

Isolamento e identificação por PCR ARDRA de *Lactobacillus* spp. de grãos de kefir cultivados em leite ou água açucarada

Mário Abatemarco Jr ,
Marta M. G. Aguiar²
Álvaro Cantini Nunes³
Elisabeth Neumann³

Jacques Robert Nicolli⁴

RESUMO: O Kefir é uma bebida obtida pela fermentação dos grãos de Kefir, que são semelhantes a pedaços de couve-flor, constituídos por espécies de bactérias do ácido láctico, leveduras e exopolissacarídeo secretado por algumas espécies do gênero *Lactobacillus*. Foram isolados *Lactobacillus* spp de 3 amostras de grãos de Kefir cultivados em leite ou água açucarada. Após uma identificação preliminar, as bactérias com características morfofisiológicas típicas do gênero *Lactobacillus* foram submetidas a uma identificação em nível de espécie utilizando-se a PCR ARDRA. Esta técnica foi eficiente para identificar dezesseis, dos vinte microrganismos isolados, sendo todos esses da espécie *L. casei*. O perfil eletroforético dos quatro restantes parece ter sido fruto de uma combinação de perfis de duas espécies distintas de *Lactobacillus*.

PALAVRAS CHAVE: Grãos de Kefir, *Lactobacillus*, PCR ARDRA

INTRODUÇÃO

O Kefir é uma bebida fermentada, ácida e com baixo teor alcoólico (LOPITZ-OTSOA, *et al*, 2006). Historicamente, os grãos de Kefir foram considerados um presente de Allah entre os povos Muslim do norte das montanhas caucasianas da Rússia, onde tem sido consumida há milhares de anos. Somente há dois séculos é que a bebida se difundiu por todo o mundo (LOPITZ-OTSOA, *et al*, 2006; SCHNEENDORF, *et al*, 2008). A palavra Kefir é derivada do termo turco "keif" que expressa à sensação de bem estar após a ingestão da bebida. Os grãos de Kefir, passados de geração em geração entre as tribos do Cáucaso, eram considerados a riqueza da família. (LOPITZ-OTSOA, *et al*, 2006).

A Instrução Normativa 46 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) do Brasil, define Kefir como um produto da fermentação do leite pasteurizado ou esterilizado cuja fermentação se realiza com cultivos ácido-lácticos elaborados com grãos de Kefir, *Lactobacillus kefir*, espécies dos gêneros *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Acetobacter* com produção de ácido láctico, etanol e dióxido de carbono. Os grãos de Kefir são constituídos por leveduras fermentadoras de lactose (*Kluyveromyces marxianus*) e leveduras não fermentadoras de lactose (*Saccharomyces omnisporus* e *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces exiguus*), *Lactobacillus casei*,

Bifidobacterium sp e *Streptococcus salivarius* subsp *thermophilus* (BRASIL, 2007). Embora originalmente os grãos fossem cultivados apenas em leite pasteurizado, outros substratos têm sido utilizados como meio de cultivo, como solução aquosa de açúcar mascavo na concentração de 3 a 10%, suco de frutas e soro de leite (MIGUEL, 2009).

A ingestão de Kefir tem sido recomendada em algumas disordens metabólicas, hipertensão arterial sistêmica, doenças cardíacas isquêmicas e alergias (SALOFF COSTE, 1996; FARWORTH, 1999; ST-ONGE, 2002; FARNWORTH, *et al*, 2006). Os efeitos antibacteriano (ZACCONI, *et al*, 1995), imunológico (FURUKAWA, *et al*, 1991; THOUREUX e SCHMUCKER, 2001), antitumoral (FURUKAWA, *et al*, 1990; NAGIRA, *et al*, 2003) e hipocolesterolêmico já foram demonstrados em vários estudos. Os benefícios para a saúde humana demonstrados pela ingestão de Kefir permitem classificá-lo como probiótico definido pela Organização Mundial de Saúde como "microrganismos viáveis, que quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios para a saúde do hospedeiro" (FAO/WHO, 2001). Tal fato coloca este produto alimentar na categoria de "alimento funcional".

Os grãos de Kefir são irregulares e gelatinosos, cuja matriz é composta por proteínas e polissacarídeos que contém bactérias e leveduras as quais estão envolvidas no processo fermenta-

tativo. O tamanho dos grãos é variável e a forma assemelha-se com pipoca ou couve-flor (MARSHALL, 1993). Durante a fermentação os grãos aumentam de peso e assim é obtida nova biomassa que após ser coada do substrato pode ser reutilizada para obtenção de nova bebida (GARROTE, *et al.*, 2001).

A composição microbiológica dos grãos de Kefir é extremamente complexa. É consenso entre muitos autores que a microbiota dominante é composta pelos gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Acetobacter* e *Streptococcus* e leveduras dos gêneros *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Candida* e *Torula* (SCHNEENDORF e ANFITEATRO, 2004). A diversidade microbiológica pode variar em função da origem, condições de cultivo e estocagem dos grãos (GARROTE, *et al.*, 2001).

Microrganismos do gênero *Lactobacillus* têm a forma de bastonete ou cocos Gram positivos não móveis (ou raramente móveis) e não formadores de esporos cujo metabolismo é estritamente fermentativo (STAMER, 1979; KANDLER, 1983; HOLZAPFEL e WOOD, 1995). São anaeróbios facultativos ou microaerófilos que produzem ácido láctico como produto principal da fermentação da glicose (homofermentativos); mas há também representantes heterofermentativos, com produção de lactato, além de CO₂ e etanol em quantidades equimolares. De acordo com FELIS e DELLAGLIO (2007), o gênero é composto por 106 espécies. Algumas são produtoras de kefirano, que pode ser definido como um exopolissacarídeo parcialmente solúvel em água composto por unidades repetitivas de galactose e glicose, na proporção de 1,1:0,9 (MICHELLI *et al.*, 1999). *L. kefiranofaciens*, principal produtor de kefirano, é capaz de produzir o exopolissacarídeo sob diferentes condições de cultivo. TANIGUCHI e TANAKA (2004) mostraram que houve um aumento na produção de kefirano por *L. kefiranofaciens* na presença de condições de cultivo que mimetizam as ações de *Saccharomyces cerevisiae* em comparação ao cultivo da bactéria isoladamente. Este achado é uma forte evidência da complexa relação simbiótica existente entre as bactérias e leveduras que fazem parte da microbiota dos grãos. Juntos, o kefirano, as leveduras e as bactérias constituem uma comunidade simbiótica responsável pelas propriedades do Kefir.

A identificação de *Lactobacillus* em nível de espécie foi durante muito tempo realizada apenas com base em provas bioquímicas, fisiológicas e fenotípicas. Segundo FELIS e DELLAGLIO (2007), a principal discrepância na taxonomia do gênero *Lactobacillus* é a falta de correlação entre a posição filogenética e as propriedades metabólicas.

Diante disso, a abordagem molecular permite que as bactérias possam ser identificadas a partir das sequências dos seus genes, por meio da amplificação, via PCR (*Polimerase Chain*

Reaction). A amplificação dos genes de determinadas espécies, oriundas de uma amostra proveniente de um ecossistema complexo, como os grãos de Kefir, incluindo aquelas que ainda não são cultiváveis, requer *primers* que complementem sequências altamente conservadas. Por outro lado, a diferenciação entre as espécies, a partir dessas sequências, requer que a região amplificada tenha regiões variáveis que são específicas para cada espécie (KALRA *et al.*, 2007).

Dentro dos operons do RNA ribossomal (*rrn*), a região intergênica 16S-23S, exibe um elevado grau de variação para a identificação de diferentes gêneros bacterianos (CHENOLL; MACIÁN; AZNAR, 2003), incluindo os *Lactobacillus* (NOUR, 1998).

Atualmente, a maneira mais rápida de identificar os lactobacilos, bem como as bactérias em geral, é o sequenciamento parcial ou completo dos genes da subunidade 16S do RNAr (FELIS; DELLAGLIO, 2007), pois este possui uma série de regiões altamente conservadas e oito domínios variáveis que, coletivamente, identificam as espécies, mesmo diante da enorme diversidade bacteriana (KALRA *et al.*, 2007).

Apesar da rapidez e facilidade para identificação de *Lactobacillus* por sequenciamento, o custo para a operacionalização desta tecnologia é um fator limitante para muitos laboratórios. Como alternativa, encontra-se a PCR - ARDRA (Análise de Restrição de DNA Ribossomal Amplificado), que apesar de ser mais trabalhosa é financeiramente mais econômica. Além disso, é uma técnica de domínio no Laboratório de Genética Molecular de Protozoários Parasitas (LGMPP) no qual parte deste trabalho foi desenvolvido.

Resumidamente, na técnica de PCR-ARDRA o DNA total do microrganismo isolado é submetido a uma reação de polimerização em cadeia na qual o produto (a região intergênica 16S-23S) é submetido a um tratamento com enzimas de restrição e o resultado após eletroforese é comparado com o perfil de digestão teórico característico para cada espécie de lactobacilo.

Diante disso, este trabalho teve como objetivo isolar e identificar molecularmente microrganismos isolados de grãos de kefir cultivados em água açucarada ou em leite.

MATERIAIS E MÉTODOS

REAGENTES:

Açúcar mascavo comercial, leite em pó desnatado (Molico, Brasil), Cloreto de sódio (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), Peróxido de Hidrogênio 3% (v/v) (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), Ácido Clorídrico 1N (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), Hidróxido de Sódio 1N (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), Ágar De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) (Difco, USA) Ágar MRS (Merck, Alemanha), Glicerol (Nu-

clear, São Paulo, Brasil), Caldo MRS (Difco, Detroit, MI, USA), Kit Wizard Genomic System (Promega, Madison, E.U.A), Cloreto de lítio (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), Lisozima (Sigma-Aldrich, E.U.A), Sulfato de sódio em tampão TE com RNAase (Promega, Madison, E.U.A), Agarose (Invitrogen, Espanha).

Métodos:

AMOSTRAS DE GRÃOS DE KEFIR DISPONÍVEIS PARA O ESTUDO

Para a realização deste trabalho foram utilizadas três amostras de grãos de kefir. Cada uma recebeu um código, que se relacionou com o seu local de origem. Assim, a amostra proveniente de Salvador/BA recebeu o código KBA, a de Belo Horizonte/MG KBH e finalmente a de Viçosa KVI.

CULTIVO DOS GRÃOS DE KEFIR

Os grãos de Kefir provenientes de Salvador e Belo Horizonte foram cultivados em solução aquosa de açúcar mascavo comercial na concentração de 5% (p/v) e os grãos de Viçosa/MG foram cultivados em leite desnatado Molico® reconstituído na concentração de 10% (p/v). A troca do substrato era realizada a cada 24 h e sob temperatura ambiente.

ISOLAMENTO DE LACTOBACILLUS SPP. DE GRÃOS DE KEFIR

Dez gramas de grãos de Kefir provenientes das diferentes formas de cultivo (leite ou açúcar) foram acrescentadas em 90 mL de solução salina estéril (NaCl 0,9%) e trituradas em homogeneizador de tecidos (Ultra-Turrax, IKA T 10). Estas dispersões obtidas foram diluídas (diluição seriada decimal) em solução salina e plaqueadas pelo método de *Spread Plate*, em duplicata, nas diluições 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} utilizando como meio de cultura o Ágar De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) (Merck, Germany). O meio MRS foi preparado em soro de leite e teve o pH ajustado para 5,5, sendo adicionado de 200 ppm de cicloheximida para inibição do crescimento de leveduras. As placas foram incubadas em câmara de anaerobiose (Forma Scientific Marietta, EUA) contendo uma atmosfera de 85% N₂, 10% H₂ e 5% CO₂, por 5 e 7 dias em temperatura ambiente.

Após o período de incubação, foram isoladas colônias classificadas em diferentes morfotipos com base na cor, aspecto, textura e tamanho das colônias. Estas foram repicadas através de estrias simples em Ágar MRS modificado (Difco, USA) e incubadas em anaerobiose (Forma Scientific Marietta, EUA) por 48 horas em temperatura ambiente para obtenção de cultura pura.

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS DE LACTOBACILLUS SPP.

Após o descongelamento das amostras, 50 µL da cultura foram repicados para 5 mL de caldo MRS (Difco, Detroit, MI,

USA) e incubados por 18 horas em anaerobiose a temperatura ambiente. Este procedimento foi realizado duas vezes antes da extração do DNA total dos isolados.

Extração de DNA total com Kit Wizard Genomic System - Promega

1º PASSO: OBTENÇÃO DAS CÉLULAS SEM PAREDE E SEM MEMBRANA

De cada cultivo dos microrganismos que cresceram em caldo MRS, 5 mL foram centrifugados a 4.000 rpm, durante 10 minutos, à temperatura ambiente, para obtenção dos *pellets*. Os sobrenadantes foram descartados. Os pellets foram ressuspensos em 5 mL de água mili Q estéril e centrifugados nas mesmas condições citadas anteriormente para retirada dos resíduos do meio de cultura. Após descartar o sobrenadante, 1 mL de solução de cloreto de lítio (5M) foi adicionado em cada tubo *Falcon*® de 15 mL. Após ressuspender cada pellet, os mesmos foram transferidos para tubos *Eppendorf*® de 1,5 mL, previamente identificados, e incubados sob agitação à temperatura de 37°C, por uma hora, com finalidade de extrair proteínas associadas à parede bacteriana. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm, durante 10 minutos, descartando-se o sobrenadante. Os *pellets* foram ressuspensos e lavados com 1 mL de água mili Q estéril, para retirar o excesso de sal. Após esta lavagem, os *pellets* foram ressuspensos em 1mL de tampão para protoplastos (50mM Tris HCl pH 8,0; 10mM EDTA; 10mg de lisozima mL⁻¹) sendo este composto por 200mL de enzima e 800mL de tampão com RNAse, e incubados por uma hora, sob agitação a 37°C. Após os período de incubação foram centrifugados a 14.000 rpm, durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e os *pellets* congelados no freezer a -20°C.

2º PASSO: EXTRAÇÃO DO DNA

Após o completo descongelamento de cada amostra em temperatura ambiente, foi adicionado cerca de 300µL de tampão de lise em cada tubo *eppendorf* contendo uma amostra e ressuspensionado com auxílio de pipeta. Os tubos foram incubados em Shaker (Cientec, CT 412) a temperatura de 37°C e numa velocidade de 100 rpm por 10 minutos.

Decorrido o tempo de incubação, cada amostra foi transferida para uma microcoluna, previamente identificada pelo código correspondente da amostra. Cada microcoluna foi encaixada sobre um tubo de coleta e posteriormente foram centrifugadas em microcentrífuga (Eppendorf, AG 22331) por 60 minutos para que todo o líquido descesse para os tubos. Em seguida, foram adicionadas 650µL da solução de lavagem e centrifugados por 10 minutos a 14.000 rpm e, em seguida, descartado todo o líquido descendente. Esta lavagem foi repetida por mais quatro vezes.

Após o procedimento de lavagem, as microcolunas foram transferidas para um tubo *eppendorf* novo de 1,5 mL, previamente identificado com o código da amostra correspondente, e acrescentado de 60µL de água livre de nuclease na temperatura de 65°C para que houvesse eluição do DNA. Após dois minutos, a microcoluna foi centrifugada por 5 minutos na velocidade de 14.000 rpm para que todo o líquido descesse. Este líquido, continha DNA e RNA cuja purificação foi realizada adicionando-se 1µL de RNase dentro de cada tubo. Após esta etapa, a visualização da extração do DNA foi realizada por eletroforese em gel de agarose.

ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Com o objetivo de visualizar a quantidade de DNA total extraído na etapa anterior, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose, 5mL de cada amostra de DNA total extraído foi misturado a 3mL de tampão (glicerol adicionado de azul de bromofenol) e então encaminhados à eletroforese em

gel de agarose (1%) adicionado de 3µL de brometo de etídio, onde foi utilizado 100V, durante 60 minutos. No mesmo gel foi adicionado também o marcador de peso molecular de 1Kb. Ao término da corrida, o gel foi fotografado através de equipamento de fotodocumentação com luz ultravioleta.

REAÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO EM CADEIA (PCR)

Posteriormente, as amostras de DNA total foram submetidas à reação de PCR, visando amplificar a região intergênica que codifica as sub-unidades ribossomais, 16S – 23S. Esta região do DNA é bastante variável entre as espécies de microrganismos, porém, bastante conservada em microrganismos da mesma espécie, sendo então utilizada em pesquisas de identificação microbiana, ao nível molecular. O Quadro 1 mostra as soluções utilizadas na reação de PCR com suas respectivas quantidades.

Quadro 1: Soluções utilizadas na reação de PCR com suas respectivas quantidades

Reação de PCR 16S-23S

DNA total diluído	5,0 µL
10 x tampão da enzima	5,5 µL
2 mM dNTP's	5,5 µL
"Primer" senso (16S)*	5,5 µL
"Primer" reverso (23S)**	5,5 µL
Taq DNA polimerase	2,0 µL
Água livre de nucleases	26,0 µL

*Primer 16-1a. 5' – GATCGCTAGTAATCG – 3'

**Primer 23-1b. 5' – GGGTTCCCCCATTCGGA – 3'

Em seguida, os tubos *Eppendorf*, que continha às amostras, foram colocados dentro da máquina Termocicladora "MJ Research". As condições de cada etapa do ciclo da PCR são

mostradas no Quadro 2.

Quadro 2: Condições da reação de PCR

Quadro 2: Condições da reação de PCR

<i>Desnaturação</i>	95° C	2 minutos e 30 segundos
	94° C	30 segundos
<i>Anelamento</i>	55° C	1 minuto
<i>Extensão</i>	72° C	1 minuto
<i>Extensão final</i>	72° C	10 minutos
	4° C	Tempo indefinido

Total de ciclos: 32

Posteriormente, 5mL de cada produto de PCR foram misturados com 3mL do tampão glicerol com azul de bromofenol, e então submetidos à nova eletroforese em gel de agarose (1,4%) adicionado de 3 μ L de brometo de etídio, onde foi utilizado 100V, durante 45 minutos. Ao final da corrida, o gel foi fotografado para visualização das regiões amplificadas.

Digestão dos produtos de PCR 16S-23S

Após a obtenção dos produtos de PCR, os mesmos foram submetidos ao protocolo descrito no Quadro 3: MIX 1 – com BSA

DNA (Produto de PCR)	3,75 μ L
Tampão 10 x	1,0 μ L
BSA 10 x	1 μ L
Água deionizada	4 μ L
Enzima	0,25 μ L

Quadro 4: MIX 2 – sem BSA

Quadro 4: MIX 2 – sem BSA

DNA (Produto de PCR)	3,75 μ L
Tampão 10 x	1,0 μ L
Água deionizada	5,0 μ L
Enzima	0,25 μ L

Após o preparo dos tubos, os mesmos foram mantidos à 37°C, *overnight*, para que houvesse a reação de digestão enzimática. Em seguida, 5mL de cada produto de digestão foram misturados com 3mL do tampão glicerol com azul de bromofenol, e então submetidos à eletroforese em gel de agarose (1,4%) adicionado de 3 μ L de brometo de etídio, onde foi utilizado 100V, durante 45 minutos. Os resultados foram fotografados e o perfil de digestão de cada produto de PCR foi comparado com o perfil de digestão característico de cada espécie de lactobacilo.

RESULTADOS

ENUMERAÇÃO DE BAL

As contagens totais de bactérias do ácido láctico (BAL) em ágar MRS após cinco e sete dias de incubação estão apresentadas na Tabela 1.

Isolamento de microrganismos do ágar MRS

Foram selecionadas do ágar MRS vinte e duas colônias isoladas. Desse total, nove e treze provêm do meio incubado

ram digeridos com enzimas de restrição para a identificação das espécies de *Lactobacillus*. As enzimas utilizadas foram: Sph I, Nco I, Nhe I, Ssp I, Sfu I, Eco RV, Dra I, Vsp I, Eco RI, Hinc II ou Hpa I e Hind III. Como algumas destas enzimas necessitam de BSA (albumina sérica bovina) para sua melhor atividade, foram preparadas duas misturas diferentes, mostradas no Quadro 3 e Quadro 4.

Quadro 3: MIX 1 – com BSA

por cinco e sete dias, respectivamente. Dentro de cada amostra, foram selecionadas apenas as colônias morfologicamente distintas, conforme é mostrado na Tabela 2.

IDENTIFICAÇÃO PRESUNTIVA DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS

Vinte e um isolados foram submetidos à coloração de Gram e prova da catalase. De acordo com BERNANDEAU *et al* (2008), as características fenotípico-fisiológicas sugestivas para o gênero *Lactobacillus* são bastonete ou cocobacilo Gram positivo e catalase negativo. Cada isolado recebeu um código composto por um número e uma letra. As Tabelas 3, 4 e 5 mostram o resultado da coloração de Gram e prova da catalase dos isolados das três amostras com cinco e sete dias de incubação, bem como o número de UFC de cada isolado por grama do grão.

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS DO ÁGAR MRS

O perfil eletroforético do produto de PCR dos espaçadores 16S-23 pode ser visualizado na Figura 1. Abaixo de cada perfil, encontra-se o código de identificação de cada isolado.

Os isolados foram tratados com doze enzimas de restrição (ver metodologia) e o perfil eletroforético obtido foi comparado com um perfil de restrição teórico, a fim de identificá-los ao nível de espécie. Aqueles que apresentam três bandas (geralmente entre 500 e 700 pb) pertencem ao gênero *Lactobacillus*. As Figuras 2, 3, 4, 5 e 6 mostram os perfis de restrição obtidos pela digestão do produto de PCR dos isolados. A Tabela 6 apresenta a identificação, em nível de espécie, de cada isolado a partir dos perfis de restrição dos espaçadores.

A Tabela 6 apresenta a identificação, em nível de espécie, de cada isolado do ágar MRS realizada através da comparação entre o perfil de restrição obtido e o perfil de restrição teórico para cada espécie do gênero *Lactobacillus*.

DISCUSSÃO ENUMERAÇÃO DE BAL

Comparando-se a contagem de BAL com cinco e sete dias de incubação, pode-se perceber que há um discreto aumento no número de microrganismos quando as placas são incubadas por mais tempo. Isso é uma evidência de que nos grãos de Kefir existem bactérias lácticas com diferentes tempos de crescimento. Tanto os grãos cultivados em água açucarada quanto os grãos cultivados em leite apresentaram contagens dentro dos limites esperados para o Kefir. Foi encontrado 10^8 UFC/g de grão, número semelhante ao encontrado por GARROTE *et al* (2001).

Identificação presuntiva e molecular dos microrganismos isolados do ágar MRS

Há um consenso na comunidade científica de que os métodos fenotípico-fisiológicos não são suficientes para permitir uma classificação acurada ao nível de espécie das bactérias do ácido láctico (KLEIN *et al.*, 1998; TANNOCK, 1999; SAARELA, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2002). No entanto, o teste de Gram e a prova da catalase são de inestimável valor para um *screening* inicial, uma vez que o meio MRS não apresenta seletividade absoluta para *Lactobacillus*. Todos os microrganismos isolados apresentaram reação positiva ao Gram, forma de bastonete ou cocobacilo e reação negativa frente à prova da catalase.

O número de bandas encontrado após eletroforese do produto de PCR permite classificar o isolado em um dos três gêneros de BAL: *Lactobacillus* (3 bandas); *Enterococcus* (2 bandas); *Streptococcus* (1 banda) devido às duplicações e inserções presentes no espaçador interno transcrito (ITS 1) da região 16S-23S do RNA ribossomal (NOUR, 1998; MAGALHÃES, *et al*, 2005). Todos os microrganismos isolados apresentaram três bandas, sendo então pertencentes ao gênero *Lactobacillus* o que corrobora os resultados encontrados na identificação presuntiva.

Uma revisão realizada por LOPITZ-OTSOA *et al* (2006),

mostrou que 60 autores identificaram *L. casei* subsp. *pseudoplantarum* (anteriormente denominado *L. paracasei* subsp. *paracasei*) de grãos de Kefir, sendo esta espécie a terceira mais citada dentro do gênero *Lactobacillus*. ZHOU *et al* (2009) mostraram que dentro do grupo dos homofermentativos, *L. casei* foi encontrado em maior proporção nos grãos de leite. SIMOVA *et al* (2002) identificaram *L. casei* sub. *pseudoplantarum* em três, das seis amostras de grãos estudados. Diante da predominância desta espécie em trabalhos prévios e devido ao fato de poucos isolados terem sido selecionados para identificação molecular (em função da baixa diversidade morfológica das colônias) houve uma alta probabilidade dos isolados selecionados serem da espécie *L. casei*.

Os perfis de digestão dos isolados 1G, 4G, 5G e 6G podem ser fruto de uma combinação dos perfis de *L. casei* e *L. acidophilus* ou *L. casei* e *L.hilgardii* mostrando que não houve um isolamento total do microrganismo. Isso pode ter ocorrido devido a uma superposição das colônias de tais espécies no meio de cultura o que torna este achado mais uma evidência de uma tendência à co-agregação dos microrganismos dos grãos de Kefir que pode ser explicada pela produção de exopolissacarídeos por algumas espécies presentes no grão, principalmente *L. kefiranofaciens* (MITSUE *et al.*, 1999; YOKOI *et al.*, 1990; TOBA *et al.*, 1987). Assim, os microrganismos estariam tão intimamente interligados nos grãos que ao serem cultivados no meio de cultura, produziram colônias indistinguíveis morfológicamente. OTTOGALLI *et al.* 1973; ANGULO *et al.* 1993; MARSHALL, 1993 isolaram *L. acidophilus* de grãos de Kefir e *L.hilgardii* foi citado por SCHWAN *et al* (2010) como membro da microbiota do Kefir de água açucarada.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que a técnica de identificação molecular foi eficiente para a identificação, em nível de espécie, de dezesseis, dos vinte lactobacilos isolados dos grãos de kefir. A técnica, ainda, permitiu a visualização de perfis de restrição superpostos, o que sugere a presença de duas espécies co-agregadas durante o processo de isolamento. A partir dessa observação, será executado um reisolamento dos lactobacilos envolvidos e a confirmação da identidade dos mesmos.

Deve-se ressaltar que este trabalho é apenas uma pequena parte de um projeto de pesquisa bem maior cujo objetivo geral é conhecer a microbiota dos grãos Kefir cultivados em diferentes substratos. Para tanto, a análise de um número maior de amostras se faz necessária.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANGULO, L., LOPEZ, E. & LEMA, C. Microflora present in kefir grains of the Galician Region (North-West of Spain). *Journal of Dairy Research* 60 263±267, 1993
- BERNARDEAU, M. *et al.* Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus; *Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 126, p. 278-285, 2008.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. RESOLUÇÃO Nº 5, DE 13 DE NOVEMBRO DE 2000. Dispõe sobre a inspeção de alimentos de origem animal. Disponível em <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>. Acesso em: 12/03/2011
- CHENOLL, E.; MACIÁN, M.C.; AZNAR, R. Identification of *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* and *Pediococcus* by rDNA-based techniques. *Syst. Appl. Microbiol.*, v.26, n.4, p.546-56, 2003.
- FAO/WHO, Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food, including powder milk with live lactic acid bacteria, Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report, 1-34, 2001.
- FARNWORTH, E.R. Kefir: from folklore to regulatory approval. *J. Nutraceut. Funct. Med. Foods* 1, 57–68, 1999.
- FARNWORTH, E.R. Kefir-a complex probiotic. *Food Sci. Technol. Bull.* : *Funct. Foods* 2: 1–17, 2006. <http://www.foodsciencecentral.com/fsc/bulletin-ff-free> .
- FELIS, G. E. and DELLAGLIO, F. (2007). Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* Volume 8, pages 44-61.
- FURUKAWA N., MATSUOKA A., TAKAHASHI T., YAMANAKA Y. Effects of orally administered yogurt and kefir on tumor growth in mice. *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.* 43:450–453, 1990.
- FURUKAWA, N., A. MATSUOKA, T. TAKAHASHI, AND Y. YAMANAKA. Effects of fermented milk on the delayed-type hypersensitivity response and survival in mice bearing Meth-A. *Anim. Sci. Technol.* 62:579–585, 1991.
- GARROTE G., ABRAHAM A., DE ANTONI G.L 2001 Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. *Journal of Dairy Research*, 6: 639–652, 2001.
- HOLZAPFEL, W.H., WOOD, B.J.B. Lactic acid bacteria in contemporary perspective. In: *The genera of Lactic acid bacteria*. 1-7. Wood B.J.B., Holzapfel W.H. (eds.) Chapman & Hall. London 1995.
- KALRA, A.; PALCU, C.T.; SOBEL, J.D.; AKINS, R.A. Bacterial vaginosis: culture- and PCR-based characterizations of a complex polymicrobial disease's pathobiology. *Curr. Infect. Dis. Rep.* v.9, n.6, p.485-500, 2007.
- KANDLER, O. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria *Antonie Van Leeuwenhoek*, 49 (3), 209-224 1983.
- KLEIN, G. *et al.* Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v.41, p.103-125, 1998.
- LOPITZ-OTSOA, F.; REMENTERIA, A.; ELGUEZABAL, N.; Kefir: a symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities, *Iberoam Micol.*: 23 Spain 2006.
- MAGALHÃES, J.T. *et al.* Partial characterization of ribosomal operons of *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2B20. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, v.36, p.177-183, 2005.
- MARSHALL, V.M. Starter cultures for milk fermentation and their characteristics. *Journal of the Society of Dairy Technology*, 46: 49–56, 1993.
- MICHELI, L.; UCCELLETTI, D.; PALLESCHI, C.; CRESCENZI, V. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53: 69, 1999.
- MIGUEL, M.G.C.P.; Identificação de microrganismos isolados de grãos de kefir de leite e de água de diferentes localidades (*Dissertação de Mestrado*). UFLA Lavras, MG Brasil, 2009.
- MITSUE, T. TACHIBANA, K. FUJIO, J. Efficient kefir production by a mixed culture of *Lactobacillus kefirifasciens* KF-75 and yeast strains. *Sabutsu-Kojaku Kaishi*. 76, 93-103, 1999
- MOREIRA J. L. S., MOTA R. M., HORTA M. F., TEIXEIRA S. M., NEUMANN E., NICOLI J. R., NUNES A. C. Identification to the species level of *Lactobacillus* isolated in probiotic prospecting studies of human, animal or food origin by 16S-23S rRNA restriction profiling. *BMC Microbiology* 5(1): 15, 2005.
- NAGIRA T., NARISAWA J., TERUYA K., KATAKURA Y., SHIM S., KUSUMOTO K., TOKUMARU S., TOKUMARU K., BARNES D.W. SHIRAHATA S. Suppression of UVC-induced cell damage and enhancement of DNA repair by the fermented milk, Kefir. *Cytotechnology*, 40: 125–137, 2002.
- NOUR, M. 16S-23S and 23S-5S intergenic spacer regions of lactobacilli: nucleotide sequence, secondary structure and comparative analysis. *Research in Microbiology*. Amsterdam, v.149, p.433-448, 1998.
- OLIVEIRA, M.N. *et al.* Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, São Paulo, v.38, n.1, p.1-21, 2002.
- OTTOGALLI, G., GALLI, A., RESMINI, P. & VOLONTERIO, G. Composizione Microbiologica, chimica edultra struttura dei granuli di Kefir. *Annali di Microbiologia ed Enzimologia* 23 109±121, 1973.
- SALOFF-COSTE C.J. Kefir, Nutritional and health benefits of yogurt and fermented milks. *Danone World Newsletter* , 111–17, 1996.
- SAARELA, M. *et al.* Probiotic bacteria: safety, functional and technologi-

cal properties. *Journal of Biotechnology*, Amsterdam, v.84, p.197-215, 2000.

SCHWAN, R.F MAGALHÃES, J.K. PEREIRA, G.V de M. DIAS, R.D. Microbial communities and chemical changes during fermentation of sugary Brazilian kefir. *World J Microbiol Biotechnol.* 26, 1241-1250. 2010.

SCHNEEDORF, J. M.; ANFITEATRO, D.; Quefir, um probiótico produzido por microorganismos encapsulados e inflamação, Tecmedd: São Paulo, 2004.

SCHNEEDORF, J. M.; PEREIRA, I.O.; ; FERRAZ, V.; Atividade antiinflamatória de carboidrato produzido por fermentação aquosa de grãos de quefir, *Química Nova*: v.31 n.7 São Paulo, 2008.

STAMER, J.R. *Food Technology*, chapter The lactic acid bacteria: microbes of diversity, pp. 60-65 1979.

ST-ONGE, M.P., FARNWORTH, E.R., SAVARD, T., CHABOT, D., MAFU, A., JONES, P.J. Kefir consumption does not alter plasma lipid levels or cholesterol fractional synthesis rates relative to milk in hyperlipidemic men: a randomized controlled trial. *BMC Complement. Altern. Med.* 2: 1-7, 2002.

TANIGUCHI, M.; TANAKA, T. Clarification of interaction among microorganisms and development of co-culture system for production of useful substances. *Adv Biochem Eng Biotechnol*: 90 35-62 2004.

TANNOCK, G.W. *et al.* Identification of Lactobacillus isolates from the gastrointestinal tract, silage, and yoghurt by 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region sequence comparisons. *Applied and Environmental Microbiology*. Washington, v.65, n.9, p.4264-4267, 1999.

THOREUX, K., SCHMUCKER, D.L. Kefir milk enhances intestinal immunity in young but not old rats. *Journal of Nutrition*, 131, 807-812, 2001.

TOBA, T ARIHARA, K. ADACHI, S. Comparative study of polysaccharides from kefir grains, an encapsulated homofermentative *Lactobacillus* species and *Lactobacillus kefir*. *Mitchwissenschaft*. 42, 565-568

YOKOI, H. WATONABE, T. FUJII, Y. TOBA, T. ADACHI, S. Isolation and characterization of polysaccharide-producing bacteria from kefir grains. *J dairy Sci.* 73, 1684-1689, 1990.

ZACCONI, C., PARISI, M.G., SARRA, P.G., DALLAVALLE, P. Competitive exclusion of Salmonella kedougou in kefir fed chicks. *Microbiol Aliments Nutrition*, 12, 387-390, 1995.

ZHOU, J. LIU, X. JIANG, H. DONG, M. Analysis of the microflora in Tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis. *Food Microbiology*, 26. 770-775, 2009.

NOTAS DE RODAPÉ

Farmacêutico graduado pelo Centro Universitário Newton Paiva.

² Professora do Centro Universitário Newton Paiva, doutora em Ciências Farmacêuticas/UFMG.

³ Professores do Instituto de Ciências Biológicas/UFMG, doutores em Imunologia e Bioquímica/UFMG

⁴ Professor do Instituto de Ciências Biológicas/UFMG, doutor em Microbiologia/UFMG.