de ácido láctico. Mais estudos utilizando XOs como ingredientes funcionais no processo de fermentação por grãos kefir são necessários, visando ter um alimento simbiótico com maior valor nutricional, visto que este prebiótico pode influenciar na produção de outros compostos com propriedades benéficas.

7. Referências

- ABRAHAM, A. G. AND DE ANTONI, G. L. (1999) 'Characterization of kefir grains grown in cows' milk and in soya milk', *Journal of Dairy Research*, 66(2), pp. 327–333. doi: 10.1017/S0022029999003490.
- ABRAMS, S. A., GRIFFIN, I. J., HAWTHORNE, K. M., LIANG, L., GUNN, S. K., DARLINGTON, G. AND ELLIS, K. J. (2005) 'A combination of prebiotic short- and long-chain inulin-type fructans enhances calcium absorption and bone mineralization in young adolescents', *American Journal of Clinical Nutrition*, 82(2), pp. 471–476. doi: 82/2/471 [pii].
- AL-SHERAJI, S. H., ISMAIL, A., MANAP, M. Y., MUSTAFA, S., YUSOF, R. M. AND HASSAN, F. A. (2013) 'Prebiotics as functional foods: A review', *Journal of Functional Foods*. Elsevier Ltd, 5(4), pp. 1542–1553. doi: 10.1016/j.jff.2013.08.009.
- ALM, L. (1982) 'Effect of Fermentation on L(+) and D(-) Lactic Acid in Milk', *Journal of Dairy Science*. Elsevier, 65(4), pp. 515–520. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(82)82228-5.
- ANDERSON, J. W., BAIRD, P., DAVIS JR, R. H., FERRERI, S., KNUDTSON, M., KORAYM, A., WATERS, V. AND WILLIAMS, C. L. (2009) 'Health benefits of dietary fiber', *Nutrition Reviews*, 67(4), pp. 188–205. doi: 10.1111/j.1753-4887.2009.00189.x.
- CAPARRÓS, S. GARROTE, G., ARIZA, J., JESÚS DÍAZ, M. AND LÓPEZ, F. (2007) 'Xylooligosaccharides production from *Arundo donax*', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(14), pp. 5536–5543. doi: 10.1021/jf063159p.
- CASTILLO MARTINEZ, F. A., BALCIUNAS, E. M., SALGADO, J. M., DOMÍNHUEZ GONZÁLVEZ, J. M. AND OLIVEIRA, R. P. S. (2013) 'Lactic acid properties, applications and production: A review', *Trends in Food Science and Technology*, 30(1), pp. 70–83. doi: 10.1016/j.tifs.2012.11.007.
- CHAPLA, D., PANDIT, P. AND SHAH, A. (2012) 'Production of xylooligosaccharides from corncob xylan by fungal xylanase and their utilization by probiotics', *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd, 115, pp. 215–221. doi: 10.1016/j.biortech.2011.10.083.

CHEN, C., CHEN, J. L. AND LIN, T. Y. (1997) 'Purification and characterization of a xylanase from *Trichoderma longibrachiatum* for xylooligosaccharide production', *Enzyme and Microbial Technology*, 21(2), pp. 91–96. doi: 10.1016/S0141-0229(96)00236-0.

FARINAS, C. S. (2015) 'Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector', *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. Elsevier, 52, pp. 179–188. doi: 10.1016/j.rser.2015.07.092.

FARNWORTH, E. R. (2005) 'Kefir – a complex probiotic', *Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods*, 2(1), pp. 1–17. doi: 10.1616/1476-2137.13938.

FOOKS, L. J., FULLER, R. AND GIBSON, G. R. (1999) 'Prebiotics, probiotics and human gut microbiology', *International Dairy Journal*, 9(1), pp. 53–61. doi: 10.1016/S0958-6946(99)00044-8.

FULLER, R. (1989) 'Probiotics in man and animals', *Journal of Applied Bacteriology*, 66(5), pp. 365–378. doi: 10.1111/j.1365-2672.1989.tb05105.x.

GARROTE, G. L., ABRAHAM, A. G. AND DE ANTONI, G. L. (2001) 'Chemical and microbiological characterisation of kefir grains.', *The Journal of dairy research*, 68(4), pp. 639–652. doi: 10.1017/S0022029901005210.

GIBSON, G. R. AND ROBERFROID, M. B. (1995) 'Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics.', *The Journal of nutrition*, 125(6), pp. 1401–1412. doi: 10.1079/NRR200479.

GONÇALVES, T. A., DAMÁSIO, A. R. L., SEGATO, F., ALVAREZ, T. M., BRAGATTO, J., BRENELLI, L. B., CITADINI, A. P. S., MURAKAMI, M. T., RULLER, R., PAES LEME, A., F., PRADE, R. A. AND SQUINA, F. M.. (2012) 'Functional characterization and synergic action of fungal xylanase and arabinofuranosidase for production of xylooligosaccharides.pdf', *Bioresource Technology*, 119, pp. 293–299. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.05.062>.

GUZEL-SEYDIM, Z. B., KOK-TAS, T., GREENE, A. K.(2011) 'Review: Functional properties of kefir', *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(3), pp. 261–268. doi: 10.1080/10408390903579029.

HECK, J. X., HERTZ, P. F. AND AYUB, M. A. Z. (2002) 'Cellulase and xylanase production by isolated amazon Bacillus strains using soybean industrial residue based solid-state cultivation', *Brazilian Journal of Microbiology*, 33(3), pp. 213–218. doi: 10.1590/S1517-83822002000300005.

JAIN, I., KUMAR, V. AND SATYANARAYANA, T. (2015) 'Xylooligosaccharides: an economical prebiotic from agroresidues and their health benefits', *Indian Journal of Experimental Biology*, 53(March), pp. 131–142.

JENSEN, H., GRIMMER, S. AND NATERSTAD, K. (2012) 'In vitro testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria', *International Journal of Food Microbiology*. Elsevier B.V., 153(1–2), pp. 216–222. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.020.

KLEIN, G., PACK, A. AND BONAPARTE, C. (1998) 'Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria', *International Journal of Food Microbiology*, 41(2), pp. 103–125. doi: 10.1016/S0168-1605(98)00049-X.

LEACH, J. D. AND SOBOLIK, K. D. (2010) 'High dietary intake of prebiotic inulin-type fructans in the prehistoric Chihuahuan Desert.', *The British journal of nutrition*, 103(11), pp. 1558–61. doi: 10.1017/S0007114510000966.

LEE, M. Y., AHN, K. S., KWON, O. K., KIM, M. J., KIM, M. K., LEE, I. Y., OH, S. R. AND LEE, H. K. (2007) 'Anti-inflammatory and anti-allergic effects of kefir in a mouse asthma model', *Immunobiology*, 212(8), pp. 647–654. doi: 10.1016/j.imbio.2007.05.004.

LEIFA, F., PANDEY, A AND SOCCOL, C. R. (2000) 'Solid state cultivation--an efficient method to use toxic agro-industrial residues.', *Journal of basic microbiology*, 40(3), pp. 187–97. doi: 10.1002/1521-4028(200007)40:3<187::AID-JOBM187>3.0.CO;2-Q.

LEITE, A. M. DE O., MIGUEL, M. A. L., PEIXOTO, R. S., ROSADO, A. S., SILVA, J. T. AND PASCHOALIN, V. M. F. (2013) 'Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: A natural probiotic beverage', *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(2), pp. 341–349. doi: 10.1590/S1517-83822013000200001.

LI, Z., SUMMANEN, P. H., KOMORIYA, T. AND FINEGOLD, S. M. (2015) 'In vitro study of the prebiotic xylooligosaccharide (XOS) on the growth of Bifidobacterium spp and Lactobacillus spp.', *International journal of food sciences and nutrition*, 66(8), pp. 919–22. doi: 10.3109/09637486.2015.1064869.

LIN, S. H., CHOU, L. M., CHIEN, Y. W., CHANG, J. S. AND LIN, C. I. (2016) 'Prebiotic Effects of Xylooligosaccharides on the Improvement of Microbiota Balance in Human Subjects', *Gastroenterology Research and Practice*. Hindawi Publishing Corporation, 2016. doi: 10.1155/2016/5789232.

MAKAROVA, K. S., SLESAREV, A., WOLF, Y., SOROKIN, A., MIRKIN, B., KOONIN, E. V., PAVLOV, A., PAVLOVA, N., KARAMYCHEV, V., POLOUCHINE, N., SHAKHOVA, V., GRIGORIEV, I., LOU, Y., ROHKSAR, D., LUCAS, S., HUANG, K., GOODSTEIN, D. M., HAWKINS, T., PLENGVIDHYA, V., WELKER, D. L., HUGHES, J. E., GOH, Y., BENSON, A., BALDWIN, K. A., LEE, J. H., DÍAZ-MUÑIZ, I., DOSTI, B., SMEIANOV, V.V., WECHTER, W., BARABOTE, T., LORCA, G. L., ALTERMANN, E., BARRANGOU, R., GANESAN, B., XIE, Y., RAWSTHORNE, H., TAMIR, D., PARKER, C., BREIDT, F., BROADBENT, J., R., HUTKINS, R., O'SULLIVAN, D., STEELE, J. L., UNLU, G., SAIER, M. H., KLAENHAMMER, T. R., RICHARDSON, P., KOZYAVKIN, S., WEIMER, B. C. AND MILLS, D. A. (2006) 'Comparative genomics of the lactic acid bacteria.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(42), pp. 15611–15616. doi: 10.1073/pnas.0607117103.

MÄKELÄINEN, H., FORSSTEN, S., SAARINEN, M., STOWELL, J., RAUTONEN, N. AND OUWEHAND, A. C.(2010) 'Xylo-oligosaccharides enhance the growth of bifidobacteria and Bifidobacterium lactis in a simulated colon model', *Beneficial Microbes*, 1(1), pp. 81–91. doi: 10.3920/BM2009.0025.

MANSOUR, A. A., ARNAUD, T., LU-CHAU, T. A., FDZ-PLANCO, M., MOREIRA, M.

T. AND RIVERO, J. A. C. (2016) 'Review of solid state fermentation for lignocellulolytic enzyme production: challenges for environmental applications', *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 15(1), pp. 31–46. doi: 10.1007/s11157-016-9389-7.

MARTINEZ, F. A. C., BALCIUNAS, E. M., SALGADO, J. M., GONZÁLEZ, J. M. D., CONVERTI, A., OLIVEIRA, R. P. S. (2013) 'Lactic acid properties, applications and production: A review' *Trends in Food Science & Technology*, 30(1), pp. 70-83. doi: 10.1016/j.tifs.2012.11.007.

MILLER, G. L-. (1959) 'Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar', *Analytical Chemistry*, 31(3), pp. 426–428. doi: 10.1021/ac60147a030.

MOTTA, F. L., ANDRADE, C. C. P., SANTANA, M. H. A. (2013) 'A Review of Xylanase Production by the Fermentation of Xylan: Classification, Characterization and Applications'. *Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization*. Intec.

MOURE, A., GULLÓN, P., DOMÍNGUEZ, H. AND PARAJÓ, J. C.(2006) 'Advances in the manufacture, purification and applications of xylo-oligosaccharides as food additives and nutraceuticals', *Process Biochemistry*, 41(9), pp. 1913–1923. doi: 10.1016/j.procbio.2006.05.011.

NALBANTOGLU, U., CAKAR, A., DOGAN, H., ABACI, N., USTEK, D., SAYOOD, K. AND CAN, H. (2014) 'Metagenomic analysis of the microbial community in kefir grains', *Food Microbiology*. Elsevier Ltd, 41, pp. 42–51. doi: 10.1016/j.fm.2014.01.014.

NIELSEN, B., GÜRAKAN, G. C. AND ÜNLÜ, G. (2014) 'Kefir: A Multifaceted Fermented Dairy Product', *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 6(3–4), pp. 123–135. doi: 10.1007/s12602-014-9168-0.

OH, N. S., LEE, H. A., MYUNG, J. H., LEE, J. Y., JOUNG, J., Y., SHIN, Y. K. AND BAICK, S. C. (2013) 'Effect of different commercial oligosaccharides on the fermentation properties in kefir during fermentation', *Korean Journal for Food*

Science of Animal Resources, 33(3), pp. 325–330. doi: 10.5851/kosfa.2013.33.3.325.

OKU, T. AND NAKAMURA, A. S. (2002) 'Digestion, absorption, fermentation, and metabolism of functional sugar substitutes and their available energy', *Pure and Applied Chemistry*, 74(7), pp. 1253–1261. doi: 10.1351/pac200274071253.

OLIVEIRA, R. P. S. FLORENCE, A. C. R., SILVA, R. C., PEREGO, P., CONVERTI, A., GIOIELLI, L. A. AND OLIVEIRA, M. N. (2009) 'Effect of different prebiotics on the fermentation kinetics, probiotic survival and fatty acids profiles in nonfat symbiotic fermented milk', *International Journal of Food Microbiology*. Elsevier B.V., 128(3), pp. 467–472. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.10.012.

OTLES, S. AND CAGINDI, O. (2003) 'Kefir: A Probiotic Dairy-Composition, Nutritional and Therapeutic Aspects', *Pakistan Journal of Nutrition*, 2(2), pp. 54–59. doi: 10.3923/pjn.2003.54.59.

PEREIRA, G. F. 'Aproveitamento do resíduo fibra de soja na produção de enzimas hemicelulolíticas por *Aspergillus nidulans* recombinante e aplicação na produção de xilo-oligossacarídeos' (2017) 66 pp. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2017.

POGAČIĆ, T. ŠINKO, S., ZAMBERLLIN, Š AND SAMARŽIJA, D. (2013) 'Microbiota of kefir grains', *Mljekarstvo*, 63(1), pp. 3–14. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84875201502&partnerID=40&md5=5e0dda4274c250edddaafc2c64c9cb56>.

PRADO, M. R., BLANDÓN, L. M., VANDENBERGHE, L. P. S., RODRIGUES, C., CASTRO, G. R., THOMAZ-SOCCOL, V. AND SOCCOL, C. (2015) 'Milk kefir: Composition, microbial cultures, biological activities, and related products', *Frontiers in Microbiology*, 6(OCT), pp. 1–10. doi: 10.3389/fmicb.2015.01177.

REDDY, S. S. AND KRISHNAN, C. (2016) 'Production of high-pure xylooligosaccharides from sugarcane bagasse using crude β -xylosidase-free xylanase of *Bacillus subtilis* KCX006 and their bifidogenic function', *LWT - Food Science and Technology*. Elsevier Ltd, 65, pp. 237–245. doi:

10.1016/j.lwt.2015.08.013.

ROBERFROID, M. (2000) 'Prebiotics and probiotics: are they functional foods?', *Am J Clin Nutr*, 71, pp. 1682–1687.

ROBERFROID, M. (2007) 'Prebiotics : The Concept Revisited 1 , 2', *The Journal of Nutrition*, 137(3), p. 830S–837S. doi: 10.2527/jas2017.1671.

RODRIGUES, K. L., GAUDINO CAPUTO, L. R., TAVARES CARVALHO, J. C., EVANGELISTA, J. AND SCHNEEDORF, J. M. (2005) 'Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract', *International Journal of Antimicrobial Agents*, 25(5), pp. 404–408. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2004.09.020.

DE ROOS, J. AND DE VUYST, L. (2018) 'Acetic acid bacteria in fermented foods and beverages', *Current Opinion in Biotechnology*. Elsevier Ltd, 49, pp. 115–119. doi: 10.1016/j.copbio.2017.08.007.

ROSA, D. D., DIAS, M. M. S., GRZEŚKOWIAK, Ł, REIS, S., A., CONCEIÇÃO, L. L. AND PELUZIO, M. D. C. G. (2017) 'Milk kefir: Nutritional, microbiological and health benefits', *Nutrition Research Reviews*, 30(1), pp. 82–96. doi: 10.1017/S0954422416000275.

SAHA, B. C. (2000) 'α-L-Arabinofuranosidases: Biochemistry, molecular biology and application in biotechnology', *Biotechnology Advances*, 18(5), pp. 403–423. doi: 10.1016/S0734-9750(00)00044-6.

SÁNCHEZ, B., DELGADO, S., BLANCO-MÍGUEZ, A., LOURENÇO, A., GUEIMONDE, M., & MARGOLLES, A. (2017) 'Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease', *Molecular nutrition & food research*, 61(1)(2017), pp. 1–42. doi: 10.1002/mnfr.201600240.This.

SARTOR, R. B. (2004) 'Therapeutic Manipulation of the Enteric Microflora', pp. 1620–1633. doi: 10.1053/j.gastro.2004.03.024.

SEGATO, F., DAMÁSIO, A.R., GONCALVES, T.A., DE LUCAS, R.C., SQUINA, F.M., DECKER, S.R. AND PRADE, R.A. (2012). High-yield secretion of multiple client

proteins in *Aspergillus*. *Enzyme and microbial technology*, 51(2), pp.100-106. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2012.04.008>.

SLAVIN, J. (2013) 'Fiber and prebiotics: Mechanisms and health benefits', *Nutrients*, 5(4), pp. 1417–1435. doi: 10.3390/nu5041417.

ŚLIŻEWSKA, K., KAPUŚNIAK, J., BARCZYŃSKA, R. AND JOCHYM, K. (2012) 'Resistant Dextrins as Prebiotic', *Carbohydrates*, pp. 261–288. doi: 41117.

DE SOUZA OLIVEIRA, R. P., PEREGO, P., CONVERTI, A., DE OLIVEIRA, M. N. (2009) 'Growth and acidification performance of probiotics in pure culture and co-culture with *Streptococcus thermophilus*: The effect of inulin', *LWT - Food Science and Technology*. Elsevier Ltd, 42(5), pp. 1015–1021. doi: 10.1016/j.lwt.2009.01.002.

SWENNEN, K., COURTIN, C. M. AND DELCOUR, J. A. (2006) 'Non-digestible oligosaccharides with prebiotic properties', *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46(6), pp. 459–471. doi: 10.1080/10408390500215746.

TEUSINK, B. AND MOLENAAR, D. (2017) 'Systems biology of lactic acid bacteria: For food and thought', *Current Opinion in Systems Biology*. Elsevier Ltd, 6, pp. 7–13. doi: 10.1016/j.coisb.2017.07.005.

UÇKUN KIRAN, E., AKPINAR, O. AND BAKIR, U. (2013) 'Improvement of enzymatic xylooligosaccharides production by the co-utilization of xylans from different origins', *Food and Bioproducts Processing*, 91(4), pp. 565–574. doi: 10.1016/j.fbp.2012.12.002.

URBACH, G. (1995) 'Contribution of lactic acid bacteria to flavour compound formation in dairy products', *International Dairy Journal*, 5(8), pp. 877–903. doi: 10.1016/0958-6946(95)00037-2.

VA, M. J. AND ALONSO, J. L. (2000) 'Xylooligo- saccharides: manufacture and applications', *Trends in Food Science & Technology*, 11(11), pp. 387–393. doi: 10.1016/S0924-2244(01)00031-0.

VINDEROLA, C. G., DUARTE, J., THANGAVEL, D., PERDIGÓN, G., FARNWORTH,

E. AND MATAR, C. (2005) 'Immunomodulating capacity of kefir', *Journal of Dairy Research*, 72(2), pp. 195–202. doi: 10.1017/S0022029905000828.

YUAN, Q. P., ZHANG, H., QIAN, Z. M. AND YANG, X. J. (2004) 'Pilot-plant production of xylo-oligosaccharides from corncob by steaming, enzymatic hydrolysis and nanofiltration', *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 79(10), pp. 1073–1079. doi: 10.1002/jctb.1071.

ZHOU, J., LIU, X., JIANG, H. AND DONG, M. (2009) 'Analysis of the microflora in Tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis', *Food Microbiology*, 26(8), pp. 770–775. doi: 10.1016/j.fm.2009.04.009.