

Camila Nair Batista Couto Villanoeva

Avaliação da qualidade microbiológica e físico-química de kefir e da atividade biológica da bebida, de *Lactobacillus* spp. isolados de diferentes grãos e exopolissacarídeos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Microbiologia

Orientadora: Prof. Dra Elisabeth Neumann

Co-orientador: Prof. Dr. Jacques Robert Nicoli

**Belo Horizonte
2016**

*Dedico este trabalho ao Rafael e ao Pedro por
todo amor, aos meus pais pelo carinho e presença
constante e a Deus por tornar tudo possível*

AGRADECIMENTOS

A conclusão deste estudo seria impossível sem a orientação da Profa Elisabeth Neumann e co-orientação do Prof. Jacques Nicoli. Muito obrigada pelos ensinamentos e confiança.

As colaborações da Ronália Leite (FaFar, UFMG); das Profa Analia Graciela Abraham e Graciela Garrote (Laboratório de Microbiologia do Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de los Alimentos, La Plata, Argentina), durante o doutorado Sanduiche; da Dra Ivana Lula (Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear de Alta Resolução (DQI/UFMG); do Prof. Álvaro Cantini Nunes (Laboratório de Genética Molecular de Protozoários Parasitas, ICB, UFMG); do Prof. Evanguedes Kalapothakis (Laboratório de Biotecnologia e marcadores moleculares, ICB, UFMG); do Prof. José Miguel Ortega (Bioinformática, ICB, UFMG); e do Dr. Gabriel Fernandes (Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ).

Aos amigos que foram essenciais na execução dos experimentos e os tornaram mais prazerosos: Aduilo, Adriano, Ana, Barbara, Caro (Argentina), Carol, Catarina, Gustavo, Léo, Luciana, Mayra, Mário, Rafael, Raphael, Sávio, Silvia, Suelen, Tetsu e Yasmin.

Aos membros da banca examinadora por terem se disponibilizado a contribuir com seus conhecimentos para melhoria desse trabalho.

Aos meus pais, Célio e Cecília, pelos corretos ensinamentos, apoio e amor constantes.

Ao Rafa, meu nego, por nunca ter deixado eu desistir e sempre me incentivar a continuar este desafio, apesar de todas as dificuldades. E ao Pedro, meu grande amor.

Às agências fomentadoras, por tornarem esse trabalho viável: Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES) e Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (PRPq-UFMG).

E a Deus, por tornar tudo possível.

A todos, um imenso e sincero agradecimento.

RESUMO

Os grãos de kefir são caracterizados por uma matriz exopolissacarídica na qual se insere uma complexa comunidade de bactérias e leveduras. A atividade destes micro-organismos caracteriza os grãos de kefir e as bebidas por eles fermentadas, apresentando assim diversas aplicações para a indústria de alimentos. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade microbiológica e físico-química de kefir; a atividade biológica da bebida, de *Lactobacillus* spp. isolados de diferentes grãos e de exopolissacarídeos. Nos grãos de kefir de leite e de água açucarada, as bactérias e leveduras se apresentaram distribuídas na superfície e no interior dos mesmos. As amostras de kefir de leite possuem contagem de BAL superior a 10^7 UFC/mL durante os 28 dias de armazenamento e apresentaram composição química conforme preconizado pela legislação. De modo geral, as amostras de kefir de água possuem contagem de BAL superior a 10^7 UFC/mL, diminuindo durante o armazenamento com 28 dias. As bebidas apresentam atividade antagonista, *in vitro*, contra *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *Listeria monocytogenes* (ATCC15313), *Shigella flexneri* (ATCC 12022), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) e *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium (ATCC14028), em ágar MRS. A produção de EPS foi verificada em diferentes condições de crescimento por *Lactobacillus* spp. e extraídos diretamente de grãos de kefir de leite ou água açucarada. Estes possuem composição química e organização estrutural primária diversa. *Lactobacillus* spp. isolados de grãos de kefir são capazes de antagonizar a invasão, mas não a adesão de *S. Enteritidis* *in vitro*, evidenciando potenciais propriedades probióticas. EPS produzidos por lactobacilos isolados de grãos de kefir e extraídos de grãos de kefir de água açucarada e de leite são capazes de exercer um efeito antagônico *in vitro* contra a adesão de *Salmonella* em células Caco-2/TC-7. A análise de metatranscriptômica mostrou que as espécies bacterianas mais ativas no kefir de leite de Curitiba (KLCU) foram *L. mesenteroides* (61,93%), *L. kefiranofaciens* (3,86%), *Yarrowia lipolytica* (9,43%) e *Saccharomyces cerevisiae* (9,43%); de Salvador (KLSA) *L. mesenteroides* (41,65%), *L. kefiranofaciens* (20,78%), *Yarrowia lipolytica* (10,21%) e *Saccharomyces cerevisiae* (1,70%); no kefir de água de Curitiba (KACU) *Oenococcus kitaharae* (12,76%), *Gluconobacter oxydans* (7,77%) e *Saccharomyces cerevisiae* (66,45%); de Salvador (KASA), *Oenococcus kitaharae* (14,69%), *Gluconobacter oxydans* (4,42%) e *Saccharomyces cerevisiae* (72,9%). Genes transcritos da enzima glicosiltransferase, envolvida na síntese de homopolissacarídeo de glicose, foram encontrados nas amostras KACU

e KASA. Enquanto os genes transcritos das enzimas β -galactosidase, fosfoglucomutase, UDP-glicose pirofosforilase, galactose-4-epimerase e UDP-galactose-4-epimerase, envolvidas na síntese de hetepolissacarideo de glicose e galactose, foram encontrados nas amostras KLCU e KLSA.

Palavras chave: Kefir, lactobacilos, exopolissacarídeos, caracterização

ABSTRACT

Kefir grains are characterized by an exopolysaccharide matrix in which is inserted a complex community of bacteria and yeast. The activity of these microorganisms characterizes kefir grains and drinks they ferment, presenting, in that manner, several applications for the food industry. Thus, the objective of this study was to evaluate the microbiological quality and physicochemical properties of kefir; the biological activity of the beverage and of *Lactobacillus* spp. isolated from different grains and exopolysaccharides. In milk and water kefir, bacteria and yeasts are distributed on the surface and inside its grain. Milk kefir samples have LAB count greater than 10^7 CFU/mL during 28 days of storage and showed chemical composition in accordance with national and international legislations. In general, water kefir samples have LAB counts above 10^7 CFU/mL. However, this may decrease during 28 days' storage. Beverages show antagonistic activity *in vitro* against *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *Listeria monocytogenes* (ATCC15313), *Shigella flexneri* (ATCC 12022), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) and *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium (ATCC14028) in MRS agar. The production of EPS was observed in different growth conditions of *Lactobacillus* spp. and was directly extracted from milk or water kefir grains. These EPS have a diverse chemical composition and primary structural organization. *Lactobacillus* spp. isolated from kefir grains are capable of antagonizing the invasion but not the adhesion of *S. Enteritidis* *in vitro*, indicating potential probiotic properties. EPS produced by lactobacilli isolated from kefir grains and extracted from water and milk kefir grains are able to exert an antagonistic effect *in vitro* against *Salmonella* adhesion to Caco2 cells/TC-7. The metatranscriptômica analysis showed that the most active bacterial species in Curitiba milk kefir (KLCU) were *L. mesenteroides* (61,93%), *L. kefiranofaciens* (3,86%), *Yarrowia lipolytica* (9,43%) and *Saccharomyces cerevisiae* (3,41%); Salvador (KLSA) *L. mesenteroides* (4,65%), *L. kefiranofaciens* (20,78%), *Yarrowia lipolytica* (10,21%) and *Saccharomyces cerevisiae* (1,70%); the water kefir Curitiba (KACU) *Oenococcus kitaharae* (12,76%), *Gluconobacter oxydans* (7,77%) and *Saccharomyces cerevisiae* (66,45%); Salvador (KASA), *Oenococcus kitaharae* (14,69%), *Gluconobacter oxydans* (4,42%) and *Saccharomyces cerevisiae* (72,9%). Transcribed genes of glycosyltransferase enzyme involved in the synthesis of glucose homopolysaccharide were found in KACU and KASA samples. While transcribed genes of β -

galactosidase enzymes, phosphoglucomutase, UDP-glucose pyrophosphorylase, galactose-4-epimerase and UDP-galactose-4-epimerase involved in the synthesis hetepolissacarideo glucose and galactose, were found in KLCU and KLSA samples.

Keywords: Kefir, lactobacilli, exopolysaccharides, characterization

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Biossíntese do dextrano. | 32 |
| Figura 2 - Representação esquemática de vias envolvidas no catabolismo de lactose (superior esquerdo e direito) e biossíntese de exopolissacarídeos (inferior direito) por <i>Lactococcus lactis</i> fermentadora de lactose (lactose transportada pelo sistema fosfoenoltransferase lactose específico) e em <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> e <i>Streptococcus thermophilus</i> , ambas não fermentadoras de galactose (lactose transportada através do sistema de transporte secundário antiporte lactose/galactose). | 33 |
| Figura 3 - Modelo para a biossíntese de heteropolissacarídeos em <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> | 35 |
| Figura 4 – Fluxograma do processamento de bebidas fermentadas. | 42 |
| Figura 5 - Extração de exopolissacarídeos de grãos de kefir de leite de Salvador. | 48 |
| Figura 6 - Grãos de kefir de leite, à esquerda, e de água açucarada, à direita, originados da cidade de Salvador. | 55 |
| Figura 7 - Microscopia eletrônica de varredura da porção externa e interna de grãos de kefir de leite do Brasil. | 58 |
| Figura 8 - Microscopia eletrônica de varredura de grãos de kefir de leite do Brasil. | 59 |
| Figura 9 - Microscopia eletrônica de varredura de grãos de kefir de água açucarada do Brasil. | 60 |
| Figura 10 - Microscopia eletrônica de transmissão de grãos de kefir de leite do Brasil. | 61 |
| Figura 11 - Microscopia eletrônica de transmissão de grãos de kefir de leite do Brasil, KLCU e KLSA, respectivamente. | 62 |
| Figura 12 – Micro-organismos metabolicamente ativos em grãos de kefir de leite do Brasil, por microscopia eletrônica de transmissão. | 63 |
| Figura 13 - Microscopia eletrônica de transmissão de grãos de kefir de leite do Brasil. Presença da camada S (cinza claro) em lactobacilos. | 65 |
| Figura 14 - Produção de exopolissacarídeos em diferentes fontes de carboidratos (sMRS – sacarose 8% p/v; MRS – glicose 2% p/v; lMRS – lactose 5% p/v). | 79 |

| | |
|--|-----|
| Figura 15 – Perfil de corrida na cromatografia de camada delgada de padrões de glicose e galactose e de amostras de exopolissacarídeos produzidos por <i>Lactobacillus</i> spp. isolados de grãos de kefir. | 82 |
| Figura 16 – Perfil de corrida na cromatografia de camada delgada de padrões de glicose e galactose de exopolissacarídeos produzidos por <i>Lactobacillus</i> spp. isolados de grãos de kefir. | 83 |
| Figura 17 - Espectros de 1HRMN do EPS extraído de grão de kefir de água de Salvador. | 87 |
| Figura 18 – Densidade (\log_{10} UFC/mL) de <i>Salmonella enterica</i> sorovar Enteritidis aderida em células Caco-TC7 previamente incubadas (1h, 37°C) na presença ou não de <i>Lactobacillus</i> spp. isolados de kefir. | 92 |
| Figura 19 – Densidade (\log_{10} UFC/mL) de <i>Salmonella enterica</i> sorovar Enteritidis aderidas em células Caco-TC7 previamente incubadas ou não (CTL) com EPS produzidos por <i>Lactobacillus</i> spp. (10P, 18P, 11P3, 1Z, 10P2, 19U e 17P2) isolados de grãos de kefir ou extraídos de grãos de água (KACU e KASA) e de leite (KLCU e KLSA). * ($P < 0,05$) ** ($P < 0,01$) *** ($P < 0,001$). | 92 |
| Figura 20 – Densidade (\log_{10} UFC/mL) de <i>Salmonella enterica</i> sorovar Enteritidis invadindo células Caco-TC7 previamente incubadas (1h, 37°C) ou não (CTL) com <i>Lactobacillus</i> 10P, 10P2, 18P: <i>L. satsumensis</i> ; 11P3 e 17P2: <i>L. perolens</i> ; 19U: <i>L. mali</i> . *** ($P < 0,001$) | 93 |
| Figura 21 – Densidade (\log_{10} UFC/mL) de <i>Salmonella enterica</i> sorovar Enteritidis invadindo células Caco-TC7 previamente incubadas (1h, 37°C) ou não (CTL) com EPS produzido por <i>Lactobacillus</i> spp. (<i>L. satsumensis</i> (10P, 10P2 e 18P); <i>L. perolens</i> (11P3 e 17P2); <i>L. mali</i> (19U)); <i>L. diolivorans</i> (1Z) ou extraídos de grãos de kefir de água (KACU e KASA) e de leite (KLSA). | 93 |
| Figura 22 - Abundância relativa (%) de espécies bacterianas ativas no kefir de leite de Curitiba (KLCU). | 96 |
| Figura 23 - Abundância relativa (%) de espécies de leveduras ativas no kefir de leite de Curitiba (KLCU). | 100 |
| Figura 24 - Abundância relativa (%) de espécies bacterianas ativas no kefir de leite de Salvador (KLSA). | 101 |

| | |
|--|-----|
| Figura 25 - Abundância relativa (%) de espécies de leveduras ativas no kefir de leite de Salvador (KLSA)..... | 103 |
| Figura 26 - Abundância relativa (%) de espécie bacterianas ativas no kefir de água de Curitiba (KACU)..... | 105 |
| Figura 27 - Abundância relativa (%) de espécies de leveduras ativas na bebida fermentada de água com açúcar de Curitiba (KACU). | 107 |
| Figura 28 - Abundância relativa (%) de espécies bacterianas ativas no kefir de água de Salvador (KASA)..... | 108 |
| Figura 29 - Abundância relativa (%) de espécies de leveduras no kefir de água de Salvador (KASA)..... | 110 |
| Figura 30 - Regressão linear correspondente ao logaritmo dos pesos moleculares dos padrões de dextranos em função do tempo de retenção analisados por cromatografia líquida de alta eficiência..... | 128 |
| Figura 31 - Exemplo de uma das curvas padrões utilizadas na determinação de resíduos de proteína. | 129 |
| Figura 32 - Exemplo de uma das curvas padrões utilizadas na determinação da concentração de carboidratos. | 129 |
| Figura 33 – Cromatogramas correspondentes à pesquisa de polissacarídeos obtidos a partir de bebidas fermentadas por grãos de kefir de Curitiba e Salvador, cultivados em água com açúcar mascavo e leite..... | 132 |
| Figura 34 – Cromatogramas correspondentes à determinação das massas moleculares de exopolissacarídeos produzidos por <i>Lactobacillus</i> e extraídos de grãos de kefir..... | 135 |
| Figura 35 - Espectros de ¹ HRMN do EPS produzido por <i>L. diolivorans</i> . Os valores expressos são referentes aos deslocamentos químicos expresso em delta (δ) e a intensidade expressa pela área (abaixo do sinal)..... | 135 |
| Figura 36 - Espectros de ¹ HRMN do EPS produzido por <i>L. satsumensis</i> 10P. Os valores expressos são referentes aos deslocamentos químicos expresso em delta (δ) e a intensidade expressa pela área (abaixo do sinal). | 136 |

| | |
|--|-----|
| Figura 37 - Espectros de ¹ HRMN do EPS produzido por <i>L. perolens</i> 11P3. Os valores expressos são referentes aos deslocamentos químicos expresso em delta (δ) e a intensidade expressa pela área (abaixo do sinal). | 136 |
| Figura 38 - Espectros de ¹ HRMN do EPS produzido por <i>L. mali</i> 19U. Os valores expressos são referentes aos deslocamentos químicos expresso em delta (δ) e a intensidade expressa pela área (abaixo do sinal). | 137 |
| Figura 39 - Espectros de ¹ HRMN do EPS extraído de grão de kefir de água de Curitiba. Os valores expressos são referentes aos deslocamentos químicos expresso em delta (δ) e a intensidade expressa pela área (abaixo do sinal). | 137 |
| Figura 40 - Espectros de ¹ HRMN do EPS extraído de grão de kefir de leite de Salvador. Os valores expressos são referentes aos deslocamentos químicos expresso em delta (δ) e a intensidade expressa pela área (abaixo do sinal). | 138 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Origens dos grãos de kefir cultivados em leite e água açucarada..... | 41 |
| Tabela 2 - Aumento da biomassa (grama) de grãos de kefir de leite de diferentes origens em função de cada cultivo (2 dias cada) (n=3)..... | 55 |
| Tabela 3 – Aumento da biomassa (grama) de grãos de kefir de água açucarada de diferentes origens em função de cada cultivo (2 dias cada) (n=3) | 56 |
| Tabela 4 - Densidade de BAL e leveduras, expressa em log de UFC/mL, em amostras de kefir de leite produzidos com grãos de diferentes origens, ao longo do tempo (dias) (n=4) | 66 |
| Tabela 5 – Parâmetros físico-químicos de amostras de kefir de leite produzidos com grãos de diferentes origens, ao longo do tempo (dias) (n=4)..... | 67 |
| Tabela 6 – Requisitos microbiológicos e físico-químicos de kefir de leite, com 48 horas de fermentação, e padrões vigentes (n=4)..... | 70 |

| | |
|--|-----|
| Tabela 7 – Enumeração de BAL e leveduras, expressa em log de UFC/mL, em amostras de kefir de água açucarada produzidos com grãos de diferentes origens, ao longo do tempo (dias) (n=3) | 71 |
| Tabela 8 – Parâmetros físico-químicos de amostras de kefir de leite produzidos com grãos de diferentes origens, ao longo do tempo (dias) (n=3)..... | 73 |
| Tabela 9 – Caracterização estrutural primária de EPS em grãos de kefir de leite (KL) e de água açucarada (KA), determinadas mediante CLAE por exclusão molecular | 74 |
| Tabela 10 – Pesquisa de EPS em bebidas fermentadas de kefir de leite (KL) e de água açucarada (KA), determinadas mediante CLAE por exclusão molecular | 76 |
| Tabela 11 – Lactobacilos produtores de EPS em ágar MRS contendo sacarose (sMRS) | 79 |
| Tabela 12 – Produção de EPS em caldo sMRS, expressa em grama por litro por lactobacilos isolados de grãos de kefir | 81 |
| Tabela 13 – Pesquisa de resíduos de proteína (mg/mL) em mostras de EPS produzida por <i>Lactobacillus</i> spp., pelo método de Bradford..... | 82 |
| Tabela 14 - Concentração de carboidratos (g/L) nas amostras de EPS produzidas por <i>Lactobacillus</i> spp..... | 84 |
| Tabela 15 - Massas moleculares (Da) determinadas por CLAE de exclusão molecular, de EPS obtidos a partir de micro-organismos isolados de kefir água açucarada e de leite..... | 85 |
| Tabela 16 - Composição primária de EPS produzidos por <i>Lactobacillus</i> spp. e extraídos de grãos de kefir de água açucarada e de leite | 88 |
| Tabela 17 – Genes expressos de enzimas envolvidas na síntese de heteropolissacarídeos nas amostras de kefir de leite de Curitiba (KLCU) e Salvador (KLSA). | 113 |

LISTA DE ABREVIATURAS

AGCC – Ácidos graxos de cadeia curta
ATT – Acidez titulável total
BAA – Bactéria ácido acética
BAL - Bactéria ácido láctica
BAM - *Bravo Archived Media*
BDA – Ágar batata dextrose
BED – *Browser extensible dados*
BHI – *Ágar brain heart infusion*
CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência
C - Carbono
CO₂ – Gás carbônico
°D – Graus Dornic
DMEM – Meio Dulbecco MEM
DMSO – Dimetil sulfóxido deuterado
EPS - Exopolissacarídeo
FAO – Organização para agricultura e alimentação
FOS – Frutooligossacarídeo
GT – Glicosiltransferase
GT1 – Glicosiltransferase família 1
GRAS – Geralmente reconhecido como seguro
HEPS - Heteropolissacarídeo
HOPS – Homopolissacarídeo
IAL – Instituto Adolfo Lutz
KABH – Kefir de água de Belo Horizonte
KACU – Kefir de água de Curitiba
KASA – Kefir de água de Salvador
KAVI – Kefir de água de Viçosa
KEEG – *Kyoto encyclopedia of genes and genomes*
KLCU – Kefir de leite de Curitiba
KLDI - Kefir de leite de Divinópolis

KLSA – Kefir de leite de Salvador

KLVI- Kefir de leite de Viçosa

LAREMAR – Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear de Alta Resolução

MM –Massa molecular

MRS – Ágar Man Rogosa Sharpe

IMRS – Ágar Man Rogosa Sharpe modificado com lactose

sMRS – Ágar Man Rogosa Sharpe modificado com sacarose

N - Nitrogênio

NaOH – Hidróxido de sódio

NCBI - *National Center for Biotechnology Information*

NGS – Sequenciamento de nova geração

NIR –Espectroscopia de infra vermelho

OMS – Organização Mundial de Saúde

OTO – Ósmio tanino ósmio

PCR - Reação em cadeia da polimerase

PBS – Tampão fosfato salino

PoliA – Cauda poliadenilato

PEP/PTS – Fosfoenolpiruvato

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro

rRNA - Ácido ribonucleico ribossômico

tRNA - Ácido ribonucleico transportador

TMS – Tetrametil silano

UDP – Uridina difosfato

UGT – Uridina difosfato glicosiltransferase

UE – Unidades experimentais

UFC – Unidades Formadoras de Colônia

ÍNDICE

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 1. | INTRODUÇÃO | 18 |
| 2. | REVISÃO DE LITERATURA..... | 19 |
| 2.1 | KEFIR..... | 19 |
| 2.2 | GRÃOS DE KEFIR..... | 21 |
| 2.3 | ALEGAÇÕES PROBIÓTICAS DO KEFIR..... | 24 |
| 2.4 | EXOPOLISSACARÍDEOS DE BACTÉRIAS LÁTICAS | 26 |
| 2.4.1 | DEXTRANO | 29 |
| 2.4.2 | KEFIRANO | 30 |
| 2.5 | BIOSSÍNTESE DE EXOPOLISSACARÍDEOS | 31 |
| 2.6 | IDENTIFICAÇÃO DAS VIAS METABÓLICAS ATIVAS EM UMA COMUNIDADE MICROBIANA POR ANÁLISE TRANSCRIPTÔMICA..... | 36 |
| 3. | OBJETIVO GERAL | 40 |
| 3.1 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 40 |
| 4. | MATERIAL E MÉTODOS | 41 |
| 4.1 | ORIGEM E MANUTENÇÃO DOS GRÃOS DE KEFIR | 41 |
| 4.2 | TÉCNICAS DE PROCESSAMENTO DAS BEBIDAS FERMENTADAS | 42 |
| 4.3 | AVALIAÇÃO DO AUMENTO DA BIOMASSA DOS GRÃOS DE KEFIR DE LEITE E ÁGUA AÇUCARADA DE DIFERENTES ORIGENS EM FUNÇÃO DO TEMPO | 42 |
| 4.4 | ORGANIZAÇÃO MICROSCÓPICA DOS GRÃOS DE KEFIR | 43 |
| 4.5 | PRODUÇÃO DE KEFIR DE LEITE E ÁGUA AÇUCARADA..... | 44 |
| 4.6 | CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA DAS BEBIDAS FERMENTADAS..... | 45 |
| 4.7 | PESQUISA DA PRESENÇA DE EXOPOLISSACARÍDEOS NAS BEBIDAS FERMENTADAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE EXCLUSÃO MOLECULAR E DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR | 46 |
| 4.8 | PESQUISAR E SELECIONAR ESTIRPES PRODUTORAS DE EPS ENTRE <i>LACTOBACILLUS</i> SPP. ISOLADOS DE GRÃOS DE KEFIR | 47 |
| 4.9.1 | EXTRAÇÃO DE EPS DE GRÃOS DE KEFIR DE LEITE..... | 47 |
| 4.9.2 | EXTRAÇÃO DE EPS DE CULTURAS DE <i>LACTOBACILLUS</i> SPP. ISOLADOS DE GRÃOS DE KEFIR..... | 48 |

| | |
|---|-----------|
| 4.10 DETERMINAÇÃO DA PUREZA DOS EPS PRODUZIDOS POR <i>LACTOBACILLUS</i> SPP. | 49 |
| 4.10.1 PESQUISA DE RESÍDUOS DE PROTEÍNA | 49 |
| 4.10.2 PESQUISA DE MONOSSACARÍDEOS | 49 |
| 4.11 QUANTIFICAÇÃO DE CARBOIDRATOS TOTAIS..... | 50 |
| 4.12 CARACTERIZAÇÃO DA ESTRUTURA PRIMÁRIA DE EPS POR ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR..... | 50 |
| 4.13 AVALIAÇÃO, <i>IN VITRO</i> , DA ATIVIDADE ANTAGONISTA DAS BEBIDAS CONTRA ALGUNS PATÓGENOS ENVOLVIDOS EM DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS | 50 |
| 4.14 AVALIAÇÃO DO EFEITO DE <i>LACTOBACILLUS</i> SPP. E DE EXOPOLISSACARÍDEOS SOBRE A ADESÃO E/OU INVASÃO DE <i>SALMONELLA ENTERITIDIS</i> SOROVAR ENTERITIDIS EM CÉLULAS CACO-2/TC-7 | 51 |
| 4.14.1 DETERMINAÇÃO DA ADESÃO E INVASÃO DE <i>SALMONELLA ENTERITIDIS</i> SOROVAR ENTERITIDIS EM CÉLULAS CACO-2/TC-7..... | 51 |
| 4.14.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO DE AÇÃO PROTETORA DE <i>LACTOBACILLUS</i> SPP. E DE EXOPOLISSACARÍDEOS SOBRE A ADESÃO E/OU INVASÃO DE <i>SALMONELLA ENTERITIDIS</i> SOROVAR ENTERITIDIS EM CÉLULAS CACO-2/TC-7 | 52 |
| 4.15 IDENTIFICAR OS MICRO-ORGANISMOS METABOLICAMENTE ATIVOS NAS DIFERENTES BEBIDAS FERMENTADAS E AQUELES QUE ESTÃO ENVOLVIDOS NA SÍNTESE DE EPS, POR ANÁLISE TRANSCRIPTÔMICA | 52 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 54 |
| 5.1 AUMENTO DE BIOMASSA DOS GRÃOS DE KEFIR..... | 54 |
| 5.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE GRÃOS DE KEFIR | 57 |
| 5.3 CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA DE BEBIDAS FERMENTADAS PREPARADOS COM GRÃOS DE KEFIR DE LEITE DE DIFERENTES ORIGENS..... | 65 |
| 5.4 CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA DE DIFERENTES BEBIDAS FERMENTADAS PREPARADAS COM GRÃOS DE KEFIR DE ÁGUA AÇUCARADA..... | 71 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 5.5 | PESQUISA DE EPS EM BEBIDAS FERMENTADAS COM GRÃOS DE KEFIR DE LEITE E DE ÁGUA AÇUCARADA | 74 |
| 5.6 | PRODUÇÃO DE EPS POR <i>LACTOBACILLUS</i> SPP. ISOLADOS DE GRÃOS DE KEFIR..... | 78 |
| 5.7 | DETERMINAÇÃO DA PUREZA DOS EPS PRODUZIDOS POR <i>LACTOBACILLUS</i> SPP. | 81 |
| 5.8 | QUANTIFICAÇÃO DE CARBOIDRATOS NOS EPS PRODUZIDOS POR <i>LACTOBACILLUS</i> SPP..... | 84 |
| 5.9 | DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR DE EPS PRODUZIDOS PELOS <i>LACTOBACILLUS</i> SPP..... | 84 |
| 5.10 | CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL PRIMÁRIA DE EPS POR ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) | 87 |
| 5.11 | AVALIAÇÃO, <i>IN VITRO</i> , A ATIVIDADE ANTAGONISTA DAS BEBIDAS FERMENTADAS CONTRA ALGUNS PATÓGENOS ENVOLVIDOS EM DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS | 89 |
| 5.12 | AÇÃO PROTETORA DE <i>LACTOBACILLUS</i> SPP. E SEUS RESPECTIVOS EPS SOBRE A ADESÃO E INVASÃO DE <i>SALMONELLA ENTERICA</i> SOROVAR ENTERITIDIS EM CULTURA DE CÉLULAS CACO-2/TC7 | 91 |
| 5.13 | MICRO-ORGANISMOS METABOLICAMENTE ATIVOS NO KEFIR DE LEITE E DE ÁGUA AÇUCARADA | 95 |
| 5.14 | AVALIAÇÃO DA SÍNTESE DE EXPOLISSACARÍDEOS..... | 111 |
| 6. | CONCLUSÕES..... | 114 |
| | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 115 |
| | APENDICE | 128 |

1. INTRODUÇÃO

A produção de kefir no Brasil ocorre de modo artesanal e fundamenta-se na tradição de cultivo do grão e produção da bebida fermentada conforme as técnicas dos povos da região do Cáucaso. O kefir é um produto lácteo obtido pela fermentação do leite, por meio da ação de micro-organismos iniciadores presentes nos grãos de kefir, embora outras matrizes alimentares, como por exemplo água com açúcar mascavo, também possam ser utilizadas no processo de fermentação. Devido às suas alegações funcionais, a produção destas bebidas fermentadas vem sendo cada vez mais divulgada e revela uma ampla área de pesquisa ainda a ser estudada.

Apesar do valor nutricional e das alegações funcionais das bebidas fermentadas, o método tradicional de obtenção do kefir, a partir de fermentações sucessivas com re-inoculação dos grãos gera produtos não padronizados. Isto pode ocorrer em função da variação da composição e da quantidade da microbiota, tornando difícil a manutenção do padrão de identidade e qualidade das bebidas fermentadas e conseqüentemente uma regulamentação específica.

Dessa forma, estudos sobre a constituição dos grãos de kefir, de seus produtos fermentados disponíveis no Brasil e de alguns efeitos biológicos desses produtos podem contribuir para o fornecimento de base científica para a produção de bebidas fermentadas com alegações funcionais de forma padronizada. Isto facilitaria a introdução deste produto no mercado consumidor brasileiro, em escala comercial e supriria uma grande demanda de consumidores que buscam hábitos alimentares mais saudáveis e envelhecimento com qualidade de vida.

Considerando que abordagens baseadas em cultivo podem não permitir o conhecimento dos micro-organismos metabolicamente ativos nas bebidas fermentadas devido à exigência nutricional e fisiológica diferenciada da microbiota presente, neste estudo foi utilizada a ferramenta de análise transcriptômica para obter essa informação. Além disso, através dessa técnica foi possível avaliar, em diferentes bebidas fermentadas, a expressão de genes envolvidos na biossíntese de exopolissacarídeos, metabólitos com grande potencial biotecnológico.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Kefir

Kefir é um leite fermentado, originado nas montanhas do Cáucaso. Tradicionalmente, durante centenas de anos, foi produzido em sacos de couro e/ou em barris de carvalho, por meio da fermentação dos leites de vaca, ovelha ou cabra, iniciada por grãos de cor branca amarelada e insolúveis em água. No final do século XIX, o kefir tornou-se popular na Europa central e oeste, sendo muito consumido em vários países como Polônia, Rússia, Hungria e Escandinávia. As culturas iniciadoras e os métodos de produção se diferem nesses países, produzindo assim bebidas com diferentes qualidades e propriedades biológicas (Oberman e Libudzisz, 1998). A bebida pronta para consumo apresenta aspecto cremoso e espesso, sabor levemente ácido, sensação refrescante, devido à solubilidade do gás carbônico (CO₂) no líquido, e pequena quantidade de álcool (entre 0,08% e 2,0%) (Farnworth, 2005; Montanuci et al., 2010; Altay et al., 2013). Como a produção envolve diferentes processos fermentativos conduzidos por grupos microbianos, a bebida pode apresentar em sua composição ácidos láctico e acético, etanol, dióxido de carbono e compostos aromáticos tais como acetaldeído, diacetil e acetoina na tradicional produção de kefir (Altay et al., 2013).

De acordo com o *Codex Alimentarius* (2010), kefir é um produto lácteo obtido pela fermentação de leite, por meio da ação de micro-organismos iniciadores presentes nos grãos de kefir, tais como: *Lactobacillus kefir*, espécies dos gêneros *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Acetobacter* crescendo em uma forte associação mutualística. Os grãos de kefir também são constituídos por leveduras fermentadoras de lactose (*Kluyveromyces marxianus*) e leveduras não-fermentadoras de lactose (*Saccharomyces unisporus*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces exiguus*). A legislação brasileira considera também a presença de *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium* spp. e *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* (Brasil, 2007). A ação desses micro-organismos é responsável pela redução do pH do meio devido a produção de ácido láctico, com precipitação de da proteína caseína (coagulação), produção de etanol e dióxido de carbono (Brasil, 2007; *Codex Alimentarius*, 2010). Esses micro-organismos iniciadores caracterizam o produto e devem permanecer viáveis, ativos e abundantes durante todo o prazo de validade (*Codex Alimentarius*, 2010).

A composição físico-química e microbiológica do kefir é influenciada pela microbiota iniciadora e o mesmo deve apresentar teor mínimo de 2,7% de proteína de leite, menos de 10% de gordura, acidez titulável mínima de 0,6% (expressa em ácido lático), contagem mínima de bactérias ácido lácticas e leveduras de 10^7 e 10^4 unidades formadoras de colônias (UFC/g), respectivamente (Brasil, 2007; *Codex Alimentarius*, 2010). As propriedades físico-químicas e qualidade do kefir são afetadas pela condição microbiológica dos grãos de kefir, pela proporção de grão da cultura iniciadora em relação à quantidade de leite, pelo tempo e a temperatura de incubação, pela temperatura de armazenamento e condições higiênicas de processamento (Altay et al., 2013).

Magalhães e colaboradores (2011), analisando as características físico-químicas de kefir preparado no Brasil, verificaram que as amostras no tempo zero e após 24 horas de fermentação, apresentaram, respectivamente, pH 6,61 e 4,42; 2,12% e 3,91% de proteína; 3,63% e 2,34% de gordura; 0,21% e 0,22% de cálcio; e acidez titulável total (ATT), expressa em graus Dornic ($^{\circ}$ D), de 26° D e 93° D. As principais razões para diminuição do pH e aumento da ATT é a produção de ácidos orgânicos, etanol, CO_2 e outros compostos voláteis produzidos pela microbiota da bebida kefir. O teor de gordura reduzido é devido à produção de lipases pelos micro-organismos e o teor de proteína aumentado é devido ao aumento da biomassa microbiana.

Tradicionalmente, na produção de kefir, a cultura iniciadora deve ser produzida a partir dos grãos de kefir. A massa dos grãos de kefir iniciadores afeta o pH, a viscosidade e o perfil microbiológico do produto final e ele aumenta ligeiramente após cada incubação. Os grãos de kefir (3-10% v/v) são adicionados ao leite e incubados à temperatura de $24-26^{\circ}\text{C}$, com agitação, durante aproximadamente 24 horas, até que o pH atinja o valor de 4,7. A diminuição do pH favorece o crescimento de lactobacilos. Posteriormente ao período de incubação, os grãos de kefir são removidos por meio de peneiramento e são reutilizados como cultura iniciadora subsequente para a próxima preparação. A bebida final deve ser refrigerada (Guzel-Seydim et al., 2000; Farnworth, 2005; Altay et al., 2013). Atualmente, a maior parte da produção comercial de kefir envolve a utilização de kits liofilizados contendo culturas de bactérias lácticas e leveduras (Guzel-Seydim et al., 2011).

Inúmeras bebidas fermentadas que dependem de microbiota mista para fermentar soluções de açúcar são conhecidas em todo o mundo. Similares em alguns aspectos ao kefir de leite, mas fermentando sacarose em vez de lactose, estas bebidas são conhecidas como kefir de água, kefir açucarado, cerveja de gengibre, tibico e/ou tibi. As culturas iniciadoras são caracterizadas pela associação de diferentes bactérias ácido lácticas (BAL), ácido acéticas (BAA) e leveduras (Gulitz et al., 2011; Cotê et al., 2013).

A origem do kefir de água permanece incerta. Existem algumas descrições de grãos semelhantes chamados “plants gingerbeer” que soldados ingleses trouxeram de volta da guerra da Criméia, em 1855 ou “grãos Tibi”, que são conhecidos por se originarem de folhas de cacto mexicano (*Optunia*). Também outros nomes distintos são considerados, como “abelhas califórnias”, “abelhas africanas”, “Ale nuts”, sementes de cerveja japonesa, e “grãos de kefir açucarados”, a fim de diferenciá-los dos grãos utilizados para a fermentação de leite (Pidoux, 1989; Gulitz et al., 2011). E assim, a denominação de grãos de kefir de água açucarada será considerada ao longo do texto.

Os grãos de kefir de água açucarada são utilizados popularmente no México para produção de bebidas refrescantes, de baixo teor alcoólico e acético, a partir da fermentação de água açucarada na proporção de 3 a 10% (p/v). Se o período de fermentação prolonga-se, tem-se uma bebida alcoólica e posteriormente vinagre. Sendo a distinção de produtos causada devido diferença no tempo de fermentação (Rubio et al., 1993).

Os grãos de kefir também têm sido cultivados em soro lácteo, devido ao seu elevado valor nutricional (50% dos constituintes do leite), pelo grande volume de produção e por se tratar de um problema quando dispensado de modo inadequado no meio ambiente. Assim, é uma alternativa para a valorização deste subproduto, para produção de bebida alcoólica e álcool potável (Magalhães et al., 2010).

2.2 Grãos de kefir

Os grãos de kefir de leite assemelham-se a couve-flor; possuem tamanho variável, de 0,3 a mais de 3,0 centímetros; formatos irregulares; cor branco-amarelada; textura viscosa e firme. Os grãos

são mantidos viáveis transferindo-os diariamente para o leite fresco e permitindo-lhes crescer por aproximadamente 20 horas. Durante esse tempo, os grãos aumentam a sua massa. A replicação é necessária para manter a viabilidade desses grãos, uma vez que grãos velhos e secos têm pouca ou nenhuma capacidade para replicação. O processo de produção é em batelada, com reciclo do inóculo e o número de reciclos é definido pela atividade fermentativa dos grãos (Oberman e Libudzisz, 1998; Farnworth, 2005).

Os grãos de kefir de água açucarada são formados por uma massa gelatinosa consistente, de cor amarela translúcida, formato irregular e tamanho variável; são compostos, principalmente, por uma matriz exopolissacarídea onde se encontram incorporadas diferentes bactérias e leveduras que constituem uma associação mutualística estável (Rubio et al., 1993).

Os exopolissacarídeos são polissacarídeos produzidos por bactérias ácido lácticas e leveduras e lançados no meio externo. O polissacarídeo responsável pela matriz exopolissacarídea de grãos de kefir cultivados em leite é denominado kefirano (De Vuyst e Degeest, 1999; Cheirsilp et al., 2003). Quando cultivados em água com açúcar, a matriz exopolissacarídea é composta por polímeros de açúcares contendo resíduos de D-glicose e D-frutose (De Vuyst e Degeest, 1999; Gulitz et al., 2011).

A microbiota que compõe os grãos de kefir é relativamente constante ao longo do tempo, embora possa haver variações sazonais que podem afetar a consistência do produto final. Análises de perfis microbianos dos grãos de kefir, cultura mãe e kefir (bebida fermentada final) mostraram que a densidade populacional de bactérias dos gêneros *Lactococcus* e *Lactobacillus* e leveduras diferem entre os três. Isso, em parte, explica porque a produção de kefir deve começar com grãos de kefir, uma vez que a bebida final, não tem o número ou complexidade dos micro-organismos presentes nos grãos. Assim, não se recomenda a utilização da bebida como uma cultura iniciadora para a produção de um novo lote de kefir (Farnworth, 2005).

Considera-se que a comunidade microbiana encontrada em grãos de kefir tem sido utilizada como um exemplo de comunidade simbiótica, devido ao fato das bactérias e leveduras do kefir quando separadas como culturas puras, apresentarem uma diminuição da atividade bioquímica

ou não crescerem no leite, o que dificulta os estudos das espécies microbianas dos grãos de kefir. Em geral, as bactérias lácticas são mais numerosas (10^8 - 10^9 UFC/g) que as leveduras (10^5 - 10^6 UFC/g) e bactérias acéticas (10^5 - 10^6 UFC/g), embora as condições da fermentação possam afetar este padrão (Koroleva, 1991).

Magalhães e colaboradores (2011) avaliando a diversidade microbiana da bebida kefir de leite produzida no Brasil, por meio de uma abordagem combinada de métodos de identificação fenotípica e genotípica, observaram que em 359 amostras de bactérias, 60,5% eram bactérias lácticas, 30,6% leveduras e 8,90% bactérias acéticas. Os autores relatam pela primeira vez, a ocorrência das leveduras *Lachancea meyersii* e *Kazachstania aerobia* no kefir e sugeriram que estas espécies poderiam estar relacionadas com a assimilação de alguns ácidos produzidos por bactérias lácticas.

Encontra-se nos grãos de kefir de leite uma diversidade microbiológica elevada que inclui bactérias lácticas dos gêneros *Streptococcus* (*S. thermophilus*), *Lactococcus* (*L. lactis* subsp. *lactis*), *Lactobacillus* (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. casei*, *L. brevis*, *L. kefirgranum*, *L. parakefir*, *L. paracasei*, *L. mali*, *L. perolens*, *L. satsumensis*) e *Leuconostoc*; leveduras fermentadoras de lactose como *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis* e não fermentadoras (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida inconspícua* e *C. maris*), bactérias acéticas (*Acetobacter syzygii* e *A. lovaniensis*) e outros micro-organismos ainda não descritos (Garrote et al., 2001; Simova et al., 2002; Miguel et al., 2010; Magalhães et al., 2011; Zanirati et al., 2015).

Nos grãos de kefir de água, a microbiota inclui bactérias lácticas dos gêneros *Lactococcus* (*L. lactis*), *Lactobacillus* (*L. casei*, *L. diolivorans*, *L. hilgardii*, *L. kefiranofaciens*, *L. nagelii*, *L. parabuchneri*, *L. parafarraginis*, *L. perolens*, *L. plantarum*, *L. satsumensis* e *L. mali*), *Leuconostoc* (*L. mesenteroides* e *L. citreum*); bactérias acéticas do gênero *Acetobacter* (*A. fabarum* e *A. orientalis*); e leveduras *Hanseniaspora valbyensis*, *Lachancea fermentati*; *Saccharomyces cerevisiae* e *Zygorhizula florentina* (Gulitz et al., 2011; Zanirati et al., 2015).

As leveduras têm um papel importante na elaboração de produtos lácteos fermentados, nos quais podem fornecer nutrientes essenciais para o crescimento de outros micro-organismos, como

aminoácidos e vitaminas, além de alterar o pH, secretar etanol e produzir dióxido de carbono (CO₂). Apesar de menos estudadas do que as bactérias, é sabido que as leveduras presentes nos grãos de kefir proporcionam um ambiente para o crescimento de bactérias, produzindo ainda metabólitos que contribuem para o sabor e paladar de kefir (Farnworth, 2005).

2.3 Alegações probióticas do kefir

O kefir tem sido muito utilizado na Europa Oriental por sua suposta contribuição em benefícios da saúde. Entretanto, até recentemente, existia pouca evidência científica revisada para apoiar estas contribuições. Farnworth dá o exemplo de que na Rússia, uma porção diária de kefir é uma prática comum em muitos hospitais, pois acredita-se que seja um “promotor da saúde” (Farnworth, 2005). Entretanto, com o interesse sobre os efeitos benéficos à saúde do kefir está crescendo e o número de pesquisas relacionadas está aumentando, hoje se tem algumas evidências sólidas quanto às contribuições do kefir à saúde (Nielsen et al., 2014).

A Organização para a Agricultura e Alimentação (FAO) e a Organização Mundial de Saúde (OMS) (2001) definiram probiótico como micro-organismos vivos que quando administrados em quantidade adequada conferem benefícios à saúde do hospedeiro. Para a administração oral, os micro-organismos probióticos devem ser resistentes aos sucos gástricos e capazes de crescer na presença de bile nas concentrações normalmente encontradas no intestino. Além disso, os micro-organismos devem possuir algumas características adicionais relativas à segurança e aos aspectos tecnológicos, questão a não patogenicidade, a estabilidade genética, a ausência de genes de resistência a antibióticos transmissíveis, não invasividade, permanência em estado viável no produto durante o processamento e armazenamento, facilidade de ser cultivado em grande escala e, de preferência, que seja fago-resistente (Salminen e Isolauri, 1996; FAO/WHO, 2001; Abraham et al., 2010; Ganguly et al., 2011).

Uma das maneiras das bactérias probióticas exercerem a ação protetora no intestino é competindo com patógenos por *habitats* ecológicos e por nutrientes. Em particular, a inibição da adesão de agentes patogênicos ao epitélio intestinal pode muitas vezes ser suficiente para prevenir a infecção. As bactérias probióticas podem realizar essa exclusão ao se juntar as células

intestinais, bloqueando os sítios de ligação nos enterócitos, ou agregando-se aos patógenos no lúmen intestinal. Além disso, a capacidade de probióticos para aderir aos tecidos do hospedeiro também aumenta o seu tempo de residência, permitindo que exerçam os seus efeitos benéficos durante mais tempo. Finalmente, a aderência de probióticos nos tecidos representa muitas vezes um passo importante na modulação da resposta imune do hospedeiro contra agentes patogênicos (Abraham et al., 2010).

Como modelo para avaliação da atividade antagonista contra patógenos de potenciais probióticos, estudos *in vitro* são realizados em culturas de células Caco-2. Estas células são extraídas de adenocarcinoma de cólon humano. Durante sua cultura em filtros permeáveis e porosos, elas se diferenciam espontaneamente em enterócitos, formando uma membrana composta de células em monocamada aderidas por junções e apresentam como vantagem a rápida multiplicação celular (Balimane et al. 2000). Possuem ampla utilização, porém esta linhagem celular tem se mostrado heterogênea e altamente dependentes das condições de cultivo, levando a variações nas propriedades de transporte e permeabilidade, dificultando assim estudos *in vitro*. A fim de reduzir a heterogeneidade da linhagem celular Caco-2, vários clones foram isolados, entre eles, o clone TC-7 que consiste em uma população mais homogênea, dando origem a resultados menos variáveis e exibindo junções intercelulares mais desenvolvidas (Zucco et al., 2005; Turco et al., 2011).

Este modelo de estudo *in vitro* foi utilizado por Golowczyc e colaboradores (2007) para avaliar a capacidade de estirpes de *Lactobacillus kefir* isolados a partir de diferentes grãos de kefir, de antagonizar a ação de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis. A co-incubação de *Salmonella* com *L. kefir* diminuiu significativamente a capacidade da *Salmonella* em aderir e invadir essas células. O pré-tratamento deste patógeno com o sobrenadante da cultura reduziu a desorganização das microvilosidades produzidas por *Salmonella*, sugerindo um papel protetor do *L. kefir* no processo de associação e invasão (Golowczyc et al., 2007). O efeito antagonista contra *Salmonella* spp. de soro lácteo fermentado com grãos de kefir e com três estirpes isoladas a partir deles, *L. plantarum*, *L. kefir* e *K. marxianus* var. *marxianus* foram avaliadas em células Caco-2/TC-7. Ambos os produtos fermentados interferiram na capacidade de *Salmonella* spp. de se aderir e invadir as células Caco-2/TC-7 (Londero et al., 2014).

Os efeitos do kefir foram testados contra uma estirpe toxigênica de *Bacillus cereus*. A incubação de leite com esporos de *B. cereus* e 5% de grãos de kefir impediu a germinação de esporos e crescimento de formas vegetativas. Em contraste, quando 1% dos grãos de kefir foi utilizado, estes efeitos não foram observados, embora outros fatores não possam ser excluído (Kakisu et al., 2007).

Um consórcio de bactérias lácticas e leveduras isoladas de grãos de kefir foram testados contra a invasão de *Shigella* em cultura de células Hep-2. Uma mistura de cinco estirpes demonstrou uma significativa inibição da internalização da célula de *Shigella flexneri* e *Shigella sonnei*. A adição de estirpes individuais ou em mistura às células antes da adição de *Shigella* protegeu de modo mais eficiente quando comparado à adição em conjunto com a *Shigella* sobre as células. Entre as estirpes de kefir pesquisadas, *L. plantarum* CIDCA 83114 mostrou a inibição da invasão mais significativa. Estes resultados fornecem evidência para as potenciais propriedades inibidoras preventivas de estirpes isoladas de kefir, contra as espécies de *Shigella* causadoras de doenças (Kakisu et al., 2013).

Os efeitos benéficos associados ao consumo de kefir estão relacionados aos micro-organismos que constituem o grão, bem como aos compostos bioativos que são produzidos durante a fermentação. Dentre estes compostos os exopolissacarídeos (EPS) apresentam funções relevantes (Abraham et al., 2012).

2.4 Exopolissacarídeos de bactérias lácticas

Exopolissacarídeos (EPS) são polissacarídeos produzidos por micro-organismos, incluindo algumas bactérias lácticas, que são secretados ao meio extracelular (De Vuyst e Degeest, 1999; Abraham et al., 2010; Madhuri e Prahakar, 2014). Os EPS microbianos são associados com a superfície celular na forma de cápsulas ou secretados para o meio extracelular na forma de muco e, no ambiente natural das bactérias são produzidos para desempenhar um papel de proteção da célula microbiana contra dessecação, fagocitose, antibióticos ou compostos tóxicos (etanol), predação por protozoários e estresse osmótico, além de participarem da aderência a superfícies

sólidas, formação de biofilme e reconhecimento celular (por exemplo, via ligação a uma lectina). Exemplos de EPS microbianos importantes no processamento de alimentos são as gomas dextranas, xantana, alginatos, glucanos e kefirano (De Vuyst e Degeest, 1999; Abraham et al., 2010).

Uma das funções atribuídas às substâncias polissacarídicas na indústria de alimentos é o seu papel como prebiótico para a saúde humana. Prebiótico é definido como ingrediente alimentar que afeta benéficamente o hospedeiro ao estimular seletivamente o crescimento ou a atividade de um número limitado de bactérias no cólon para melhorar o estado de saúde. Demonstrou-se que a incorporação de prebióticos específicos na dieta pode estimular o crescimento de certos micro-organismos benéficos no cólon, sendo os produtos finais da sua fermentação: ácido láctico, hidrogênio, metano, dióxido de carbono e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), especialmente ácidos acético, propiônico e butírico. Estes AGCC têm uma importante função trófica para os colonócitos, contribuindo para a regulação do metabolismo lipídico e do açúcar e, diminuindo o pH e modulando a microbiota (Abraham et al., 2010).

Vários estudos indicam que os EPS se relacionam com a adaptação e reconhecimento de fatores ambientais e não como uma fonte de energia ou de carbono para o micro-organismo. Estes constituem uma barreira hidrofílica que pode proteger as bactérias e estar envolvido na adesão de superfícies, como a mucosa intestinal. Dada à estrutura química e o tipo de ligações presente nos EPS, eles dificilmente são hidrolisados pelas enzimas presentes no trato intestinal e, por isso, podem atingir o intestino delgado onde pode exercer o efeito biológico (Abraham et al., 2010). Os seus efeitos benéficos incluem uma ação protetora, sequestrando toxinas ou outros metabolitos nocivos como substâncias carcinogênicas, ou impedindo a adesão de micro-organismos patogênicos por bloqueio do receptor. Um efeito adicional que estes EPS exercem é contribuindo com a adesão microbiana de probiótico, favorecendo a colonização e a permanência por mais tempo no trato intestinal (Abraham, 2012).

Dependendo da sua composição química, os EPS são classificados em homopolissacarídeos (Hops) e heteropolissacarídeos (Heps) (De Vuyst e Degeest, 1999; Abraham et al., 2010). Os Hops consistem de quatro subgrupos, nomeados 1) α -D-glucanos com ligações α -(1→6) como dextranos, mutanos, reuteranos e alternanos que são produzidos por *Leuconostoc dextranicum*, *L.*

mesenteroides, *Lactobacillus brevis*, *L. fermentum*, *L. parabuchneri*, *L. reuteri*, *L. sakei*, *Streptococcus downei*, *S. gordonii*, *S. mutans*, *S. sanguis* e *S. sobrinus*; 2) β -D-glucanos com ligações β -(1 \rightarrow 3), produzidos por *L. brevis*, *L. diolivorans*, *Pediococcus damnosus*, *P. parvulus*, *Streptococcus* spp. e *Oenococcus oeni*; 3) β -D-frutanos, que incluem levanos β -(2 \rightarrow 1) e inulinas β -(2 \rightarrow 1), produzidos por *Leuconostoc citreum*, *Lactobacillus frumenti*, *Lactobacillus panis*, *Lactobacillus pontis*, *L. reuteri*, *Lactobacillus sanfranciscensis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *S. criceti*, *S. ratti*, *S. salivarius*, *S. mutans*, e *Weisella confusa*; 4) outros, como poligalactanos, compostos por unidades repetitivas, estruturalmente idênticos, com diferentes ligações glicosídicas, produzidos por *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Os Hops normalmente apresentam massa molecular elevada (até 10^7 Da) com diferente grau, tipo de ramificação e comprimento das cadeias polissacarídicas (De Vuyst e Degeest, 1999; Ruas-Madiedo et al., 2008).

Os heteropolissacarídeos (Heps) são compostos por unidades repetitivas, ramificadas ou não, de mais de um tipo de resíduos de açúcar que, geralmente, é composto por D-galactose, D-glicose e L-ramnose em diferentes proporções. As BAL mesófilas que estão relacionadas à produção deste EPS são *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. sakei*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* e as BAL termofílicas são *Lactobacillus acidophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Streptococcus thermophilus* e *Streptococcus macedonicus*. Existe uma grande diversidade de Heps no que diz respeito à sua composição, estrutura, massa molecular, rendimento e funcionalidade (De Vuyst e Degeest, 1999; Ruas-Madiedo et al., 2008).

Alguns EPS possuem capacidade de dissolução ou dispersão em água, e de gelificação, em baixas concentrações, podendo assim contribuir para a formulação de produtos. Esses polímeros também possuem efeitos secundários como emulsificação, estabilização, suspensão de partículas, controle da cristalização, sinérese, encapsulamento e formação de biofilme. Outra aplicação é a utilização como aditivos naturais uma vez que eles são produzidos por micro-organismos geralmente reconhecidos como seguros (GRAS) que por sua vez, poderiam exercer efeitos benéficos para melhorar o estado de saúde do indivíduo. As propriedades funcionais desses polímeros em alimentos são determinadas pelas características estruturais (De Vuyst e Degeest, 1999; Abraham, 2012).

Ruas-Madiedo et al. (2010) mostraram que alguns EPS produzidos por BAL probióticas foram capazes de aumentar a associação de alguns enteropatógenos ao muco intestinal, sugerindo que este aumento poderia explicar o fenômeno da exclusão competitiva dado pelos probióticos.

2.4.1 Dextrano

O dextrano é um homopolissacarídeo de glicose de origem bacteriolana, produzido por organismos que excretam a enzima dextranosacarase na presença de sacarose. A enzima dextranosacarase pode ser produzida por bactérias dos gêneros *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Leuconostoc* (Koepsell e Tsuchia, 1952). Estruturalmente, os dextrans são definidos como α -D-glucanos resultantes da polimerização da glicose, em que predominantemente (cerca de 95%) as ligações glicosídicas existentes são α -(1 \rightarrow 6) e uma quantidade variável de α -(1 \rightarrow 2), α -(1 \rightarrow 3) e α -(1 \rightarrow 4) nas ligações ramificadas (Santos et al., 2005; Sarwart et al., 2008).

O dextrano é produzido industrialmente pela fermentação de um meio de cultivo rico em sacarose, sendo que o controle da massa molecular do dextrano pode ser feito com a manipulação da composição deste meio em termos da alteração do carboidrato. Quando o meio contém somente sacarose as massas moleculares comumente são em torno de de 10^7 Da. Porém, quando se utilizam outros açúcares como a lactose, galactose e maltose juntos com a sacarose, os valores variam entre $2,4 \times 10^5$ a $4,0 \times 10^6$ Da, possibilitando obter uma gama mais vasta de dextrans (Santos et al., 2005; Sarwart et al., 2008).

Os dextrans podem ser utilizados como substitutos de plasma sanguíneo, na produção de hidrogéis capazes de proporcionar uma liberação controlada de fármacos e proteínas, como constituintes da fase estacionária de coluna de separação para cromatografia, como agentes emulsificantes e controladores de viscosidade na indústria de alimentos, veículos de antimicrobianos e filmes bioativos (Koepsell e Tsuchia, 1952; Piermaria, 2008b; Campos et al., 2013; Qianying et al., 2014; Chang et al., 2014).

2.4.2 Kefirano

O kefirano é um heteropolissacarídeo presente na matriz polissacarídea dos grãos de kefir de leite. Possui massa molecular superior a $4,0 \times 10^6$ Da, efeitos benéficos para o consumidor e grandes aplicações tecnológicas (De Vuyst e Degeest, 1999; Abraham, 2012).

A produção de kefirano é atribuída a *L. kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens*, embora os primeiros trabalhos sejam relacionados à *L. brevis* (Piermaria, 2008). Este polissacarídeo é um glucogalactano ramificado, solúvel em água. Devido à sua estrutura e o tipo de ligação química presente, o kefirano não pode ser hidrolisado no trato digestivo superior e atinge o intestino grosso intacto, onde pode exercer os seus efeitos biológicos (Abraham, 2012).

A extração do exopolissacarídeo é um método simples e eficaz, no qual inicialmente se faz uma centrifugação em temperatura ambiente para a retirada de micro-organismos e material em suspensão e, posteriormente se faz a precipitação alcoólica a frio. A adição de etanol modifica a constante dielétrica de forma tal que os polissacarídeos perdem a estabilidade e se precipitam. A baixa temperatura facilita a precipitação e dificulta a re-dissolução. A separação do precipitado (EPS) é realizada por centrifugação e o mesmo pode ser ou não liofilizado para estudos subsequentes (Piermaria, 2008).

A cromatografia por exclusão de tamanho é uma das técnicas mais amplamente utilizadas para determinar a distribuição de tamanho molecular de polímeros de qualquer espécie, incluindo polissacarídeos. O mecanismo de separação depende do tamanho e da forma das moléculas da amostra em relação ao tamanho e forma dos poros da fase estacionária. O método utiliza padrões de polímeros com massa molecular e tempo de retenção conhecidos (Sepsey et al., 2014; Bacskay et al., 2014).

Tecnologicamente, o kefirano pode ser utilizado como um aditivo alimentar para produto lácteo fermentado, uma vez que melhora as propriedades reológicas dos géis em leite acidificado quimicamente, aumentando a sua viscosidade aparente e evitando a perda destes géis no armazenamento (Rimada e Abraham, 2006).

As atividades biológicas relacionadas ao kefirano provavelmente têm alguma ligação com a atividade imunomoduladora desse polissacarídeo. Vinderola et al. (2006) demonstraram que a administração oral de kefirano induz uma resposta na mucosa intestinal, mantendo a homeostase e aumentando os níveis de produção da imunoglobulina IgA. Além disso, o polissacarídeo influencia na imunidade sistêmica pelas mudanças nos padrões de citocinas (IL-1a, IFNg, TNFa, IL-6 e IL-10) liberadas na corrente sanguínea.

Outro aspecto relacionado ao kefirano é a sua capacidade de interação com células epiteliais e agentes patogênicos intestinais. Este polissacarídeo é capaz de antagonizar os mecanismos de virulência (necrose celular, desorganização filamento de actina e destruição das microvilosidades) de *B. cereus* em enterócitos humanos em cultura de células (Caco-2), evitando danos dos fatores citotóxicos produzidos por este micro-organismo ou interferindo na interação entre *B. cereus* com células epiteliais intestinal (Medrano et al., 2008; Medrano et al., 2009). Embora os mecanismos de proteção ainda não sejam totalmente compreendidos, propõe-se que os EPS bacterianos agem bloqueando os receptores na superfície de células eucarióticas ou atuam como agente eliminador de toxina (Ruas-Madiedo et al., 2010).

2.5 Biossíntese de exopolissacarídeos

A biossíntese de exopolissacarídeos ocorre em diferentes fases de crescimento, depende das condições ambientais, do micro-organismo utilizado para a produção e envolve um grande número de genes que codificam enzimas e proteínas de regulação que podem não ser exclusivas para a produção e secreção dos mesmos (Madhuri e Prahakar, 2014).

A biossíntese de Hops, tais como dextranos, mutanos, alternanos e levanos, é um processo extracelular, ocorre na presença de sacarose e requer a presença e atividade de enzimas altamente específicas como as glicosil e frutosil transferases, para a biossíntese de dextrano e levano, respectivamente. Estas transferases estão envolvidas na reação de polimerização e a energia necessária para a reação de síntese é proveniente da hidrólise da sacarose e biossíntese de exopolissacarídeos (Figura 1). O processo de biossíntese de Hops não envolve transporte do

açúcar para o meio intracelular nem formação de precursores ativados. As glicosil transferases são normalmente constitutivas, porém há casos de bactérias lácticas cuja produção da enzima é induzida pela presença de sacarose (De Vuyst e Degeest, 1999).

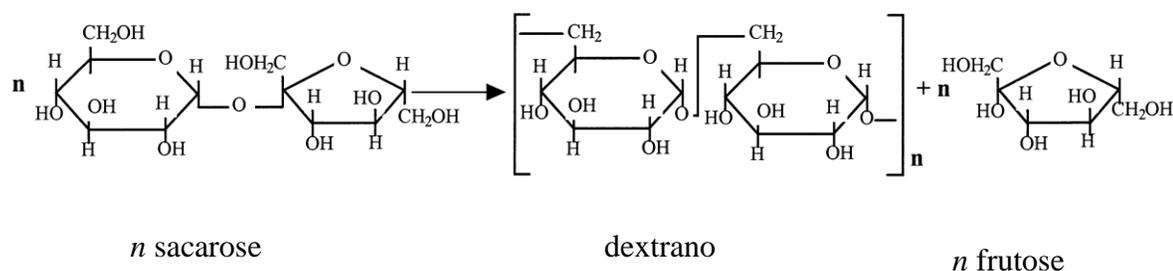


Figura 1 - Biossíntese do dextrano.
Fonte: De Vuyst e Degeest (1999).

Os Heps são constituídos de resíduos de D-glicose, D-galactose e D-ramnose em diferentes combinações e quantidades e são sintetizados por uma sequência complexa de interações, envolvendo enzimas intracelulares. Em bactérias Gram positivo, essa biossíntese é dividida em quatro sequências de reação: o transporte de açúcares para o citoplasma; a síntese de açúcar-1-fosfato; polimerização dos resíduos de açúcar e os processos envolvidos na exportação das unidades repetidoras e montagem dos EPS (Figura 2) (De Vust e Degeest, 1999).

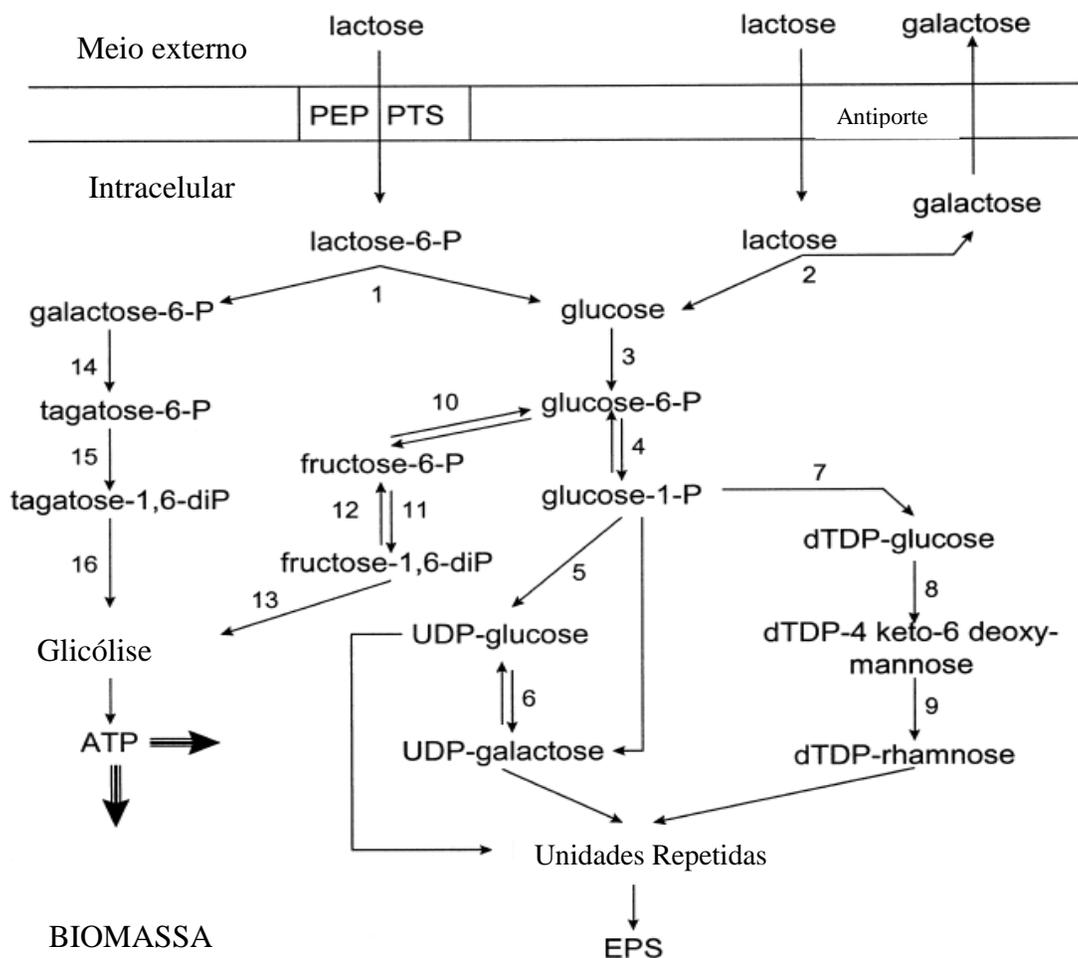


Figura 2 - Representação esquemática de vias envolvidas no catabolismo de lactose (superior esquerdo e direito) e biossíntese de exopolissacarídeos (inferior direito) por *Lactococcus lactis* fermentadora de lactose (lactose transportada pelo sistema fosfoenoltransferase lactose específico) e em *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, ambas não fermentadoras de galactose (lactose transportada através do sistema de transporte secundário antiporte lactose/galactose).

Os números referem-se às enzimas envolvidas: 1, fosfo- β -galactosidase; 2, β -galactosidase; 3, glicoquinase; 4, fosfoglucomutase; 5, UDP-glicose pirofosforilase; 6, UDP-galactose-4-epimerase; 7, DTDP-glicose pirofosforilase; 8, desidratase; 9, epimerase redutase; 10, fosfoglicose isomerase; 11, 6- fosfofrutoquinase; 12, frutose-1,6-disfosfatase; 13, frutose-1,6-difosfato aldolase; 14, galactose-6-fosfato-isomerase; 15, tagatose-6-fosfato quinase; 16, tagatose-1,6-difosfato aldolase. Fonte: De Vuyst e Degeest (1999).

Bactérias lácticas podem utilizar diversos monossacarídeos e dissacarídeos como fontes de carbono. O movimento dessas fontes de carbono para o citoplasma a partir do meio circundante é fortemente regulado por uma série de diferentes proteínas de controle e é realizado por três sistemas de transporte diferentes. No primeiro, o transporte do açúcar é diretamente acoplado à

hidrólise de ATP, via uma ATPase transporte-específica. No segundo, a importação é acoplada ao transporte de íons e outros solutos (sistemas simporte e antiporte). E o terceiro é o sistema mais importante de transporte de açúcar em micro-organismos, denominado sistema fosfoenolpiruvato fosfotransferase (PEP-PTS), que contém proteínas que são responsáveis pela ligação, transporte transmembranar e fosforilação de uma variedade de açúcares. Neste sistema, o grupo fosfato é liberado a partir da conversão de PEP em piruvato catalisada pela piruvato quinase. A maioria das moléculas de açúcar introduzida no citoplasma das bactérias é transformada em açúcar-6-fosfato e degradada pela via glicolítica. Poucos açúcares-6-fosfato são convertidos em glicose-1-fosfato, unidade fundamental na formação de EPS (Madhuri e Prabhakar, 2014).

Quando micro-organismos são cultivados em presença de lactose, após sua entrada na célula, esse açúcar é transformado em glicose-1-fosfato. A glicose-1-fosfato é o metabólito central para a formação de nucleotídeos de açúcar, tais como UDP-glicose e dTDP-glicose pela ação de UDP-glicose pirofosforilase e dTDP-glicose pirofosforilase, respectivamente. A UDP-glicose pode ser usada diretamente para formação de EPS ou ser transformada a UDP-galactose por ação da UDP-galactose-4-epimerase. A dTDP-glicose é transformada a dTDP-4-ceto-6-deoximanose por ação da desidratase e, na sequência, a dTDP-ramnose, por ação da enzima redutase epimerase (Figura 2) (De Vuyst e Degeest, 1999; Madhuri e Prabhakar, 2014). As enzimas que participam da síntese de todos estes nucleotídeos de açúcar são codificadas pelos genes *galU*, *galE*, *rfaA*, *rfaB*, *rfaC* e *rfaD*. Os nucleotídeos de açúcar, essenciais para várias vias metabólicas, têm um papel essencial na biossíntese de EPS devido à participação na ativação dos açúcares, necessária para a polimerização dos monossacarídeos, bem como para a modificação dos mesmos (epimerização, descarboxilação, desidrogenação, etc). A perda da capacidade de sintetizar nucleotídeos de açúcar usualmente leva à perda da capacidade de produção de EPS (Madhuri e Prabhakar, 2014).

A composição final dos heteropolissacarídeos depende dos nucleotídeos de açúcar formados no interior da célula e da sequência de montagem das unidades repetidas, que é dirigida por glicosiltransferases altamente específicas (codificadas por genes do operon *eps*). Essas enzimas promovem o acoplamento de monossacarídeos ao transportador lipídico (isoprenoide),

localizado na membrana citoplasmática (Figura 3). As etapas finais de produção de Heps em bactérias lácticas ainda não são totalmente conhecidas, mas há indícios de que o processo seja similar ao que ocorre em bactérias Gram negativo; as unidades de repetição ligadas ao lipídio carreador são translocadas através da membrana pela ação de enzimas de transporte transmembranosas (flipases). Uma polimerase catalisa a ligação das unidades de repetição e, finalmente, uma enzima catalisa o desacoplamento do polímero do lipídio e controla o comprimento da cadeia (Madhuri e Prabhakar, 2014).

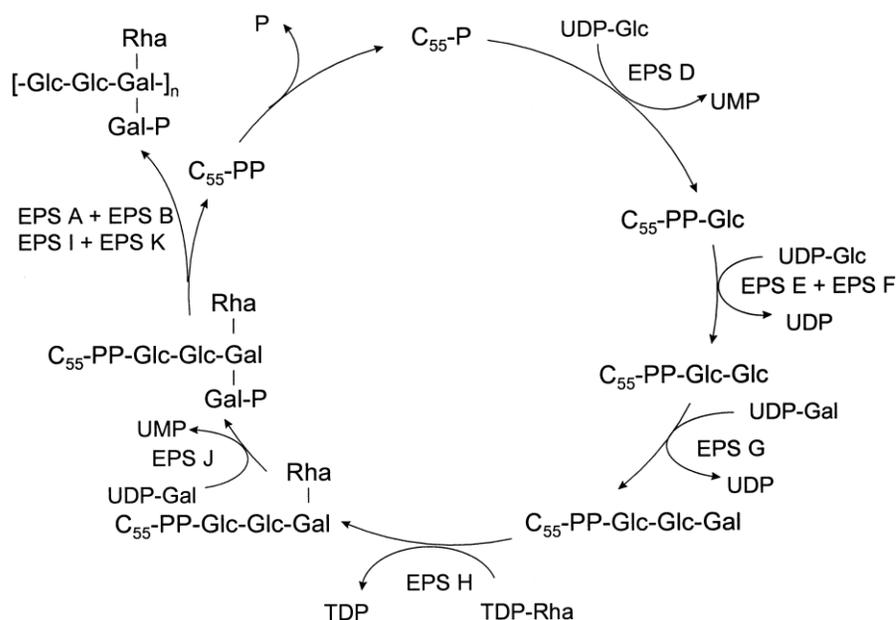


Figura 3 - Modelo para a biossíntese de heteropolissacarídeos em *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.

Legenda: C55-P, transportador lipídico; Glc, glicose; Gal, galactose; Rha, ramnose; UDP- Glc, UDP-Gal e TDP-Rha são açúcares de nucleótidos. EPS (A, B, D, E, F, G, H, I, J e K) são enzimas envolvidas no processo de transferência, polimerização e exportação. Fonte: De Vuyst e Degeest (1999).

A produção e secreção dos EPS envolve uma complexa organização gênica. De forma geral, em bactérias lácticas existem em torno de 13 genes (*epsA* a *epsM*) responsáveis pelo direcionamento da síntese de Heps que estão organizados em um operon (operon *eps*), descrito inicialmente em *S. thermophilus*. Esse operon pode estar localizado em plasmídios, como ocorre em bactérias lácticas mesofílicas (*L. lactis* e *Lactobacillus casei*) ou no cromossomo, como demonstrado para bactérias lácticas termofílicas (*S. thermophilus* e *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*). A organização, direção transcricional e funções atribuídas aos produtos dos genes presentes nos diferentes

operons eps já descritos parecem ser altamente conservadas. Os genes parecem estar organizados em quatro regiões funcionais, sendo uma região central com genes que codificam glicosiltransferases específicas para a montagem das unidades de repetição, duas regiões flangeadoras da região central que demonstram homologia com enzimas envolvidas na polimerização e exportação e uma região regulatória localizada no início do operon (Welman e Madox, 2003).

2.6 Identificação das vias metabólicas ativas em uma comunidade microbiana por análise transcritômica

Transcriptoma é o conjunto de RNA mensageiro de uma célula. Esses dados podem ser analisados e comparados em um determinado momento, como por exemplo, em diferentes estágios de desenvolvimento e condições de crescimento. A compreensão do transcriptoma é essencial para a interpretação de elementos funcionais do genoma, como por exemplo a atividade metabólica de um organismo (Madgan et al., 2010; Malone e Oliver, 2011).

O sequenciamento metagenômico revela importantes propriedades funcionais codificadas em comunidades microbianas e a caracterização destas propriedades requer análise dos componentes ativos através de técnicas meta-ômicas como o metatranscriptoma. Os dados de metatranscriptoma indicam qual dos genes codificados no metagenoma são realmente transcritos e quais são as potenciais vias metabólicas ativas dentro de uma comunidade microbiana sob certas condições ambientais (Ismail et al., 2014).

As bactérias têm estoques de RNA mensageiros (mRNA) que permitem avaliar a interação entre os micro-organismos em resposta às alterações do seu meio ambiente. Em um estudo metatranscricômico, pode-se utilizar o protocolo de RNA-Seq no MiSeq da Illumina. Neste, o RNA total é isolado a partir da amostra e RNA estruturais (transportador e ribossomal) são então removidos para enriquecer o mRNA, que é então transcrito reversamente em cDNA e sequenciado utilizando plataformas de sequenciamento de nova geração (NGS) como os sequenciadores Illumina. Este processo é conhecido como sequenciamento de profundidade e proporciona sensibilidade e precisão. Com estes resultados podemos obter um retrato amplo e

preciso sobre os genes (e suas funções) em uma comunidade microbiana (Malone e Oliver, 2011; Ismaiel et al., 2014).

Um dos problemas em manipular o RNA é a degradabilidade pela temperatura, luz UV e por ribonucleases celulares. A instabilidade ocorre porque o mRNA forma uma estrutura linear, fácil de ser degradada por ribonucleases, diferentemente do RNA transportador (tRNA) e RNA ribossomal (rRNA) que possuem estruturas altamente dobradas e estáveis (Madgan et al. 2010). Por isso, é preciso tomar muito cuidado na manipulação da amostra e, caso a amostra esteja degradada, o resultado é uma taxa muito baixa de *reads* mapeados. Outro problema é a presença do rRNA, uma vez que ele corresponde a uma grande quantidade da massa de RNA de uma célula e, se não for removido da amostra, no final a maioria dos *reads* será de RNA ribossomal, o que normalmente não é objetivo do experimento. É possível utilizar um kit de depleção de rRNA ou então fazer um enriquecimento do RNA com cauda poliadenilato (poliA). Alguns grupos de estudo utilizam os dois para garantir a remoção dos rRNA (Varuzza, 2013).

O kit de depleção de rRNA da Illumina consiste no tratamento das amostras com uma solução de remoção de rRNA. Nesta reação, ocorre hibridização do rRNA com o *probe* e posterior separação do hibridizado com *beads* magnéticas. Nas *beads* magnéticas se forma um *pellet* composto pelo material hibridizado e o excesso de *probe*. A amostra purificada por depleção de rRNA é então transferida e está pronta para preparar a biblioteca (Illumina, 2014a).

A cauda poli-A é uma estrutura localizada na extremidade 3' da maioria dos mRNA de eucariotos. Esta cauda serve para a ligação de proteínas específicas, as quais possivelmente dão ao mRNA proteção contra a degradação enzimática. No processo de purificação com cauda poliA das moléculas mRNA utiliza-se oligonucleotídeos ligados a *beads* magnéticas realizando-se duas rodadas de purificação. Durante a segunda eluição da cauda poliA do RNA, o RNA é também fragmentado e preparado para a síntese de cDNA (Illumina, 2014b).

No RNA-Seq, as amostras transcritas são diretamente sequenciadas. As sequências de transcrição são então mapeadas com um genoma de referência. O mapeamento com o genoma de referência é contado para avaliar o nível de expressão do gene (Malone e Oliver, 2011).

A presença nas bibliotecas de dados com má qualidade ou sequências técnicas, tais como adaptadores de NGS pode resultar em análise abaixo do ideal e estes dados podem ser removidos com o programa Trimmomatic. O Trimmomatic é um eficiente *software* otimizado para dados do Illumina (Bolger et al., 2014).

Após a remoção das partes de má qualidade e/ou dos adaptadores, faz-se o alinhamento dos *reads* com o genoma de referência de bactérias lácticas e leveduras, por exemplo, por meio do programa Bowtie. Este corresponde a primeira etapa comparativa de muitas outras a serem realizadas (Langmead et al., 2009; Langmead e Salzberg, 2012).

A contagem dos *reads* mapeados em cada genoma de referência pode ser feita no programa Browser Extensible DADOS (BED) ferramenta Multicov que relata a contagem de alinhamentos de vários arquivos Bravo Archived Media (BAM), nos quais as informações estão codificadas em formato binário para economizar espaço em disco e na memória. O BED também pode ser utilizado para comparação, manipulação e anotação de recursos genômicos, como anotações de genes e alinhamento de sequências de *reads* (Quinlan e Hall, 2010).

As abordagens atuais para transcrição de reconstrução dependem do alinhamento de *reads* a um genoma de referência, e são, portanto, inadequadas na ausência do mesmo ou quando se tem baixa porcentagem de alinhamento. O Trinity (*software*) é uma ferramenta para a reconstrução de *reads* transcritos completos cujo genoma de referência ainda não está disponível (Grabherr et al., 2011; Haas et al., 2013). O próximo passo na análise dos dados é a identificação de regiões codificantes de proteínas, que pode ser feita no Genemark (Tang et al., 2015), que fornece anotações de genes do genoma de bactérias, eucariotos e *Archea*. Assim, é possível prever os genes nos *contigs* e, posteriormente, as proteínas por meio de uma busca em banco de dados, como por exemplo o Uniprot.

Estudos recentes de metagenômica de genes de bactérias lácticas, utilizando metodologia diferente da descrita acima, indicam que a microbiota se altera durante a fermentação e descreve os principais produtos da fermentação heteroláctica. Jung e colaboradores (2013), verificaram por

meio do sequenciamento do rRNA 16S, que a microbiota fermentadora de vegetais (kimchi) é dominada por seis espécies de BAL: *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus sakei*, *Weissella koreensis*, *Leuconostoc gelidum*, *Leuconostoc carnosum* e *Leuconostoc gasicomitatum* e que esta microbiota se altera durante 29 dias de fermentação. O sequenciamento do mRNA mostrou que *L. mesenteroides* foi mais ativo durante o estágio inicial da fermentação, ao passo que a expressão gênica por *L. sakei*, *W. koreensis* foi elevada durante as etapas posteriores. Muitos genes relacionados ao transporte e hidrólise de carboidratos e a fermentação de lactato foram expressos de forma ativa, o que indica a fermentação heterolática típica. Estes resultados contribuem para o conhecimento da população ativa e da expressão dos genes das BAL responsáveis por um importante processo de fermentação.

Mendes e colaboradores (2013) avaliaram a influência da temperatura de fermentação, a taxa de agitação e adições de fontes de carbono, nas populações mistas de levedura *Saccharomyces cerevisiae* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* para conhecimento sobre suas interações no processo de fermentação da lactose. Estes dois micro-organismos co-ocorrem nas fermentações de kefir e foram estudados durante crescimento anaeróbico em lactose e avaliados por microarranjo de DNA. Ao combinar a análise fisiológica e transcriptômica das duas estirpes nas co-culturas, cinco mecanismos de interação foram identificados: i) *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* hidrolisa a lactose, a qual não pode ser metabolizada por *S. cerevisiae*, para galactose e glicose. Subsequentemente, a galactose, não pode ser metabolizada por *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, sendo então excretada e fornece uma fonte de carbono para a levedura. ii) Em culturas puras, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* só cresce na presença de concentrações maiores de CO₂. Nas culturas mistas anaeróbicas, a levedura fornece este CO₂ por meio de fermentação alcoólica. iii) a análise do consumo de aminoácidos a partir do meio definido indicaram que *S. cerevisiae* fornece alanina à bactéria. iv) uma resposta branda, mas significativa baixa de ferro no transcriptoma de levedura, foi consistente com o quelato de ferro ao lactato produzido por *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. v) a análise do transcriptoma de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* em culturas mistas mostrou uma elevada quantidade de transcritos envolvidos no metabolismo lipídico, sugerindo que há uma competição dos dois micro-organismos pelos os ácidos graxos ou produção de substância protetora ao etanol produzido por *S. cerevisiae*. Este estudo demonstra

que a análise do transcriptoma é uma ferramenta poderosa para investigar as interações microbianas em populações mistas.

3. OBJETIVO GERAL

Avaliação da qualidade microbiológica e físico-química de kefir e da atividade biológica da bebida, de *Lactobacillus* spp. isolados de diferentes grãos e exopolissacarídeos.

3.1 Objetivos específicos

- i. Avaliar as características de diferentes grãos de kefir e de bebidas fermentadas.
 - a. Aumento da biomassa dos grãos de kefir de leite e de água açucarada de diferentes origens em função do tempo.
 - b. Organização microscópica dos grãos.
 - c. Características microbiológicas e físico-químicas de bebidas fermentadas.
 - d. Pesquisa da presença de EPS nas bebidas fermentadas por cromatografia líquida de exclusão molecular e determinação da massa molecular.

- ii. Produção e caracterização de exopolissacarídeos
 - a. Pesquisar estirpes produtoras de EPS entre *Lactobacillus* spp. isolados de grãos de kefir.
 - b. Extrair e avaliar a estrutura primária de EPS obtidos de grãos de kefir e das culturas de *Lactobacillus* spp. isolados dos mesmos.

- iii. Avaliação do efeito biológico de bebidas fermentadas e de exopolissacarídeos
 - a. Avaliar, *in vitro*, a atividade antagonista das bebidas contra alguns patógenos envolvidos em doenças transmitidas por alimentos.
 - b. Verificar o efeito de *Lactobacillus* spp. e de exopolissacarídeos sobre a adesão e/ou invasão de *Salmonella enteritidis* sorovar Enteritidis em células Caco-2/TC7.

- iv. Identificar os micro-organismos metabolicamente ativos nas diferentes bebidas fermentadas e aqueles que estão envolvidos na síntese de EPS, por análise transcriptômica.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Origem e manutenção dos grãos de kefir

Os grãos utilizados neste trabalho foram cultivados em duas matrizes alimentares, leite e água açucarada, conforme indicação da origem. Os grãos de kefir de leite foram provenientes das cidades de Curitiba, Divinópolis, Salvador e Viçosa, e codificados como KLCU, KLDI, KLSA e KLVI, respectivamente. Os grãos de kefir de água açucarada foram provenientes das cidades de Belo Horizonte, Curitiba, Salvador e Viçosa, e codificados como KABH, KACU, KASA e KAVI, respectivamente (Tabela 1). Todos os grãos avaliados foram obtidos de ambientes domésticos, exceto os grãos provenientes da cidade de Viçosa, que foram cedidos pelo Laboratório de Produtos Lácteos Fermentados do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa. Quando do recebimento dos grãos, todos estavam sendo cultivados no respectivo substrato há pelo menos dois anos ininterruptamente e permaneceram nas mesmas condições de cultivo durante todo o período de experimentação. Alíquotas de cada grão ressuspendidas em leite ou água açucarada foram mantidas a -86°C , no Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Micro-organismos, do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Tabela 1 – Origens dos grãos de kefir cultivados em leite e água açucarada.

| Origem do Grão | Kefir de leite | Kefir de água açucarada |
|----------------|----------------|-------------------------|
| Curitiba | x | x |
| Belo Horizonte | Não se aplica | x |
| Divinópolis | x | Não se aplica |
| Salvador | x | x |
| Viçosa | x | x |

Fonte: Zanirati et al. (2015).

4.2 Técnicas de processamento das bebidas fermentadas

O kefir de leite foi preparado utilizando leite em pó desnatado (Itambé, Minas Gerais) reconstituído com água destilada, na concentração de 10% p/v. O kefir de água açucarada foi preparado utilizando uma solução de açúcar mascavo (Vitapão, Minas Gerais) em água destilada (5% p/v). Os substratos foram esterilizados em temperatura de 121°C durante 15 minutos, resfriados a temperatura ambiente (25°C) e a eles foram adicionados os grãos de kefir na proporção de 3% p/v. As misturas foram incubadas por 24 horas a 25°C em incubadora B.O.D. (Thelga, no Laboratório de Genética de Molecular de Protozoários Parasitas) e em seguida, incubadas em temperatura de refrigeração, por mais 24 horas. Posteriormente, os grãos foram retirados por peneiramento e as bebidas fermentadas mantidas sob refrigeração (7°C) durante o armazenamento (Figura 4) (Farnorth, 2005).

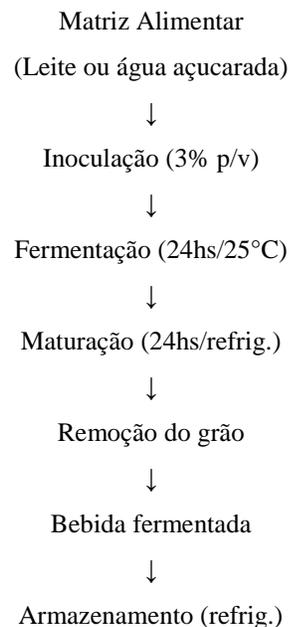


Figura 4 – Fluxograma do processamento de bebidas fermentadas.

4.3 Avaliação do aumento da biomassa dos grãos de kefir de leite e água açucarada de diferentes origens em função do tempo

Os grãos foram propagados nas matrizes alimentares que foram preparadas conforme descrito nas técnicas de produção das bebidas fermentadas. OS grãso foram adicionados às matrizes

mantendo-se a proporção de 3% p/v, por meio do balanço de massa e feita a pesagem dos mesmos a cada 48 horas, definindo-se assim cada cultivo (25°C/48 horas). A pesagem era realizada após a lavagem dos grãos com água destilada autoclavada e secagem do excesso de água em papel toalha. De acordo com o peso, se calculava o volume de substrato a ser adicionado posteriormente, mantendo-se a proporção de 3% p/v de grão.

4.4 Organização microscópica dos grãos de kefir

Os grãos de kefir ($\approx 0,5\text{g}$) cultivados em água com açúcar e leite foram fixados em 1mL de solução de glutaraldeído 4% em 0,1M de tampão fosfato (pH 7) por 4 horas a 25°C de acordo com Bottazzi e Bianchi (1980). Após fixação, os grãos foram armazenados em tampão fosfato e enviados para análise de microscopia eletrônica de varredura e de transmissão no Centro de Microscopia da Universidade Federal de Minas Gerais.

O preparo do material biológico para microscopia eletrônica de varredura foi realizado de acordo com o método ósmio-tanino-ósmio (OTO). Procedeu-se a remoção do tampão fosfato e as amostras foram lavadas três vezes (10 minutos cada) em tampão fosfato 0,1M. Fez-se a fixação secundária (tetróxido de ósmio 1% em tampão fosfato 0,1M) por 1 hora à temperatura ambiente. Fez-se a lavagem das amostras com tampão fosfato 0,1M (três vezes por 10 minutos cada). Removeu-se o tampão fosfato e imergiu-se as amostras em ácido tânico 1% em tampão fosfato 0,1M (20 minutos à temperatura ambiente). Fez-se a lavagem das amostras com tampão fosfato 0,1M (três – 10 minutos). Removeu-se o tampão fosfato e imergiu-se as amostras em fixador secundário (tetróxido de ósmio 1% em tampão fosfato 0,1M) por uma hora à temperatura ambiente. Removeu-se o fixador secundário e procedeu-se a lavagem três vezes (10 minutos cada) com água destilada (Botazzi e Bianchi, 1980, adaptada).

Após a fixação, as amostras foram desidratadas com álcool utilizando concentrações crescentes (35, 50, 70, 85 e 95%), sendo duas vezes de 10 minutos e a de 100% três vezes de 10 minutos. A secagem foi realizada em ponto crítico de CO₂. As amostras foram montadas em *stub* (diâmetro de 12,7mm, EMS) utilizando fita de carbono (8 x 20 mm, EMS) e cola de prata (EMS). A metalização foi realizada com 5nm de ouro. Posteriormente ao preparo, as amostras foram

analisadas no Microscópio Eletrônico de Varredura FEG - Quanta 200 Fei Tecnai, Oregon (Botazzi e Bianchi, 1980, adaptada).

O preparo do material biológico para microscopia eletrônica de transmissão foi realizado de acordo com o método ósmio-tanino-ósmio (OTO). Procedeu-se a remoção do tampão fosfato e as amostras foram lavadas três vezes (10 minutos cada) em tampão fosfato 0,1M. Fez-se a fixação secundária (tetróxido de ósmio 1% em tampão fosfato 0,1M) por 1 hora à temperatura ambiente. Repetiu-se esta etapa. Fez-se a lavagem das amostras com tampão fosfato 0,1M (três vezes – 10 minutos). Removeu-se o tampão fosfato e imergiu-se as amostras em acetato de uranila 2% em solução aquosa com 13,3% de sacarose, *overnight* à 4°C (Botazzi e Bianchi, 1980, adaptada).

Após a fixação, as amostras foram desidratadas com álcool utilizando concentrações crescentes (17, 35, 50, 70, 85 e 95%), sendo duas vezes de 10 minutos e a de 100% três vezes de 10 minutos. O *spurr* foi colocado em acetona de acordo com o esquema: durante 20 minutos (duas vezes); um *spurr* em duas acetonas, durante no mínimo duas horas; um *spurr* em uma acetona, durante no mínimo duas horas; dois *spurr* em uma acetona, *overnight*. Após a desidratação, o *spurr* foi colocado na estufa a 60°C durante 24 horas para polimerização. As amostras foram cortadas no micrótomo e posteriormente analisadas no Microscópio Eletrônico de Transmissão Tecnai G2-12 Spirit Biotwin da Marca Fei Tecnai (Botazzi e Bianchi, 1980, adaptada).

4.5 Produção de kefir de leite e água açucarada

A produção de kefir de leite foi realizada em esquema fatorial 4x4, em que os fatores foram a origem dos grãos de kefir (Curitiba, Salvador, Viçosa e Divinópolis) e tempo de armazenamento de armazenamento das bebidas fermentadas (1, 2, 7 e 28 dias). Os 16 tratamentos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições, totalizando 64 unidades experimentais (UE). As repetições foram constituídas por diferentes bateladas de processamento. As análises laboratoriais foram realizadas em duplicata, totalizando 128 análises.

A produção de kefir de água açucarada foi realizada em esquema fatorial 4x4, em que os fatores foram a origem dos grãos de kefir (Belo Horizonte, Curitiba, Salvador e Viçosa) e tempo de armazenamento (1, 2, 7 e 28 dias). Os 16 tratamentos foram dispostos em delineamento

inteiramente casualizado, com três repetições, totalizando 48 UE. As repetições foram constituídas por diferentes bateladas de processamento. As análises laboratoriais foram realizadas em duplicata, totalizando 96 análises.

4.6 Caracterização microbiológica e físico-química das bebidas fermentadas

A caracterização microbiológica das bebidas foi realizada por meio da enumeração de BAL em ágar MRS (Acumedia, Lansing), após incubação a 37°C durante 48 horas e leveduras em ágar Batata Dextrose, acidificado com ácido tartárico (BDA, Acumedia, Lansing), após incubação a 25°C durante 5 dias, em duplicatas (Brasil, 2003).

As análises físico-químicas realizadas em duplicata foram pH, acidez titulável, gordura, proteína e açúcares, no laboratório de Bromatologia de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, de acordo com a metodologia do Instituto Adolf Lutz (IAL, 1985). As análises foram realizadas durante o processo de fermentação (0, 24 e 48 horas) e após sete e 28 dias de armazenamento a 7°C, o que corresponde aos tempos 0, 1, 2, 7 e 28 dias, respectivamente.

As análises estatísticas foram realizadas no *software SAS*, versão 9.2 (*Statistical Analysis System - SAS Institute Inc.*, Cary, NC, USA), licenciado para a Universidade Federal de Viçosa, em nível de significância de 5%. Os efeitos da origem dos grãos de kefir, do tempo de armazenamento e da interação entre eles sobre as características de qualidade do kefir foram determinados por meio da análise de variância (ANOVA) e, quando significativos, as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey, de acordo com o seguinte modelo:

$$y_{ijk} = \mu + \tau_i + \gamma_j + \tau\gamma_{ij} + \varepsilon_{ijk}, \text{ em que:}$$

y_{ijk} = valor observado na origem do grão de kefir i , no tempo de armazenamento j e na repetição k ($k = 1, 2, 3$);

μ = média geral;

τ_i = efeito da origem do grão de kefir i ; $i = 1, 2, 3, 4$;

γ_j = efeito do tempo de armazenamento j ; $i = 1, 2, 3, 4$;

τ_{ij} = efeito da interação da origem do grão de kefir i com o tempo de armazenamento j ;

\mathcal{E}_{ijk} = erro experimental, pressuposto normal e independentemente distribuído com média zero e variância σ^2 , associado a cada valor observado de y_{ijk} . $\mathcal{E} \sim \text{NID}(0, \sigma^2)$

Posteriormente, foi realizada a análise de correlação entre as características de qualidade do kefir avaliadas, cujos coeficientes foram testados pelo teste *t de Student*.

4.7 Pesquisa da presença de exopolissacarídeos nas bebidas fermentadas por cromatografia líquida de exclusão molecular e determinação da massa molecular

As amostras utilizadas para a pesquisa da presença de exopolissacarídeos nas bebidas fermentadas por cromatografia líquida de exclusão molecular e determinação da massa molecular foram elaboradas com grãos provenientes de Curitiba e Salvador, por apresentar maior diversidade microbiana, conforme descrito por Zanirati e colaboradores (2015).

Após o período de 48 horas de fermentação, sendo 24 horas a 25°C e 24 horas a 7°C, as bebidas fermentadas de kefir de leite e de água açucarada foram centrifugadas a 6500rpm durante 10 minutos. Os precipitados foram descartados e os sobrenadantes foram utilizados para pesquisa de EPS. Os sobrenadantes foram filtrados duas vezes em filtro Chromafil Xtra (Macherey-Nagel, Düren) com poros de 0,45µm.

Conforme descrito por Piermaria (2008), a pesquisa foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), no cromatógrafo Water 1525 (Massachusetts), utilizando coluna de filtração em gel OH-Pak SB 805HQ (Shodex, Japão), detector de infra-vermelho, fase móvel composta por NO_3Na 0,1M com fluxo constante de 0,95mL/min. e pressão de 120-130psi. Injetou-se 20µL de solução de polissacarídeos de concentração de 0,5g/L e de cada bebida fermentada. A curva de calibração foi determinada com padrões de dextrano (Alo 2770, Phenomenex, Torrance), com massas moleculares de 3.800.000 a 97.000Da (APÊNDICE A).

4.8 Pesquisar e selecionar estirpes produtoras de EPS entre *Lactobacillus* spp. isolados de grãos de kefir

A seleção dos micro-organismos produtores de EPS foi realizada utilizando 52 linhagens do gênero *Lactobacillus*, que foram previamente isoladas de grãos de Kefir de diferentes localidades brasileiras, cultivados em leite e água açucarada e identificadas por Zanirati et al. (2015).

Os lactobacilos metabolicamente ativos, após repiques sucessivos (2x) em caldo MRS (Acumedia, Lansing) por 18 horas, em aerobiose, foram inoculados, por meio de estrias simples, em três diferentes meios: ágar MRS (Acumedia, Lansing), MRS modificado por substituição da glicose (2%) por sacarose (8%) (sMRS) ou lactose (5%) (lMRS). As placas foram incubadas em diferentes tensões de oxigênio (aerobiose e anaerobiose) e temperatura (25°C e 37°C), por 48 horas. Foram considerados produtores de EPS os isolados que apresentaram colônias viscosas nos meios acrescidos dos açúcares lactose ou sacarose (Paiva, 2013).

4.9 Extração e avaliação da estrutura primária de EPS obtidos de grãos de kefir e das culturas de *Lactobacillus* spp. isolados dos mesmos

4.9.1 Extração de EPS de grãos de kefir de leite

A extração de EPS dos grãos de kefir de leite (KLCU e KLSA), devido a maior diversidade microbiológica dos mesmos conforme descrito por Zanirati e colaboradores (2015), foi realizada por meio do método de precipitação alcoólica a frio, descrito por Rimada e Abraham (2001). Os grãos foram lavados com água destilada, escorridos, secos com papel toalha, pesados e adicionados em água destilada na proporção de 10% p/v. Aqueceu-se em banho-maria a 100°C durante cerca de 30 minutos. Durante este período, misturou-se a amostra para que os grãos se desfizessem. No final do aquecimento houve a formação de fio (filagem) (Figura 5A). A amostra foi centrifugada em temperatura ambiente por 15 minutos a 10.000 g utilizando centrífuga Avanti J25 (Beckman Coulter Inc., USA). O sobrenadante foi separado e a ele adicionou-se duas vezes o seu volume de etanol 96°GL frio (-20°C) para precipitação do EPS (Figura 5B). Esta solução se manteve a -20°C por 24 horas. Após este período, observa-se formação de gel que corresponde ao EPS hidratado (Figura 5C). Descartou-se o material suspenso (EPS associado a

proteínas) (Figura 5D). O EPS precipitado foi separado por centrifugação a 4°C durante 20 minutos a 10.062g e suspenso em duas vezes o volume de água quente. Repetiu-se o processo de precipitação, dissolução e centrifugação para eliminar resíduos de carboidratos e proteína. Separou-se uma alíquota para determinar o conteúdo de açúcares totais, a ausência de carboidratos de baixa massa molecular e proteínas. Finalmente, as soluções foram liofilizadas e armazenadas em temperatura ambiente (Figura 5E).

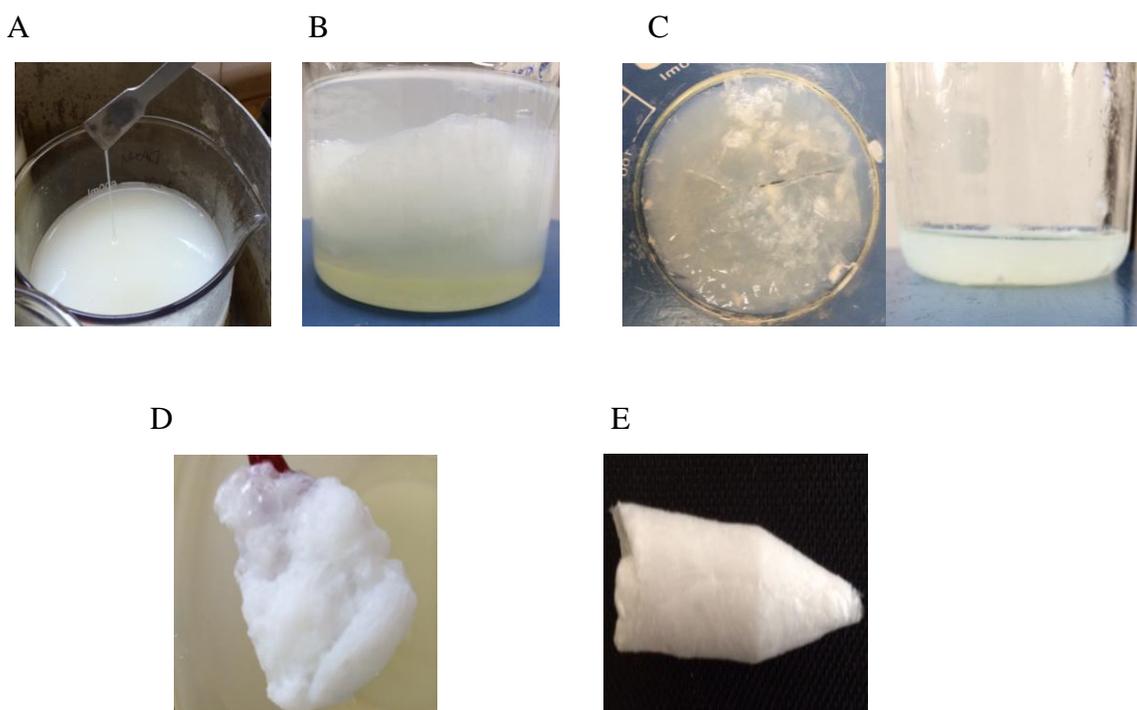


Figura 5 - Extração de exopolissacarídeos de grãos de kefir de leite de Salvador. Figuras: (A) ponto final de aquecimento dos grãos, quando se observa formação de fio; (B) precipitação alcoólica a frio de EPS; (C) gelificação após 24h a -20°C; (D) EPS precipitado impuro que é descartado; (E) EPS liofilizado.

A extração de EPS dos grãos de água (KACU e KASA), iniciou-se com a solubilização dos mesmos em NaOH 0,1M, separação das células de micro-organismos por centrifugação e correção do pH para o valor de 7,0 com ácido láctico estéril 0,1M.

4.9.2 Extração de EPS de culturas de *Lactobacillus* spp. isolados de grãos de kefir

Os lactobacilos produtores de EPS metabolicamente ativos, após repiques sucessivos, foram ativados, duas vezes, em caldo MRS (Acumedia, Lansing) por 18 horas, em aerobiose. Os micro-organismos ativos foram inoculados (1,5% v/v) em caldo sMRS incubados em câmara de

anaerobiose a 37°C por 48 horas. Foram utilizados dois frascos contendo 200mL de meio cada um. O EPS produzido em um frasco foi destinado à caracterização estrutural e o do outro para a determinação do rendimento da produção (massa (g)) (Paiva, 2013).

Após o período de incubação, as células foram retiradas por centrifugação. Os EPS, presentes no sobrenadante, foram extraídos por precipitação em dois volumes de etanol (95% v/v, Synth, Diadema), acondicionamento a -20°C por 12 horas e centrifugação para descarte do sobrenadante (Rimada e Abraham, 2001).

Os precipitados foram suspensos em água Mili-Q, e re-precipitados em etanol mais duas vezes, para remoção de resíduos de proteína e carboidratos simples. As amostras destinadas a caracterização estrutural foram liofilizadas (Liotop K105) e a massa, expressa em grama por litro de sMRS, foi determinada após secagem a 37°C por 96 horas (Paiva, 2013).

4.10 Determinação da pureza dos EPS produzidos por *Lactobacillus* spp.

A pureza foi determinada por meio da pesquisa de resíduos de proteína e carboidratos de baixa massa molecular nos EPS produzidos por *Lactobacillus* spp.

4.10.1 Pesquisa de resíduos de proteína

A pesquisa de resíduos de proteína foi feita pelo método colorimétrico de Bradford, que consiste em comparar as amostras na concentração de 1%, com a curva padrão de albumina nas concentrações 0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1,0% (Bradford, 1976), por espectrofotometria (Biotek – Synerg HT) a um comprimento de onda de 590nm (Apêndice B).

4.10.2 Pesquisa de monossacarídeos

A pesquisa de carboidratos simples foi feita por meio de cromatografia de camada delgada (Pasto e Johnson, 2003), em placas de sílica gel 60 de 0,20 mm de espessura (Merck, Alemanha), utilizando padrões de glicose, galactose e sacarose (solução 1% p/v); fase móvel composta por uma solução de n-propanol, ácido acético e água, em uma proporção de 70:20:10,

respectivamente. A solução reveladora foi composta por ácido p-aminobenzoico (0,7%) e ácido fosfórico (3%) em etanol.

4.11 Quantificação de carboidratos totais

A quantificação de carboidratos das amostras (soluções 1% p/v) foi realizada pelo método da Antrona (Turula et al., 2010). Os carboidratos totais foram quantificados por espectrofotometria (Biotek – Synerg HT) a um comprimento de onda de 620 nm, utilizando uma curva padrão de glicose nas concentrações 0, 100, 200, 300, 400 e 500µg/mL (Apêndice C).

4.12 Caracterização da estrutura primária de EPS por espectroscopia de ressonância magnética nuclear

As análises foram realizadas em espectrômetro (Bruker Avance III), na frequência base de 400 MHz para o núcleo de hidrogênio, em sonda de detecção inversa multinuclear 5 mm, equipada com gradiente de campo, no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear de Alta Resolução (LAREMAR), do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais.

Os EPS liofilizados foram solubilizados em dimetil sulfóxido deuterado (DMSO, Sigma-Aldrich, USA), os espectros foram obtidos a 70°C, com o tetrametilsilano (TMS) utilizado como referência externa e os deslocamentos químicos expressos em unidade de delta (δ).

Foram realizados experimentos uni (RMN de ^1H) e bidimensionais ($^1\text{H}/^1\text{H}$ e $^1\text{H}/^{13}\text{C}$) na tentativa de propor a estrutura primária destes EPS. A intensidade das ligações foi verificada por meio da integração da área abaixo do espectro (sinal) (Adaptada de Paiva et al., 2016).

4.13 Avaliação, *in vitro*, da atividade antagonista das bebidas contra alguns patógenos envolvidos em doenças transmitidas por alimentos

As bebidas foram utilizadas na determinação da atividade antimicrobiana, segundo metodologia adaptada de Silva et al. (2009). Os micro-organismos reveladores *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *Listeria monocytogenes* (ATCC15313), *Shigella*

flexneri (ATCC 12022), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) e *Salmonella* Typhimurium (ATCC14028) foram cultivados em caldo Brain Heart Infusion (BHI, Himedia, Mumbai) até a densidade celular de 10^8 UFC/mL. Cem microlitros das suspensões destes micro-organismos alvos foram uniformemente espalhados sobre placas contendo ágar MRS (Acumedia, Lansing) e ágar Brain Heart Infusion (BHI, Himedia, Mumbai) e poços de 6mm de diâmetro foram escavados com um tubo de plástico estéril. As alíquotas de 50 μ L das bebidas fermentadas originais, das bebidas fermentadas neutralizadas com solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1M (pH 7,0) e também das bebidas fermentadas esterilizadas por filtração (0,45 μ m), foram transferidas para os poços nas placas de ágar previamente inoculadas com os micro-organismos alvo. As placas foram incubadas a 37°C, em aerobiose e a presença ou ausência de halo de inibição foi verificada após 48 horas. Todas as determinações foram realizadas em duplicata.

4.14 Avaliação do efeito de *Lactobacillus* spp. e de exopolissacarídeos sobre a adesão e/ou invasão de *Salmonella enteritidis* sorovar Enteritidis em células Caco-2/TC-7

4.14.1 Determinação da adesão e invasão de *Salmonella enteritidis* sorovar Enteritidis em células Caco-2/TC-7

Os ensaios em cultivo celular foram realizados no Laboratório de Microbiologia do Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina. Os testes foram realizados em células Caco-2/TC-7, formadoras de monocamada, em placas de cultura de 24 poços (SPL Life Sciences, Korea). Após confluência, as células foram lavadas três vezes com solução tampão fosfato salino (PBS) estéril (pH 7,2) e em seguida 50 μ L de suspensão de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis ($1,5 \times 10^7$ UFC/mL) e 0,45mL do meio Dulbecco MEM (DMEM, Gibco Brl Life Technologies, Rockville) foram adicionados a cada poço (controle do processo de adesão) que continha cerca de 10^6 células por poço, alcançando a multiplicidade de infecção (MOI) de *S. Enteritidis* em relação as células de 1,5:1. As placas foram incubadas em estufa durante uma hora a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. Após esse tempo, as células destinadas ao ensaio de adesão foram lavadas três vezes com PBS estéril e lisadas pela adição de água Milli-Q estéril. A seguir, as suspensões obtidas foram diluídas e alíquotas apropriadas foram plaqueadas em ágar nutriente

(Biokar Diagnostics, Allone) para determinar o número de células viáveis de *Salmonella* aderidas às células Caco2/TC-7 (Golowczyc et al., 2007; Londero et al., 2014).

A invasão de *S. Enteritidis* foi medida por enumeração apenas de bactérias localizadas dentro das células Caco-2/TC-7. Para tanto, a monocamada foi lavada e incubada por mais uma hora com *S. Enteritidis*, conforme descrição anterior. Em seguida, adicionou-se 0,5mL de gentamicina (100 µg/mL em PBS) a cada poço e a monocamada foi incubada novamente durante uma hora a 37°C antes da lise das células e contagem do número de células viáveis (controle do processo de invasão) (Golowczyc et al., 2007; Londero et al., 2014).

4.14.2 Avaliação do efeito de ação protetora de *Lactobacillus* spp. e de exopolissacarídeos sobre a adesão e/ou invasão de *Salmonella enteritidis* sorovar Enteritidis em células Caco-2/TC-7

O efeito protetor foi avaliado pelos seguintes experimentos: i) as células Caco2/TC-7 foram pré-incubadas com estirpes que apresentaram MOI médio de 50:1, durante uma hora a 37°C. As estirpes estudadas foram *L. satsumensis* 10P; *L. satsumensis* 10P2; *L. satsumensis* 18P; *L. perolens* 11P3; *L. perolens* 17P2 e *L. mali* 19U, cujas células foram suspensas em DMEM e, em seguida, inoculadas com *S. Enteritidis*, de acordo com o ensaio controle. ii) as células Caco2/TC-7 foram pré-incubadas durante uma hora a 37°C com cada EPS produzido pelos isolados citados acima, na concentração de 1000 mg/L e, em seguida, inoculadas com *S. Enteritidis*, de acordo com os ensaios controles; iii) as células Caco2/TC-7 foram pré-incubadas durante uma hora a 37°C com cada EPS extraído dos grãos de kefir de leite e de água açucarada de Curitiba e Salvador (KLCU, KLSA, KACU e KASA), na concentração de 1000mg/L, e em seguida, inoculadas com *S. Enteritidis*, de acordo com os ensaios controles descritos inicialmente (adaptada de Golowczyc et al., 2007 e Londero et al., 2014).

4.15 Identificar os micro-organismos metabolicamente ativos nas diferentes bebidas fermentadas e aqueles que estão envolvidos na síntese de EPS, por análise transcriptômica

A análise transcriptômica foi realizada nas bebidas fermentadas de grãos de kefir provenientes das cidades de Curitiba e Salvador (KLCU, KLSA, KACU e KASA), cultivados em leite em pó

desnatado reconstituído (10%p/v) e em solução de água com açúcar mascavo (5%p/v), conforme descrição anterior.

Dez mililitros das amostras de kefir de leite foi centrifugado por 10 minutos a 10.000 x g na centrífuga marca Eppendorf 5430R. Os *pellets* de kefir de água foram obtidos a partir da centrifugação de 40mL da bebida na centrífuga marca Jouan B4. Os *pellets* foram ressuspensos em 40mL de citrato de trissódico 2% e centrifugado a 4.000 x g. Os *pellets* foram transferidos para tubos Eppendorf contendo 0,3g de *beads* de zircônio, lisados no equipamento MP Fastprep-24 e o RNA foi extraído utilizando-se kit de extração da marca Qiagen (RNAeasy n.74104), segundo recomendações do fabricante (Leite et al., 2013b, adaptada). O RNA extraído foi armazenado a -80°C até a elaboração das bibliotecas.

As amostras foram divididas em duas partes, sendo uma destinada a análise de bactérias e a outra a de leveduras. A amostra bacteriana foi tratada com o kit de depleção de rRNA, da marca Illumina (Illumina, 2014a) e a amostra de levedura foi enriquecida com cauda poliA (Illumina, 2014b).

As bibliotecas foram elaboradas de acordo com protocolo de sequenciamento de amostras de RNA (Illumina, 2014b), que consiste nas etapas de purificação e fragmentação de mRNA; síntese de primeira cadeia de cDNA; síntese da segunda cadeia de cDNA; reparação das extremidades; adenilação; ligação de adaptadores; amplificação; validação da biblioteca; normalização e *pool* das bibliotecas; e análise das bibliotecas no equipamento MiSeq Illumina.

As sequências de má qualidade e os adaptadores foram removidos no *software* Trimmomatic (Bolger et al., 2014) e posteriormente mapeados com os genomas de referência no *software* Bowtie2 (Langmead e Salzberg, 2012). A contagem dos *reads* mapeados em cada genoma de referência foi realizada no *software* BEDtools Multicov (Quinlan e Hall, 2010).

O próximo passo foi identificar as comunidades microbianas ativas nas bebidas fermentadas por meio de análise de similaridade dos *reads* transcritos com as sequências de nucleotídeos presentes no banco de dados, Refseq-genomic, do National Center for Biotechnology

Information (NCBI), que foi realizada no Genemark (Tang et al., 2015). Considerando que o *read* transcrito é similar ao de uma determinada espécie quando apresentou índice de identidade e cobertura superior a 95%. Quando o *read* apresentou índice inferior a 95% os mesmos foram considerados não classificados.

A identificação das prováveis enzimas envolvidas na síntese de exopolissacarídeos também foi realizada por meio de análise de similaridade dos *reads* transcritos montados, porém com as sequências de aminoácidos, no Genemark (Tang et al., 2015). Assim, foi possível prever os genes nos *contigs* e, posteriormente, identificar as enzimas/proteínas e consequentemente as espécies de micro-organismos às quais estas pertenciam por meio de pesquisa no banco de dados *Resource Protein Universal* (UniProt).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Aumento de biomassa dos grãos de kefir

Os grãos de kefir avaliados neste estudo apresentaram características macroscópicas similares aos circulantes em outras regiões do Brasil e em diferentes locais do mundo (Rubio et al., 1993; Guzel-Seydim et al., 2005; Jianzhong et al., 2009; Magalhães et al., 2010; Magalhães et al., 2011; Demirhan et al., 2013). Os grãos cultivados em leite eram pequenos, duros, de forma irregular, cor branca amarelada, e se assemelhavam a pedaços de couve-flor e os grãos cultivados em água açucarada eram formados por uma massa gelatinosa consistente, de cor amarela translúcida, formato irregular e tamanho variável (Figura 6).

O aumento da biomassa dos grãos de kefir está relacionado ao processo metabólico fermentativo da microbiota associada aos grãos de kefir. Desta forma, a velocidade de formação dos grãos é está diretamente relacionada ao rendimento da produção da bebida fermentada. Diante disto, avaliou-se o aumento da biomassa de grãos de kefir de leite e de água açucarada, de diferentes origens.



Figura 6 - Grãos de kefir de leite, à esquerda, e de água açucarada, à direita, originados da cidade de Salvador.

Na análise de aumento de biomassa fresca dos grãos de kefir de leite ao longo de sucessivos cultivos, a partir de cinco gramas de grãos, foi observado um perfil de crescimento similar para os quatro grãos avaliados, não havendo diferença entre os pesos totais dos grãos ao longo do tempo ($p=0,5321$) (Tabela 2). Observou-se duplicação da biomassa após três cultivos, demonstrando ser este um processo lento. Sugere-se que isto ocorra em função da maior complexidade da via metabólica da lactose se comparada a da glicose, o que justifica o aumento da biomassa ser lento.

Tabela 2 - Aumento da biomassa (grama) de grãos de kefir de leite de diferentes origens em função de cada cultivo (2 dias cada) ($n=3$)

| Origem* | Número de Cultivos | | | |
|---------|--------------------|--------------|--------------|---------------|
| | 0 | 3 | 6 | 9 |
| KLCU | 5,00 ± 0,00 | 8,52 ± 1,40 | 17,38 ± 4,04 | 28,96 ± 5,88 |
| KLDI | 5,00 ± 0,00 | 11,34 ± 0,11 | 19,40 ± 4,33 | 32,26 ± 11,02 |
| KLSA | 5,00 ± 0,00 | 8,38 ± 0,42 | 13,40 ± 2,04 | 25,97 ± 0,28 |
| KLVI | 5,00 ± 0,00 | 10,32 ± 0,43 | 22,64 ± 2,28 | 35,74 ± 6,31 |

*KLCU – Curitiba; KLDI – Divinópolis; KLSA – Salvador; KLVI – Viçosa

A velocidade de aumento da biomassa pode estar relacionada a microbiota presente no grão e a capacidade da mesma de produzir EPS. Os micro-organismos presentes nos grãos de leite são em sua maioria constituídos por *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus kefir*, exceto o grão de Viçosa que possui unicamente a presença de *Leuconostoc mesenteroides* (Zanirati et al., 2015).

As condições de cultivo dos grãos, como o meio de cultivo, tempo e temperatura de fermentação podem influenciar no desenvolvimento dos mesmos (Farnorth, 2005). Em termos de composição centesimal, o leite apresenta 5,3g de carboidratos; 3,47g de proteína; 0,82g de cinza; 0,09g de lipídios; 136,3mg de cálcio; 10,9mg de magnésio; e 2,5mg de colesterol (NEPA, 2011).

Guzel-Seydim e colaboradores (2011), analisando o efeito da adição de isolado proteico de soro (2%), inulina (2%) e com uma atmosfera de incubação dos grãos de 6% de CO₂, verificaram que a adição de isolado proteico aumentou a biomassa dos grãos em 223%. A presença de inulina e do CO₂ não influenciou o desenvolvimento da biomassa.

Na análise de aumento de biomassa dos grãos de kefir de água açucarada, o grão que apresentou maior crescimento foi o de Curitiba, seguido pelo de Salvador, Viçosa e Belo Horizonte (p<0,0001) (Tabela 3). Isto pode ser devido à maior diversidade de micro-organismos presentes nos grãos de Curitiba (*L. perolens*, *L. lactis*, *L. satsumensis*, *L. casei*, *L. parafarraginis*) e Salvador (6 = *L. casei*, *L. perolens*, *L. satsumensis*, *L. lactis*, *Oenococcus oeni*, *L. parafarraginis*) se comparados aos de Viçosa (2 = *L. mali*, *L. casei*) e Belo Horizonte (2 = *L. casei*, *L. diolivorans*), embora a produção de EPS também esteja relacionada a presença de leveduras (Zanirati et al., 2012; Zanirati et al., 2015).

Tabela 3 – Aumento da biomassa (grama) de grãos de kefir de água açucarada de diferentes origens em função de cada cultivo (2 dias cada) (n=3)

| Origem* | Cultivos | | | | |
|---------|------------|--------------|--------------|--------------|----------------|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| KABH | 5,00 ± 0,0 | 7,04 ± 1,23 | 10,27 ± 1,82 | 18,05 ± 1,68 | 38,00 ± 6,22 |
| KACU | 5,00 ± 0,0 | 11,32 ± 2,13 | 25,62 ± 8,65 | 58,14 ± 18,0 | 130,25 ± 20,82 |
| KASA | 5,00 ± 0,0 | 10,35 ± 1,51 | 19,85 ± 2,96 | 46,65 ± 9,50 | 113,86 ± 8,72 |
| KAVI | 5,00 ± 0,0 | 8,54 ± 0,91 | 13,40 ± 2,10 | 26,91 ± 6,94 | 40,75 ± 6,30 |

* KABH – Belo Horizonte; KACU – Curitiba; KASA – Salvador; KAVI – Viçosa

Inicialmente, pesou-se cinco gramas de grãos de kefir de água de diferentes origens. Foi necessário apenas um cultivo, para que os grãos de Curitiba e Salvador duplicassem o peso e dois cultivos para os grãos de Viçosa e Belo Horizonte para alcançarem o mesmo resultado. Isso demonstra uma elevada taxa de crescimento, quando comparado com grãos originados de La

Plata (Argentina), para o qual são necessários dez cultivos para a duplicação da massa (Piermaria, 2008).

O açúcar mascavo possui em sua composição centesimal (100g) 94,5% de carboidratos e outros componentes que podem auxiliar no crescimento dos micro-organismos como 1,4% de cinzas; 0,8% de proteína; 0,127% de cálcio; e 0,08% de magnésio (NEPA, 2011).

Estudos consideram a adição de sais minerais como o cálcio, ferro, magnésio e zinco importante para o aumento da biomassa de grãos de kefir. Demirhan e colaboradores (2011), verificaram que o óxido de magnésio (MgO), na concentração de 0,30 g/L de Mg^{+2} , proporcionou um aumento de 46,3% de biomassa. Enquanto Payer et al. (2011), com a mesma concentração, verificaram um aumento de 23% da biomassa.

Outros fatores que influenciam no aumento de biomassa são os produtos gerados pelos micro-organismos, como por exemplo, os EPS dextrano e kefirano. O dextrano é um polissacarídeo de glicose, produzido por micro-organismos que excretam a enzima dextranosacarase na presença de sacarose, que constitui a fonte de carboidrato do kefir de água açucarada. E o kefirano é um polissacarídeo glucogalactano ramificado, presente no kefir de leite (De Vuyst e Degeest, 1999).

Quando se compara o aumento da biomassa dos grãos de kefir de água com os de leite, observa-se que o de água duplica de modo mais rápido que o de leite. Sugere-se que isto ocorra em função da fonte de carbono, ou seja, da menor complexidade da via metabólica da glicose se comparada a lactose. Pode ser também dependente das estirpes de bactérias e leveduras presentes no grão e que irão afetar no crescimento do mesmo.

5.2 Microscopia eletrônica de grãos de kefir

A distribuição dos micro-organismos dentro dos grãos de kefir tem sido estudada e os resultados são controversos. Há pesquisadores que apoiam a hipótese de que as leveduras são geralmente encontradas na zona interior e intermediária do grão, com bactérias em forma de bastonete predominantemente na superfície dos grãos (Bottazzi e Bianchi, 1980). Outros investigadores

descrevem que as leveduras estão distribuídas na superfície e no interior dos grãos (Guzel-Seydim et al., 2005; Magalhães et al., 2011).

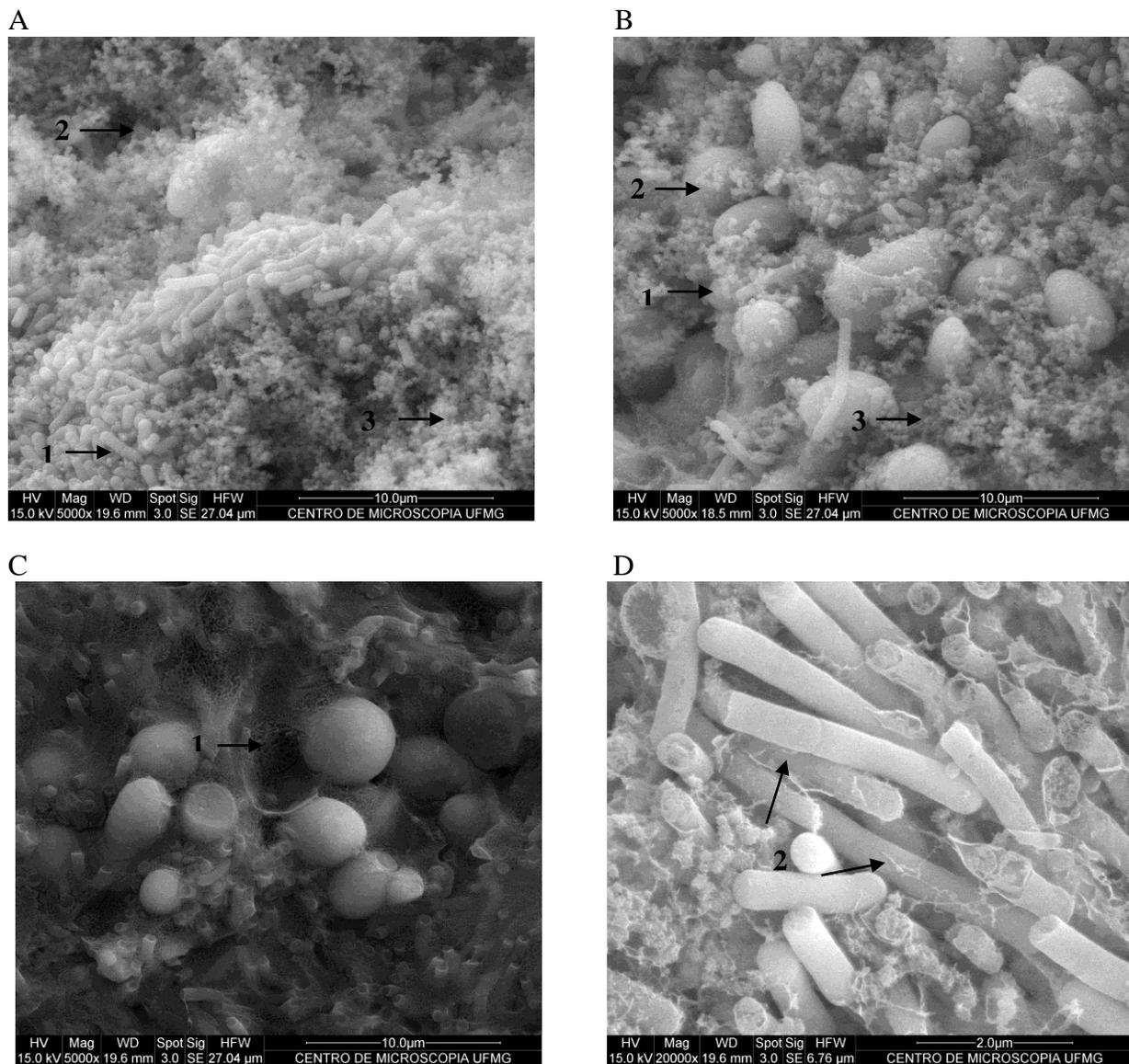


Figura 7 - Microscopia eletrônica de varredura da porção externa e interna de grãos de kefir de leite do Brasil.

Micrografia A e B: superfície externa de grãos de KLCU e KLSA, respectivamente. 1 - Bacilo, 2 – Levedura e 3 – material granular: proteína coagulada. Micrografia C e D: porção interna: grãos de KLSA fraturado. Presença de bactérias (bastonetes longos e curtos; bacilos em pares e leveduras). 1 – Porosidade. 2 - Material fibrilar: EPS kefirano.

Na microscopia eletrônica de varredura dos grãos cultivados em leite verificamos a presença de leveduras, tanto na superfície (Figura 7 A e B) quanto na porção interna (Figura 7 C e D), sendo que a porção interna dos grãos foi obtida por meio da fratura criogênica dos mesmos. Além

disso, na superfície dos grãos de leite foram observadas bactérias com morfologia bacilar curta e longa (Figura 7A - 1), leveduras (Figura 7A - 2) e material granular (Figura 7A - 3), que foi descrito como proteína coagulada por Leite et al. (2013a). Observamos na superfície dos grãos de leite de Salvador um maior número de leveduras do que nos grãos de kefir de Curitiba (Figura 7B). Observamos na porção interna dos grãos de leite (Figura 7C) bastonetes longos e curtos, diplobacilos, leveduras e, principalmente, uma estrutura fibrilar, porosa, na qual os micro-organismos estão aderidos, semelhante ao que foi observado por outros autores (Figura 7D) (Botazzi e Bianchi, 1980; Marshall et al., 1984; Guzel-Seydim et al., 2005; Jianzhong et al., 2009; Magalhães et al., 2011). As leveduras encontradas na porção interna dos grãos se mostraram de modo agrupado (Figura 8A) e/ou circundadas por bactérias (Figura 8B). Assim como relatado por Guzel-Seydim et al. (2005), não foi observada a presença de cocos nos grãos de kefir de leite circulantes no Brasil e avaliados neste estudo.

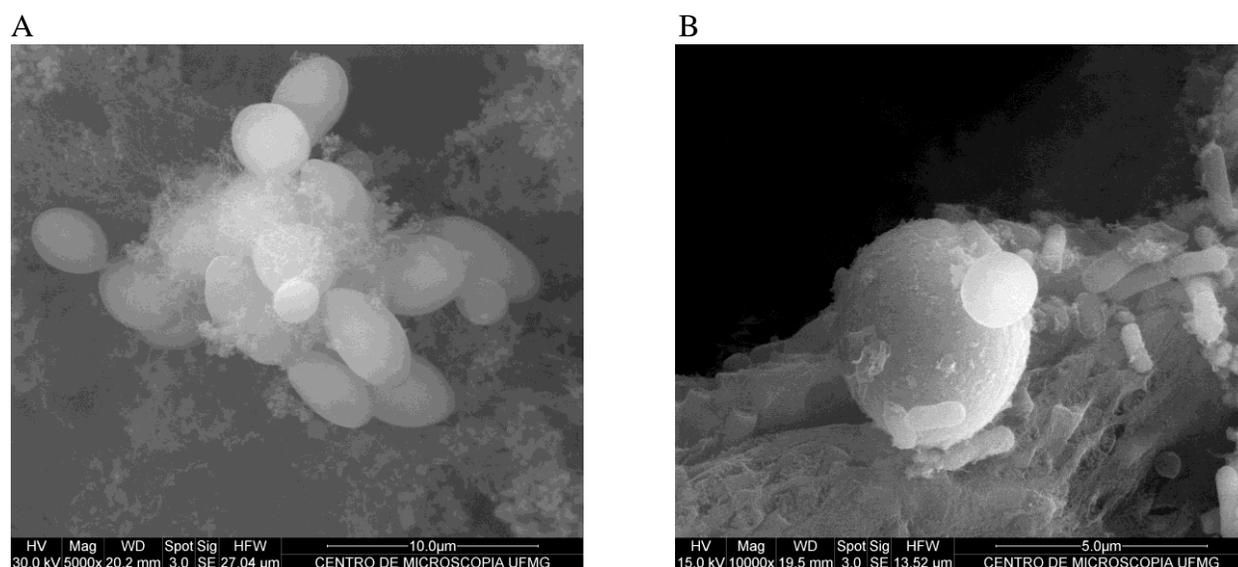


Figura 8 - Microscopia eletrônica de varredura de grãos de kefir de leite do Brasil. Micrografia A: agrupamento de leveduras. Micrografia B: levedura em brotamento rodeada por bactérias.

Os grãos de kefir de água apresentaram bactérias e leveduras aderidas a uma matriz que recobre toda a superfície do grão (Figura 9A) e também está presente na porção interna (Figura 9B). Esta matriz, externamente possui aparência lisa e sem formação de poros e, internamente, uma estrutura esponjosa, similar ao descrito por Moinas et al. (1980). Os micro-organismos (bactérias e leveduras) estão presentes tanto na superfície (Figura 9, A e B) quanto na parte interna dos

grãos (Figura 9, C e D), assim como nos grãos de leite avaliados neste trabalho. As leveduras também se apresentaram com formato esférico e alongado (curto e longo) (Figura 9C). Assim como observado por Magalhães et al. (2010), a densidade microbiana diminui à medida em que se encaminha para o centro do grão, com a predominância de leveduras na porção mais externa (Figura 9C).

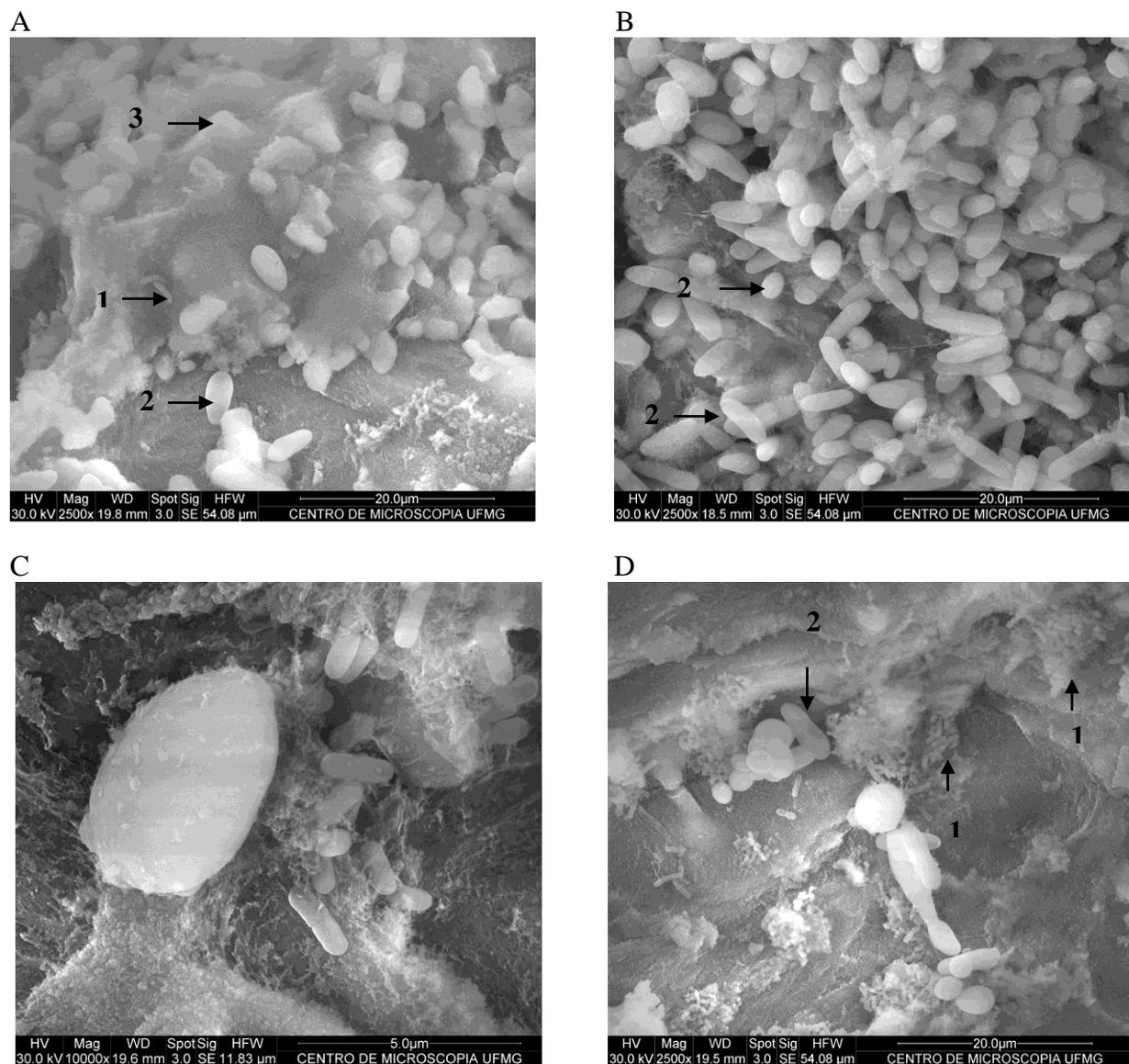


Figura 9 - Microscopia eletrônica de varredura de grãos de kefir de água açucarada do Brasil. Micrografia A: superfície externa de grão de KASA. 1 - Bacilo, 2 – Levedura e 3 – Cobertura polissacarídea. Micrografia B: leveduras com morfologia alongada e esférica. Micrografia C: bactérias e leveduras aderidas ao EPS. Micrografia D: Agrupamento de micro-organismos na porção interna do grão. 1-Agrupamento de bacilos, 2 diferentes morfologias de leveduras.

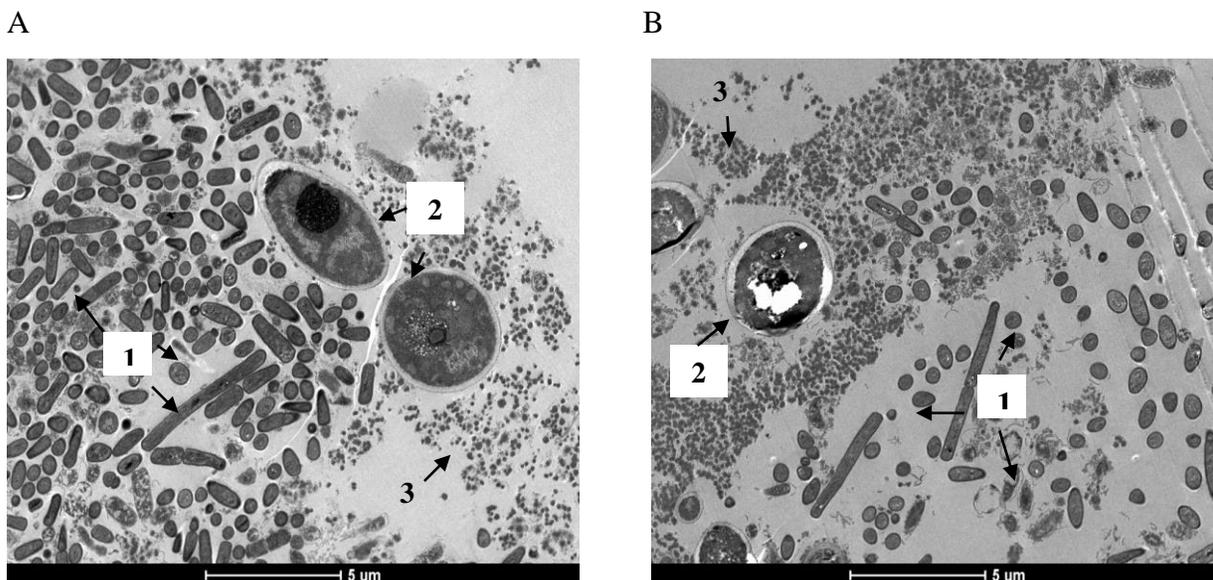


Figura 10 - Microscopia eletrônica de transmissão de grãos de kefir de leite do Brasil. Micrografia A e B: KLCU e KLSA, respectivamente. 1 - Bacilo, 2 - Levedura e 3 - material granular: proteína coagulada.

Os achados da microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram confirmados pela microscopia eletrônica de transmissão (MET). Verificou-se que os grãos de kefir de leite compreendem uma cultura mista de bactérias e leveduras (Figura 10 A), com a presença de bastonetes longos e curtos (Figura 11, A e B) e leveduras com formato esférico e alongado (Figura 11, C e D). A microbiota presente nos grãos, no momento da fixação, apresentava-se metabolicamente ativa, o que pode ser evidenciado pela presença de bactérias em processo de duplicação (Figura 12 A) e leveduras em brotamento (Figura 12 B).

As observações por MET podem mostrar a associação da microbiota presente no grão de kefir. Verificou-se que os grãos de kefir compreendem uma cultura mista de bactérias e leveduras (Figura 10A), com a presença de bastonetes longos e curtos, com corte na posição longitudinal (Figura 10 A e B); e leveduras com formato esférico e alongado (Figura 10 C e D), sendo estes resultados semelhantes aos encontrados por Ismaiel et al. (2011).

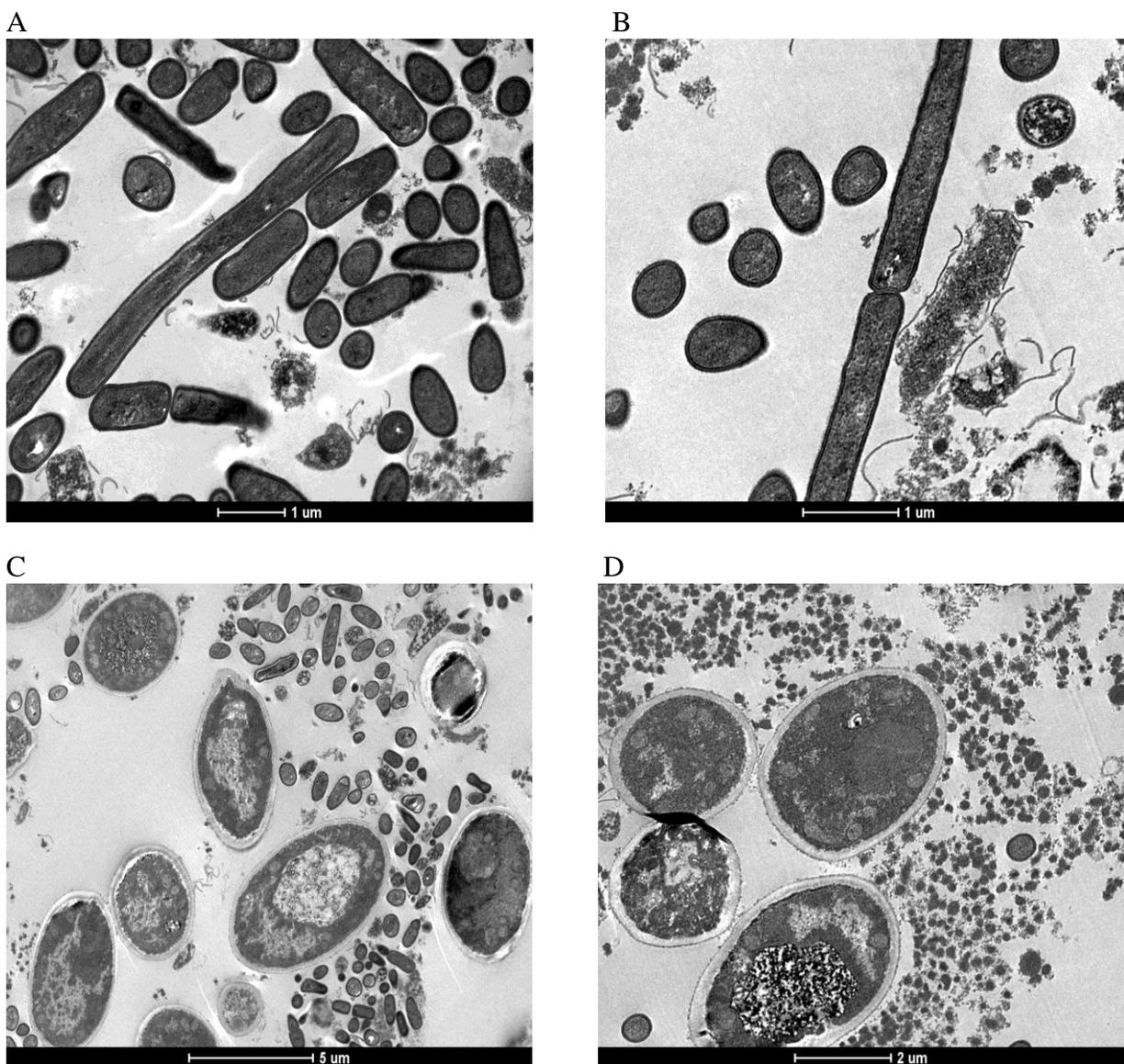


Figura 11 - Microscopia eletrônica de transmissão de grãos de kefir de leite do Brasil, KLCU e KLSA, respectivamente.

Micrografia A e B: Presença de bastonetes longos e curtos, com corte longitudinal e transversal. Micrografia C e D: Leveduras com formato esférico e alongado.

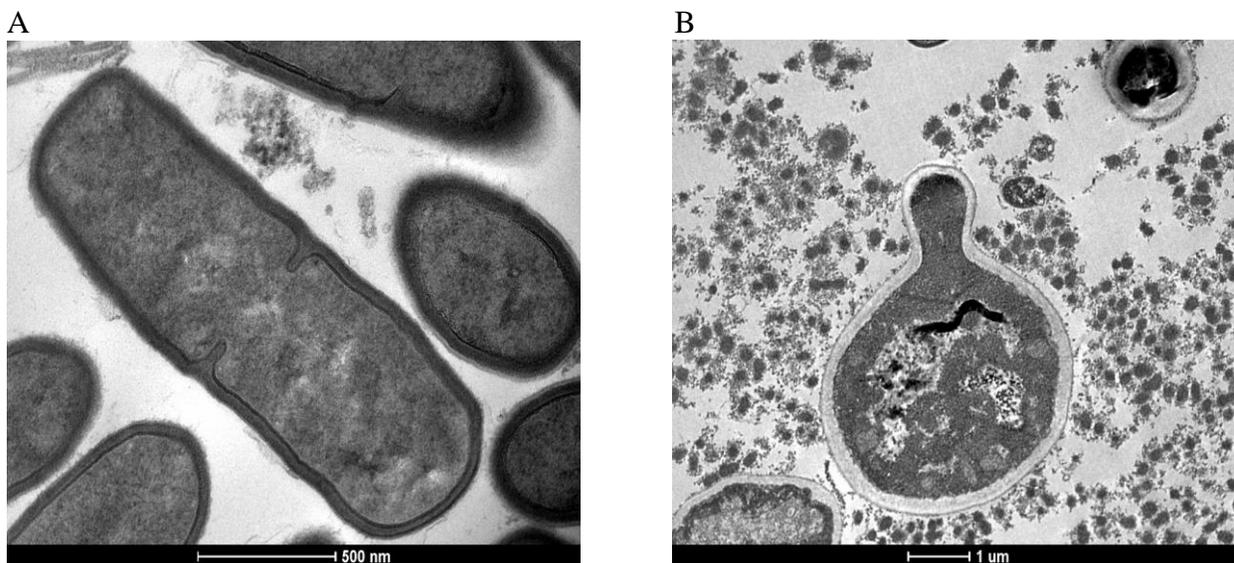


Figura 12 – Micro-organismos metabolicamente ativos em grãos de kefir de leite do Brasil, por microscopia eletrônica de transmissão.

Micrografia A e B: Grãos metabolicamente ativos, devido à presença de bactérias em processo de duplicação e leveduras em brotamento, respectivamente.

Há algum tempo, vários pesquisadores têm estudado a distribuição dos micro-organismos dentro dos grãos de kefir por meio das técnicas de microscopia eletrônica e os resultados são, em sua maioria, muito parecidos, porém com pequenas variações entre grãos de diferentes locais do mundo, decorrentes das diversas maneiras de processar e/ou armazenar esses grãos. Bottazzi e Bianchi (1980) observaram que a microbiota dos grãos de kefir de leite se concentrava mais na superfície do que nas porções mais internas e que bactérias estavam em maior número que leveduras. Esses autores, assim como Moinas et al. (1980), que estudaram grãos de kefir de água açucarada, verificaram a presença de uma estrutura esponjosa fibrilar formando uma rede no centro dos grãos e mais compacta nas bordas. Marshall et al. (1984) descreveram a presença de estruturas folhosas formadas por carboidratos nos grãos e formas cilíndricas embebidas nessa matriz. Rea et al (1996) verificaram não só uma variação na distribuição dos micro-organismos entre o interior e o exterior de grãos circulantes na Irlanda, como também variações entre diferentes cortes do interior ou do exterior. Formas bacterianas bacilares variadas e leveduras foram observadas em todas as amostras por esses autores. Em outro estudo, grãos de kefir de leite, também circulantes na Irlanda, foram divididos em três porções (interna, intermediária e externa) antes de serem analisados por microscopia eletrônica de varredura. Os autores

observaram bacilos (longos, curtos e curvos) e leveduras embebidos em um material fibrilar, esponjoso, ramificado e interconectado, que se distribuía por todo o grão. Bacilos foram encontrados em todas as porções dos grãos, no entanto, a população de leveduras foi menor na porção intermediária e inexistente no interior dos grãos. Além disso, os autores observaram bacilos longos e curvos mais no interior dos grãos, enquanto que na porção exterior predominaram os bacilos curtos (Guzel-Seydim et al., 2005). Jianzhong et al. (2009), Ismaiel et al. (2011) e Magalhães et al. (2011) encontraram esse mesmo padrão de distribuição de micro-organismos em grãos de kefir de leite provenientes do Tibet, Egito e Brasil, respectivamente.

De modo interessante neste estudo, a observação dos grãos de kefir por microscopia eletrônica de transmissão evidenciou a presença de uma camada recobrando a parede celular de algumas células bacterianas de formato bacilar (Figura 13), similar em aparência e espessura ao que Garrote e colaboradores (2004) evidenciaram em *Lactobacillus kefir*, isolado de grãos de kefir. A presença desta camada glicoproteica também já foi demonstrada em *Lactobacillus kefiranofaciens*, espécie presente nos grãos de kefir utilizados nesse estudo (Hynönen e Palva, 2013; Zanirati et al., 2015). Conforme descrito na literatura, os lactobacilos podem apresentar uma camada de superfície (camada S) que é um envelope celular proteico, ubiquamente encontrado em outras espécies bacterianas Gram positivo e negativo e em *Archaea*. Quando presente, ela forma a camada mais externa da célula, sendo ocasionalmente coberta apenas por cápsulas. A camada S é composta por numerosas subunidades idênticas de glicoproteínas, com massa molecular de 40-200kDa, que formam uma matriz regular e altamente porosa. As subunidades são mantidas em conjunto e ligadas à superfície subjacente das células através de interações covalentes e não-covalentes. Dentre as funções atribuídas para a camada S, destaca-se a diminuição da susceptibilidade a sucos gástricos e pancreáticos, e principalmente a mediação da adesão bacteriana a diferentes alvos, como por exemplo, outros micro-organismos, como os presentes nos grãos de kefir ou enterócitos (Hynönen e Palva, 2013). Outros experimentos devem ser feitos para se confirmar os resultados sugestivos da presença de camada S em bacilos presentes nos grãos de kefir avaliados neste estudo.

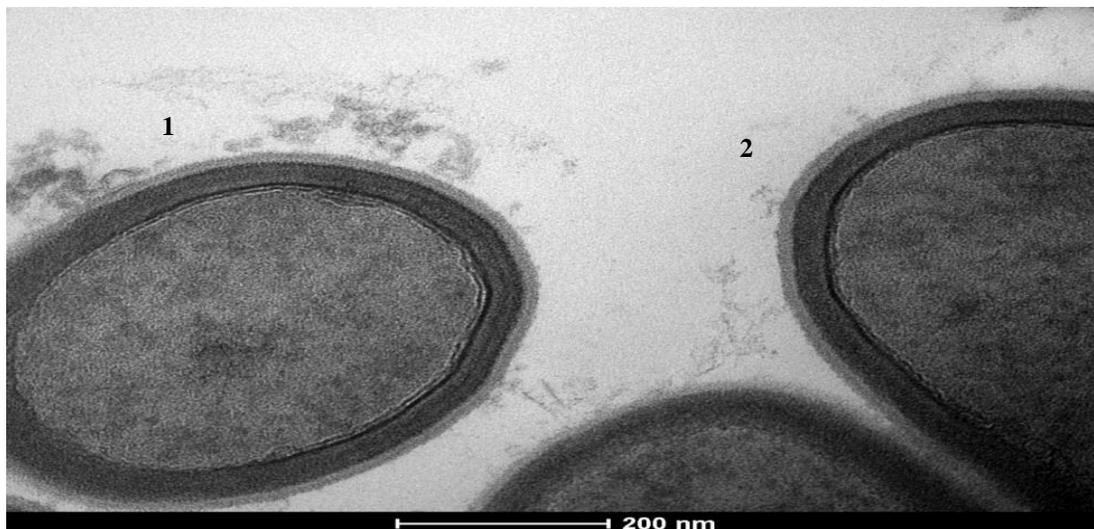


Figura 13 - Microscopia eletrônica de transmissão de grãos de kefir de leite do Brasil. Presença da camada S (cinza claro) em lactobacilos.

1 - Parede celular (cinza escuro), medindo 35,8nm, camada S (cinza claro), 14,6nm; 2 - Parede celular (cinza escuro), medindo 27,3nm, camada S (cinza claro), 17,3nm.

5.3 Caracterização microbiológica e físico-química de bebidas fermentadas preparados com grãos de kefir de leite de diferentes origens

Segundo o *Codex Alimentarius* (2010), os leites fermentados são caracterizados de acordo com a cultura iniciadora utilizada no processo de fermentação. As propriedades físico-químicas e a qualidade do kefir são afetadas pela qualidade microbiológica dos grãos de kefir, pela proporção de grão adicionado ao leite, pelas condições de incubação (tempo e temperatura), boas práticas de fabricação e temperatura de armazenamento (Altay et al., 2013).

A verificação dos efeitos da atividade que os grãos provenientes de diferentes regiões do Brasil produziram nas bebidas fermentadas, em termos microbiológicos e físico-químicos, foi avaliada por meio da enumeração de BAL e de leveduras, o pH, a acidez titulável e os teores de lactose e de proteína, durante o processo de fermentação com 24 e 48 horas (dias 1 e 2) e durante sete e 28 dias de armazenamento da bebida livre dos grãos, sob refrigeração (7°C). Não houve ($P > 0,05$) interação entre a origem dos grãos de kefir de leite e o tempo de armazenamento para todas as características avaliadas (Tabela 4).

Tabela 4 - Densidade de BAL e leveduras, expressa em log de UFC/mL, em amostras de kefir de leite produzidos com grãos de diferentes origens, ao longo do tempo (dias) (n=4)

| Micro-organismos | Amostras* | Tempo (dias) | | | | P value |
|---------------------------|-----------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------|
| | | 1 | 2 | 7 | 28 | |
| BAL (Log UFC/mL) | KLCU | 7,00 ± 0,82 a | 7,58 ± 0,49 a | 7,67 ± 0,47 a | 7,18 ± 0,88 a | 0,4890 |
| | KLDI | 7,22 ± 1,12 a | 7,57 ± 1,00 a | 7,33 ± 1,22 a | 6,93 ± 0,95 a | 0,8677 |
| | KLSA | 6,77 ± 0,37 a | 7,89 ± 0,88 a | 7,55 ± 1,00 a | 7,58 ± 0,87 a | 0,3009 |
| | KLVI | 6,84 ± 0,66 a | 7,35 ± 0,93 a | 7,47 ± 1,33 a | 6,78 ± 0,79 a | 0,6691 |
| Leveduras (Log UFC/mL) | KLCU | 5,41 ± 0,19 b | 5,97 ± 0,28 a | 6,05 ± 0,17 a | 6,25 ± 0,27 a | 0,0016 |
| | KLDI | 5,55 ± 0,32 b | 6,22 ± 0,22 a | 6,23 ± 0,25 a | 6,36 ± 0,25 a | 0,0039 |
| | KLSA | 5,78 ± 0,46 a | 6,12 ± 0,27 a | 6,19 ± 0,19 a | 6,13 ± 0,44 a | 0,4139 |
| | KLVI | 5,70 ± 0,60 a | 6,00 ± 0,47 a | 6,38 ± 0,43 a | 6,42 ± 0,55 a | 0,2097 |

*KLCU – Curitiba; KLDI – Divinópolis; KLSA – Salvador; KLVI – Viçosa

Letras minúsculas distintas nas linhas indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

A densidade de bactérias lácticas (UFC/mL) aumentou significativamente até a ordem de 10^7 UFC/mL nas primeiras 24 horas de fermentação, se mantendo constante até o 28º dia de armazenamento (Tabela 4). Em relação à tecnologia de alimentos, isto demonstra que o tempo de fermentação pode ser de 24 horas, uma vez que nesta condição, independente da origem, as bebidas atenderam ao padrão preconizado pela legislação nacional e internacional, que estabelecem o mínimo de 10^7 UFC/mL para bebidas fermentadas com alegações funcionais (Brasil, 2002; *Codex Alimentarius*, 2010).

Tanto em termos de BAL quanto de leveduras, os níveis populacionais encontrados nas diferentes bebidas analisadas estavam similares aos preconizados pelo *Codex Alimentarius*. O número de células viáveis de leveduras (UFC/mL) também não foi influenciado pela origem do grão de kefir ($P > 0,05$). Nas primeiras 24 horas de fermentação (dia 1), o número de leveduras atingiu a ordem de 10^5 UFC/mL, aumentando para 10^6 UFC/mL após 48 horas de fermentação (dia 2) nas amostras KLCU e KLDI e permanecendo assim até o 28º dia de armazenamento (Tabela 3). Os produtos do metabolismo das leveduras, combinado ao ácido láctico das bactérias, contribuem para o sabor refrescante do tradicional kefir. Além disso, uma população reduzida de levedura no produto pode diminuir um significativo problema na industrialização deste produto, uma vez que pode diminuir a liberação de gases produzidos por estes micro-organismos e, consequentemente, o inchaço das embalagens das bebidas durante o armazenamento (Guzel-Seydim et al., 2010).

Os valores de pH das bebidas variaram de 4,54 a 5,05, que é próximo ao pH 4,5, correspondente ao pH de parada da fermentação de leites fermentados (Oliveira e Damin, 2003). Nas primeiras 24 horas de fermentação (dia 1), o valor do pH dos diferentes kefir reduziu a aproximadamente 4,70, se mantendo constante ($P > 0,05$) até o 28º dia de armazenamento (Tabela 5). De acordo com Magra et al. (2012) a redução do pH ocorre inicialmente no processo de produção de kefir e é influenciada pela quantidade de grão. À medida que o tempo vai passando, o pH se mantém constante. Guzel-Seydim et al. (2010) também verificaram a redução gradual do pH até 4,6 durante o período de fermentação de 24 horas, sendo este tempo o suficiente para a formação de sabor e de substâncias aromáticas quando se utiliza uma taxa de inoculação de 2-5% de grãos de kefir, o que corresponde a quantidade utilizada neste trabalho (3% p/v).

Tabela 5 – Parâmetros físico-químicos de amostras de kefir de leite produzidos com grãos de diferentes origens, ao longo do tempo (dias) (n=4)

| Parâmetros | Amostras | Tempo (dias) | | | | P value |
|-------------------------------|----------|---------------|----------------|----------------|---------------|---------|
| | | 1 | 2 | 7 | 28 | |
| pH | KLCU | 4,59 ± 0,43 a | 4,68 ± 0,44 a | 4,62 ± 0,30 a | 4,54 ± 0,26 a | 0,9443 |
| | KLDI | 4,81 ± 0,27 a | 4,68 ± 0,30 a | 4,59 ± 0,26 a | 4,54 ± 0,19 a | 0,4948 |
| | KLSA | 5,05 ± 0,12 a | 4,97 ± 0,14 a | 4,86 ± 0,15 a | 4,76 ± 0,20 a | 0,0922 |
| | KLVI | 4,95 ± 0,19 a | 4,86 ± 0,23 a | 4,74 ± 0,16 a | 4,64 ± 0,22 a | 0,1975 |
| Acidez titulável ^a | KLCU | 0,74 ± 0,37 a | 0,83 ± 0,26 a | 1,02 ± 0,33 a | 1,30 ± 0,39 a | 0,1611 |
| | KLDI | 0,70 ± 0,20 b | 0,85 ± 0,16 ab | 0,98 ± 0,24 ab | 1,19 ± 0,25 a | 0,0416 |
| | KLSA | 0,59 ± 0,15 c | 0,70 ± 0,11 bc | 0,84 ± 0,03 ab | 1,02 ± 0,08 a | 0,0004 |
| | KLVI | 0,61 ± 0,14 c | 0,75 ± 0,11 bc | 0,88 ± 0,10 ab | 1,07 ± 0,13 a | 0,0012 |
| Lactose ^b | KLCU | ND** | 3,57 ± 0,40 a | 3,30 ± 0,34 a | 2,77 ± 0,49 a | 0,0623 |
| | KLDI | ND** | 3,32 ± 0,47 a | 3,15 ± 0,32 a | 2,82 ± 0,28 a | 0,1966 |
| | KLSA | ND** | 3,61 ± 0,41 a | 3,44 ± 0,23 ab | 2,87 ± 0,42 b | 0,0444 |
| | KLVI | ND** | 3,55 ± 0,50 a | 3,29 ± 0,35 a | 2,90 ± 0,43 a | 0,1480 |
| Gordura ^b | KLCU | ND** | 0,11 ± 0,03 a | 0,10 ± 0,01 a | 0,13 ± 0,01 a | 0,1792 |
| | KLDI | ND** | 0,11 ± 0,04 a | 0,11 ± 0,01 a | 0,12 ± 0,02 a | 0,9995 |
| | KLSA | ND** | 0,11 ± 0,04 a | 0,10 ± 0,01 a | 0,13 ± 0,01 a | 0,5332 |
| | KLVI | ND** | 0,11 ± 0,02 a | 0,11 ± 0,02 a | 0,12 ± 0,01 a | 0,2009 |
| Proteína ^b | KLCU | ND** | 3,70 ± 0,09 a | 3,61 ± 0,08 a | 3,67 ± 0,22 a | 0,6778 |
| | KLDI | ND** | 3,67 ± 0,17 a | 3,79 ± 0,09 a | 3,74 ± 0,09 a | 0,4275 |
| | KLSA | ND** | 3,68 ± 0,07 a | 3,64 ± 0,13 a | 3,69 ± 0,12 a | 0,7602 |
| | KLVI | ND** | 3,73 ± 0,13 a | 3,67 ± 0,08 a | 3,60 ± 0,16 a | 0,3938 |

*KLCU – Curitiba; KLDI – Divinópolis; KLSA – Salvador; KLVI – Viçosa ^a Acidez titulável expressa como mg de ácido láctico/mL; ^b Lactose, gordura e proteína expressas como g/100g. ND** Não determinado.

Letras minúsculas distintas nas linhas indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Quando o pH atinge o ponto isoelétrico da caseína ($\approx 4,7$), principal proteína do leite, tem-se a formação de precipitado alterando-se a viscosidade das bebidas fermentadas de leite. O pH

também influencia na microbiota presente na bebida, sendo que o baixo pH pode contribuir para a diminuição da incidência de bactérias patogênicas e favorecer os lactobacilos (Sgarbieri, 2005; Guzel - Seydim et al., 2010; Altay et al., 2013).

A acidez titulável foi similar entre as bebidas, independente da origem do grão de kefir ($P > 0,05$). No entanto, de forma geral, com o passar do tempo houve aumento significativo da acidez das bebidas ($P < 0,05$) (Tabela 5). Esse aumento ocorre em razão da atividade metabólica de bactérias lácticas que se mantiveram abundantes e ativas durante todo o período. No kefir também existem leveduras fermentadoras de lactose, porém esta população favorece mais a formação de etanol (Magalhães et al. 2011).

A quantidade e os tipos de ácidos orgânicos produzidos durante o processo de fermentação dependem das espécies de micro-organismos e das condições de crescimento. O efeito antimicrobiano dos ácidos orgânicos é devido a redução do pH e também da forma não dissociada que é capaz de difundir na membrana plasmática de modo passivo, diminuindo o pH intracelular (Madgan et al., 2010). O equilíbrio das formas dissociada e não dissociada e a extensão da dissociação depende do pH do meio. Em baixo pH, uma grande quantidade de ácido láctico permanece na forma não dissociada (Partanen et al., 2003). Outros ácidos orgânicos, como o acético, propiônico e butírico, também podem ser produzidos por via metabólica heterofermentativa (Guzel-Seydim et al., 2000). Eles possuem maior efeito antagônico se comparado ao ácido láctico devido ao maior pKa: láctico (pKa 3,54); acético (pKa 4,75); propiônico (pKa 4,87) e butírico (pKa 4,82) (Namazian e Heidary, 2003). O ácido acético pode agir sinergicamente com o ácido láctico diminuindo o pH do meio e conseqüentemente, aumentando a toxicidade do ácido acético (Adam, 1988).

O teor de lactose das bebidas não foi alterado pela origem do grão de kefir ($P > 0,05$). No entanto, de forma geral, houve redução do teor da lactose com o passar do tempo ($P < 0,05$) (Tabela 5). A lactose é o principal carboidrato presente no leite. É considerado como o substrato mais fácil de ser metabolizado pelas bactérias lácticas, que o transformam em ácido láctico. A hidrólise enzimática da lactose é um processo de grande interesse tecnológico, já que os compostos resultantes são facilmente fermentáveis e absorvidos pelo intestino humano. A β -galactosidase ou lactase é a principal enzima responsável por essa hidrólise. Trata-se de uma

oxidase que hidrolisa a ligação β -1,4-glicosídica e libera glicose e galactose, moléculas que o homem e as bactérias metabolizam com facilidade se comparada à lactose (Ordóñez et al., 2005). Uma vez consumida a lactose, gera-se ácido láctico e, conseqüentemente, eleva-se a acidez titulável reduz-se o pH do produto final. Como esperado, em nosso processo de produção dos diferentes kefir, a acidez titulável e o pH estavam inversamente correlacionados ($P < 0,05$).

A produção do ácido láctico deriva principalmente da fermentação da glicose e com a utilização do citrato, se tem uma melhoria das características sensoriais devido a produção de diacetil e acetoína (Guzel-Seydim et al., 2000; De Voz e Hugenholtz, 2004).

Irigoyen e colaboradores (2005) verificaram no kefir que parte da lactose foi consumida durante o período de fermentação de 24 horas do kefir, diminuindo cerca de 25% em relação ao nível inicial presente no leite. Após esse tempo, os níveis se mantiveram praticamente constantes durante o período de 21 dias de armazenamento. Nas bebidas analisadas aqui a queda do teor de lactose em 48 horas foi de aproximadamente 29,50%. Isto ocorre devido ao fato deste açúcar ser utilizado no metabolismo microbiano, com formação de ácido láctico e para formar o kefirano, que é o polímero característico do kefir, utilizado para gerar novos grânulos durante o processo de fermentação. Uma redução do teor de lactose de 4,5% para 3,35% (aproximadamente 25% de redução) também foi verificada durante 24 horas de fermentação de kefir por Magalhães et al. (2011), e foi correlacionada com a produção de ácido láctico, ácido acético e etanol. Mascarenhas (2011) demonstrou que no leite fermentado por grãos kefir de leite durante 24, 48 e 72 horas, o teor de lactose caiu para 3,90%, 3,57% e 3,45%, respectivamente. Essa queda foi bem maior que a observada durante o processo de produção de iogurte natural, no qual o teor de lactose do leite que era de 4,81% caiu para 4,6%. Esses dados somados nos permitem afirmar que os microrganismos envolvidos na produção de kefir são mais eficientes em metabolizar a lactose.

A redução do teor de lactose em produtos lácteos é objetivo de muitas pesquisas devido ao fato da intolerância à lactose afetar uma significativa da população adulta em todo o mundo (Schaafsma, 2008; EFSA, 2010; Martins et al., 2012). Os produtos lácteos fermentados são uma alternativa para uma dieta com reduzido teor de lactose para esses pacientes (EFSA, 2010).

Em relação ao teor de gordura, este kefir pode ser classificado como leite fermentado desnatado, uma vez que foi utilizado leite desnatado cujo conteúdo de matéria gorda foi inferior 0,5% (Brasil, 2007) (Tabela 5). Esses leites fermentados tendem a apresentar textura mais frágil e quebradiça e normalmente são utilizados espessantes para melhorar as propriedades reológicas (Gutierrez et al., 2012). Magra et al. (2012) verificaram que o teor de gordura, até 3,5%, pode contribuir para o aumento da viscosidade do produto e que nas condições avaliadas, não influencia na contagem de bactérias e leveduras durante 14 dias de armazenamento.

O teor de proteína das bebidas não se alterou em função da origem dos grãos de kefir e do tempo de armazenamento ($P > 0,05$) (Tabela 5). Magalhães et al. (2011) discutiram que pode haver acréscimo devido ao aumento da biomassa microbiana, no entanto, isso não foi observado em nenhuma das bebidas analisadas.

De modo geral, independente da origem do grão, os leites fermentados no presente estudo atenderam aos requisitos estabelecidos pela legislação nacional e internacional (Brasil, 2007; *Codex Alimentarius* 2010) (Tabela 6), após 48 horas de fermentação.

Tabela 6 – Requisitos microbiológicos e físico-químicos de kefir de leite, com 48 horas de fermentação, e padrões vigentes (n=4)

| Parâmetros | KLCU | KLDI | KLSA | KLVI | RTIQ (Brasil, 2007) | <i>Codex Alimentarius (2010)</i> |
|-------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---|--|
| BAL (UFC/mL) | $3,80 \times 10^7$ | $3,71 \times 10^7$ | $7,76 \times 10^7$ | $2,24 \times 10^7$ | Mín. 10^7 | Mín. 10^7 |
| Leveduras (UFC/mL) | $9,33 \times 10^5$ | $1,67 \times 10^6$ | $1,32 \times 10^6$ | $1,00 \times 10^6$ | Mín. 10^4 | Mín. 10^4 |
| Acidez titulável (%) | $0,83 \pm 0,26$ | $0,85 \pm 0,16$ | $0,70 \pm 0,11$ | $0,75 \pm 0,11$ | 0,5 a 1,5 | Mín. 0,6 |
| Teor de proteína (%) | $3,70 \pm 0,09$ | $3,67 \pm 0,17$ | $3,68 \pm 0,07$ | $3,73 \pm 0,13$ | Mín. 2,9 | Mín. 2,7 |
| Teor de gordura (%) | $0,11 \pm 0,03$ | $0,11 \pm 0,04$ | $0,11 \pm 0,04$ | $0,11 \pm 0,02$ | De acordo com o conteúdo de matéria gorda da matéria- prima | Inferior a 10 |
| Teor de lactose (%) | $3,39 \pm 0,42$ | $3,60 \pm 0,39$ | $3,57 \pm 0,41$ | $3,56 \pm 0,47$ | n.e | n.e. |
| pH | $4,68 \pm 0,28$ | $4,98 \pm 0,15$ | $4,69 \pm 0,41$ | $4,85 \pm 0,22$ | n.e | n.e. |

KLCU – Curitiba; KLDI – Divinópolis; KLSA – Salvador; KLVI – Viçosa; RTIQ = Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Fermentado; n.e. = não especificado

Diante da ausência de especificação legislativa em relação ao requisito pH, sugere-se a adoção do valor 4,6, tendo em vista os resultados obtidos neste trabalho.

5.4 Caracterização microbiológica e físico-química de diferentes bebidas fermentadas preparadas com grãos de kefir de água açucarada

Atualmente, as pesquisas e as informações científicas sobre kefir de água ainda são muito limitadas (Laureys e De Vuyst, 2014). Neste nicho ecológico, os micro-organismos são bem adaptados, formando um consórcio onde são capazes de crescer e mutuamente fornecerem nutrientes essenciais. O sinergismo ocorre entre os principais representantes que são os lactobacilos e as leveduras e esses são responsáveis pela caracterização da bebida fermentada e pelas alegações probiótica da bebida fermentada (Stadie et al., 2013; Laureys e De Vuyst, 2014).

Em todas as bebidas avaliadas, independente da origem do grão de kefir, as BAL atingiram o nível populacional de 10^6 UFC/mL nas primeiras 24 horas de fermentação (dia 1), aumentando para 10^7 UFC/mL no dia 2, porém, reduzindo novamente para o nível de 10^6 UFC/mL durante o período de armazenamento de 28 dias (Tabela 7). Estes valores coincidem com os encontrados por Laureys e De Vuyst (2014) que, após o processo fermentativo, verificaram contagens em torno de $6,9 \pm 0,1 \log_{10}$ UFC/mL.

Tabela 7 – Enumeração de BAL e leveduras, expressa em log de UFC/mL, em amostras de kefir de água açucarada produzidos com grãos de diferentes origens, ao longo do tempo (dias) (n=3)

| Micro-organismos | Amostras* | Tempo (dias) | | | | P Value |
|---------------------------|-----------|----------------|----------------|----------------|----------------|---------|
| | | 1 | 2 | 7 | 28 | |
| BAL (Log UFC/mL) | KABH | 6,25 ± 1,02 a | 7,41 ± 0,30 a | 6,43 ± 0,19 a | 6,13 ± 0,37 a | 0,0885 |
| | KACU | 5,84 ± 0,76 a | 7,19 ± 0,17 a | 6,56 ± 0,54 a | 6,15 ± 1,03 a | 0,1821 |
| | KASA | 6,44 ± 0,18 c | 7,59 ± 0,25 a | 7,13 ± 0,23 ab | 6,64 ± 0,15 bc | 0,0006 |
| | KAVI | 6,27 ± 0,13 ab | 7,32 ± 0,41 a | 7,12 ± 0,70 a | 6,00 ± 0,10 b | 0,0112 |
| Leveduras (Log UFC/mL) | KABH | 6,13 ± 0,49 b | 6,46 ± 0,17 ab | 6,70 ± 0,14 ab | 6,87 ± 0,21 a | 0,0559 |
| | KACU | 6,27 ± 0,38 a | 6,46 ± 0,22 a | 6,69 ± 0,09 a | 6,84 ± 0,33 a | 0,1351 |
| | KASA | 6,86 ± 0,23 a | 7,11 ± 0,53 a | 6,99 ± 0,46 a | 7,13 ± 0,54 a | 0,8727 |
| | KAVI | 5,89 ± 0,80 a | 6,27 ± 0,43 a | 6,58 ± 0,55 a | 6,82 ± 0,52 a | 0,3143 |

* KABH – Belo Horizonte; KACU – Curitiba; KASA – Salvador; KAVI – Viçosa
Letras minúsculas distintas nas linhas indicam diferença significativa pelo teste de Tukey (P < 0,05).

O número de células viáveis de leveduras (UFC/mL) não foi influenciado pela origem do grão de kefir e tampouco pelo tempo de armazenamento ($P > 0,05$), mantendo-se em torno de 10^6 UFC/mL (Tabela 7).

Nos grãos de kefir, os lactobacilos favorecem o crescimento das leveduras devido à acidificação do meio e a presença de leveduras age em prol do crescimento dessas bactérias por meio do fornecimento de vitamina B6 e aminoácidos essenciais, caracterizando assim uma interação mutualística entre os mesmos (Stadie et al., 2013). Uma associação física destes micro-organismos também pode ocorrer em função da produção de polissacarídeos. Esta associação pode ser baseada em diferentes interações moleculares como o ajustamento do ambiente físico-químico (mudança de pH), interações mutualísticas, produção de diferentes metabólitos que não seriam produzidos se o micro-organismo estivesse sendo cultivado sozinho (Frey-klett et al., 2011).

De acordo com a tabela 8, a acidez titulável, expressa em percentagem de ácido láctico, não foi influenciada pela origem do grão de kefir ($P > 0,05$). De modo geral, observa-se um leve aumento da acidez durante o armazenamento. O ácido láctico é responsável pelo sabor refrescante do kefir de água e é o principal metabólito produzido pelas espécies bacterianas, embora uma pequena quantidade de etanol, acetato e manitol possa ser também produzida (Laureys e De Vuyst, 2014). A metabolização do lactato é realizada pelas leveduras que podem produzir etanol e dióxido de carbono, principalmente e pequenas quantidades de glicerol e de ácido acético. O glicerol é uma molécula de sabor ligeiramente doce que pode contribuir para a viscosidade da bebida fermentada, mas aparentemente não parece influenciar no sabor e aroma. Os mesmos autores relataram que os compostos voláteis mais prevalentes foram acetato de etila, 2-metilpropanol, álcool isoamílico, acetato de isoamilico, hexanoato de etila, octanoato de etila, e decanoato de etila, que pode ser de importância no que diz respeito ao aroma do produto final, sendo o éster octanoato de etila encontrado com maior frequência.

Tabela 8 – Parâmetros físico-químicos de amostras de kefir de leite produzidos com grãos de diferentes origens, ao longo do tempo (dias) (n=3)

| Parâmetros | Amostras* | Tempo (dias) | | | | P value |
|---|-----------|---------------|----------------|----------------|---------------|---------|
| | | 1 | 2 | 7 | 28 | |
| Acidez titulável (mg de ácido lático/100mL) | KABH | 0,08 ± 0,03 b | 0,10 ± 0,02 b | 0,13 ± 0,03 b | 0,22 ± 0,03 a | 0,0025 |
| | KACU | 0,06 ± 0,02 a | 0,08 ± 0,01 a | 0,11 ± 0,01 a | 0,17 ± 0,03 a | 0,4921 |
| | KASA | 0,05 ± 0,01 b | 0,08 ± 0,02 ab | 0,13 ± 0,04 ab | 0,18 ± 0,02 a | 0,0397 |
| | KAVI | 0,06 ± 0,03 a | 0,09 ± 0,03 a | 0,11 ± 0,02 a | 0,14 ± 0,02 a | 0,1666 |
| pH | KABH | 4,33 ± 0,50 a | 4,02 ± 0,19 a | 3,82 ± 0,08 a | 3,71 ± 0,21 a | 0,1141 |
| | KACU | 4,57 ± 0,22 a | 4,34 ± 0,12 ab | 4,12 ± 0,13 ab | 3,99 ± 0,24 b | 0,0206 |
| | KASA | 4,57 ± 0,32 a | 4,35 ± 0,24 a | 4,06 ± 0,38 a | 3,91 ± 0,39 a | 0,1551 |
| | KAVI | 4,61 ± 0,55 a | 4,39 ± 0,45 a | 4,12 ± 0,34 a | 4,00 ± 0,40 a | 0,3848 |

*KLCU – Curitiba; KLDI – Divinópolis; KLSA – Salvador; KLVI – Viçosa

Letras minúsculas distintas nas linhas indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

De modo geral, o pH não foi influenciado pela origem do grão de kefir e nem pelo tempo de armazenamento ($P > 0,05$), exceto KACU. Partindo, inicialmente, de 6,5 até o pH no final do armazenamento em torno de 4,0. Este perfil de queda de pH é semelhante ao verificado por Magalhães e colaboradores (2011) cujo pH da bebida passou para $4,42 \pm 0,01$ em 24 horas. Laureys e De Vuyst (2014) verificaram um maior decréscimo em 24 horas, atingindo o valor de 3,8. A redução ocorreu até 72 horas, com pH final de 3,4.

Além da água com açúcar mascavo, o grão de kefir de água já foi utilizado na fermentação de outros sucos e/ou extratos, como por exemplo, cebola, cenoura, erva-doce, melão, morango, tomate, uva (Corona et al., 2016; Randazo et al., 2016) e nestes estudos os valores de pH variaram de 3,48 a 4,11, após 48 horas de fermentação a 25°C.

Não há legislação vigente que dispõe sobre o padrão de identidade e qualidade específico para o kefir de água e diante disto, este trabalho propõe que o kefir de água deve apresentar, aproximadamente, contagem de BAL e leveduras na ordem de 10^7 e 10^6 de UFC/mL, acidez de 0,12mg de ácido lático/mL e pH próximo a 4,0. Desta forma, esta bebida podendo ser considerada como um produto que apresenta grande potencial no desenvolvimento de novos produtos com alegações funcionais.

5.5 Pesquisa de EPS em bebidas fermentadas com grãos de kefir de leite e de água açucarada

Pressupondo-se a presença de EPS nas bebidas produzidas com diferentes grãos de kefir, tentou-se determinar a massa molecular (MM) desses EPS por cromatografia por exclusão de tamanho (filtração em gel) em sobrenadantes de quatro bebidas após 48 horas de fermentação (duas de água com açúcar mascavo e duas de leite). A cromatografia por exclusão de tamanho é uma das técnicas mais amplamente utilizadas para determinar a distribuição de tamanho molecular de polímeros de qualquer espécie. O mecanismo de separação depende do tamanho e da forma das moléculas da amostra em relação ao tamanho e forma dos poros da fase estacionária. O método utiliza padrões de polímeros com massa molecular e tempo de retenção conhecidos (Sepsey et al., 2014; Bacskay et al., 2014). Neste trabalho, os dextrans utilizados como referência, na concentração de 0,5%, apresentavam massas moleculares que variaram de 3.800.000 a 97.000Da, com tempos de retenção de 8,28 a 10,12 minutos (Apêndice A).

Nas condições avaliadas, os EPS presentes nos grãos de kefir eluíram da coluna em tempo anterior ao padrão de maior massa molecular e, portanto, apresentam massa molecular elevada e superior a 10^6 Da. Logo, as massas moleculares foram estimadas por encontrarem-se fora da curva de calibração (Tabela 9 e Apêndice D).

Tabela 9 – Caracterização estrutural primária de EPS em grãos de kefir de leite (KL) e de água açucarada (KA), determinadas mediante CLAE por exclusão molecular

| Amostra* | Tempo de retenção (minutos) | MM (Da)** | Percentual de cada fração na amostra (%) |
|-----------------|------------------------------------|--------------------|---|
| KLCU | 7,90 | $5,88 \times 10^6$ | 100 |
| KLSA | 7,69 | $8,60 \times 10^6$ | 100 |
| KACU | 6,28 | $1,12 \times 10^8$ | 100 |
| KASA | 6,32 | $1,02 \times 10^8$ | 100 |

*KLCU – Curitiba; KLSA – Salvador; KACU – Curitiba; KASA – Salvador ** Valores de MM (Da) das amostras são estimados, uma vez que os tempos de retenção dos mesmos extrapolaram a curva de calibração

Os resultados das massas molares dos EPS extraídos dos grãos de kefir de leite são semelhantes as três amostras analisadas por Piermaria (2008), que apresentaram valores superiores a 4×10^6 Da. A partir de grãos de kefir de leite pode-se extrair, por meio de técnicas simples de extração e precipitação alcoólica, quantidades importantes de EPS de elevada massa molecular,

que permitem caracteriza-lo do ponto de vista físico-químico e estudar suas propriedades funcionais e a possibilidade de ser um aditivo alimentar (Piermaria, 2008).

Os EPS da mesma matriz alimentar (leite ou água açucarada) apresentam massas molares semelhantes e quando se compara as matrizes entre si, observa-se que a composição do meio influencia na caracterização estrutural do EPS. A quantidade e o tipo de polímero que é produzido são influenciados pelas condições de crescimento (pH, temperatura e tempo de incubação) e da composição do meio, mais especificamente da proporção de carbono (C) e nitrogênio (N) (De Vuyst e Degeest, 1999).

A relação C/N no meio de cultura influencia grandemente na produção de EPS. Uma elevada concentração de nitrogênio é necessária para um rápido crescimento celular. Entretanto, meios contendo elevado teor de fonte de carbono e baixo teor de nitrogênio favorecem o acúmulo de polímero. Em geral, os processos industriais procuram utilizar meios que disponibilizem condições tanto para o crescimento onde é requerida uma maior concentração de nitrogênio, como para produção de EPS, onde maior concentração de carbono é necessária (Nitschke et al., 2001).

Nitschke e colaboradores (2001) avaliando a produção de goma xantana propuseram um sistema combinado em duas etapas: utilizando soro integral na primeira etapa, o qual continha cerca 0,35% proteína e soro filtrado (0,18% proteína) na segunda etapa. Os resultados mostraram que na primeira etapa obteve-se o rendimento, expresso em massa de goma xantana por kilograma de açúcar consumido (g/Kg), de 13g/kg de xantana e um rendimento de 45%. Foi demonstrado que no início do processo, o uso do soro integral favoreceu o crescimento celular, enquanto que na segunda fase, a adição de soro filtrado contendo menor concentração de proteínas favoreceu o acúmulo de EPS.

As fontes de carboidratos como glicose e lactose influenciam na produção de EPS. Entretanto, não somente fontes naturais de carbono, mas combinações de monossacarídeos podem influenciar na biossíntese e na estrutura de EPS. Diferença de composição de EPS pode influenciar na massa molecular, como por exemplo EPS de elevada massa molecular, composto

por galactose, glicose e ramnose na proporção de 5,0:1,0:1,0 e EPS de baixa massa molecular com os mesmos compostos porém na proporção de 11,0:1,0:4,0 (De Vuyst e Degeest, 1999).

Nas condições avaliadas, os polissacarídeos presentes nas bebidas fermentadas eluíram da coluna em tempo posterior ao padrão de menor massa molecular e, portanto, apresentam massa molecular inferior a 10^4 Da (Tabela 10 e Apêndice D). Logo, não foi possível determinar a massa molecular com precisão, porque as amostras encontraram-se fora da curva de calibração.

Tabela 10 – Pesquisa de EPS em bebidas fermentadas de kefir de leite (KL) e de água açucarada (KA), determinadas mediante CLAE por exclusão molecular

| Amostra* | Tempo de retenção (minutos) | MM (Da)** | Percentual de cada fração na amostra (%) |
|-------------|-----------------------------|--------------------|--|
| KLCU | 10,97 | $2,24 \times 10^4$ | 100,00 |
| KLSA | 11,32 | $1,20 \times 10^4$ | 44,88 |
| | 11,69 | $6,17 \times 10^3$ | 54,90 |
| KACU | 12,47 | $1,48 \times 10^3$ | 0,22 |
| | 13,04 | $5,25 \times 10^2$ | 100 |
| KASA | 11,76 | $5,37 \times 10^3$ | 99,63 |
| | 13,06 | $5,13 \times 10^2$ | 0,37 |
| Sacarose*** | 11,71 | $3,38 \times 10^2$ | 100 |

* KLCU – Curitiba; KLSA – Salvador; KACU – Curitiba; KASA - Salvador **MM padrão superior $3,72 \times 10^6$; MM padrão inferior $9,55 \times 10^4$; os valores de MM das amostras são estimados, uma vez que os tempos de retenção dos mesmos extrapolaram a curva de calibração **Controle negativo (ausência de polímeros)

Os sobrenadantes das bebidas analisadas, em sua maioria, apresentaram predominância de um pico de eluição. No entanto, se as amostras forem comparadas com a sacarose (342,2Da), que possui tempo de retenção de 11,70 minutos, pode-se inferir que os carboidratos presentes nas amostras são de baixa massa molecular e que se assemelham mais a carboidratos simples do que a polímeros.

Bebidas preparadas com leite (KLCU e KLSA) continham EPS de baixa massa molar, cujos valores variaram entre 10^3 e 10^4 Da. Nas amostras preparadas com água açucarada (KACU e KASA) foram encontrados oligossacarídeos com baixo grau de polimerização, cujas massas moleculares foram menores que 10^3 Da.

De acordo com a produção de EPS nos grãos que contribuem para o aumento da biomassa, com a caracterização estrutural primária por meio da determinação da MM dos mesmos e considerando os EPS destas bebidas fermentadas, pode-se propor que o EPS presente nos grãos

possui pouca dispersão em solução aquosa e que a presença do mesmo nas bebidas ocorre em função da capacidade específica de algumas estirpes microbianas.

Espécies dos gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* e *Oenococcus* identificadas nestes grãos de kefir por Zaniratti e colaboradores (2015), podem estar relacionadas com a produção destes polímeros e também podem contribuir na caracterização da bebida.

Resultados similares foram obtidos por Piermaria (2008) ao verificar que dentre 15 amostras de leite fermentado por diferentes estirpes de lactobacilos, sendo cinco *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e 10 *L. plantarum*, apenas uma apresentou polissacarídeo com massa molecular superior a 4×10^6 Da, todas as outras apresentaram carboidratos de massa molecular inferior a 10^4 Da.

As características dos EPS são influenciadas pelas estirpes microbianas presentes nos grãos. Hamet e colaboradores (2015) analisaram a MM de EPS em leites fermentados produzidos por 28 estirpes de *Lactobacillus*. Nove linhagens de *L. plantarum* produziram exclusivamente EPS com MM entre 10^4 e 10^5 Da, três entre 10^4 e 10^6 Da e duas inferiores a 10^4 Da e entre 10^4 e 10^5 Da. Os EPS de cinco linhagens de *L. kefiranofaciens* apresentaram MM inferiores a 10^4 Da e entre 10^4 e 10^5 Da e quatro outras linhagens produziram apenas EPS inferiores a 10^4 Da. Quatro linhagens de *L. paracasei* produziram EPS que variaram entre 10^4 a valores superiores a 10^6 Da e uma entre 10^4 e 10^6 Da. Os leites fermentados que continham EPS com as maiores MM apresentaram bebidas com maior viscosidade.

Uma das funções atribuídas às substâncias polissacarídicas é o seu papel como prebiótico, definido como ingrediente alimentar que afeta benéficamente o hospedeiro ao estimular seletivamente o crescimento ou a atividade de um número limitado de bactérias no cólon para melhorar o estado de saúde. Demonstrou-se que a incorporação de prebióticos específicos na dieta pode estimular o crescimento de certos micro-organismos benéficos no cólon, sendo os produtos finais da sua fermentação ácido láctico, hidrogênio, metano, dióxido de carbono e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), especialmente ácidos acético, propiônico e butírico. Estes AGCC têm uma importante função trófica para os colonócitos, contribuindo para a regulação do

metabolismo lipídico e do açúcar, diminuindo o pH e modulando a microbiota (Abraham et al., 2010).

Os EPS produzidos por BAL são capazes de neutralizar o efeito de certos agentes patogênicos, quer seja pela sua capacidade de interagir com as células do epitélio intestinal ou sequestro de toxinas ou de outros metabolitos prejudiciais (Abraham et al., 2010). Medrano et al. (2009), avaliando a capacidade do kefirano em cultura de células Caco-2, verificaram que ele protegeu significativamente as células infectadas dos efeitos citopáticos induzidos por *B. cereus*, tais como necrose celular, desorganização da F-actina e das microvilosidades, apesar da presença do kefirano não modificar a aderência dos micro-organismos as células. Estes resultados poderiam ser atribuídos à capacidade de interação do kefirano com células procariotas e eucariotas antagonizando assim interações necessárias para efeitos biológicos máximos. Estas descobertas incentivam mais pesquisas sobre o uso de EPS bacterianos para antagonizar fatores de virulência associados a interações de bactéria-célula. Ruas-Madiedo et al. (2010), mostraram que alguns EPS produzidos por BAL probióticas foram capazes de aumentar a associação de alguns enteropatógenos ao muco intestinal, sugerindo que este aumento poderia explicar o fenômeno da exclusão competitiva dado pelos probióticos.

Outra aplicação de estirpes produtoras de EPS é na indústria de alimentos. Qin et al. (2011) verificaram que *S. thermophilus* isolados de grãos de kefir produziram EPS de $2,5 \times 10^4$ Da. A bebida fermentada pela estirpe produtora de EPS apresentou menor susceptibilidade à separação do soro lácteo, viscosidade mais elevada, e maiores escores sensoriais do que a bebida fermentada por estirpe não produtora de EPS.

5.6 Produção de EPS por *Lactobacillus* spp. isolados de grãos de kefir

A capacidade de produção de EPS por *Lactobacillus* spp. isolados de grãos de kefir de leite e água açucarada foi avaliada variando-se a fonte de carbono (glicose, sacarose ou lactose), a atmosfera (aerobiose e anaerobiose) e a temperatura de cultivo (25°C e 37°C). Os isolados foram considerados produtores de EPS quando apresentaram colônias viscosas na superfície do ágar MRS acrescido de açúcar (Figura 14). Dos 52 isolados avaliados, a produção de EPS foi verificada em 17 (32,7%), com aparecimento de colônias viscosas apenas em ágar sMRS e de

forma independente da atmosfera de cultivo (aerobiose e anaerobiose) e da temperatura (25°C e 37°C). Isso demonstra que linhagens produtoras de EPS, o fazem em diferentes condições de crescimento, inclusive nas condições de elaboração das bebidas fermentadas (25°C, aerobiose).

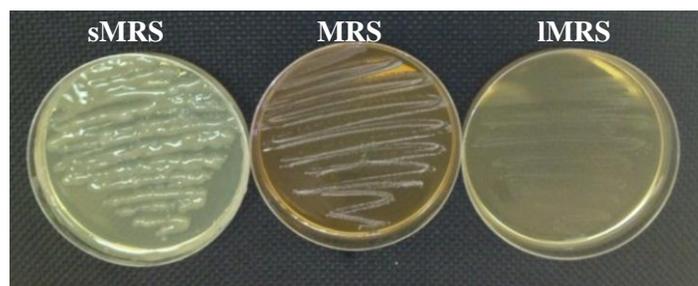


Figura 14 - Produção de exopolissacarídeos em diferentes fontes de carboidratos (sMRS – sacarose 8% p/v; MRS – glicose 2% p/v; IMRS – lactose 5% p/v).

Tabela 11 – Lactobacilos produtores de EPS em ágar MRS contendo sacarose (sMRS)

| Origem do Grão | Kefir de leite* | Kefir de água açucarada* |
|----------------|---|--|
| Curitiba | nenhuma linhagem produtora | <i>L. satsumensis</i> 18P <i>L. perolens</i> 19 P <i>L. perolens</i> 17P2 <i>L. parafarraginis</i> 16PA <i>L. perolens</i> 16P3A |
| Belo Horizonte | Não se aplica** | <i>L. diolivorans</i> 1Z |
| Divinópolis | nenhuma linhagem produtora | Não se aplica** |
| Salvador | <i>L. satsumensis</i> 23P3 <i>L. mali</i> 23PA <i>L. casei</i> 22P2 | <i>L. perolens</i> 13PA <i>L. perolens</i> 11P <i>L. perolens</i> 11P3 <i>L. satsumensis</i> 10P2 <i>L. satsumensis</i> 10P |
| Viçosa | nenhuma linhagem produtora | <i>L. mali</i> 19U <i>L. mali</i> 22U <i>L. mali</i> 21U1 |

* código de identificação de cada isolado de *Lactobacillus* por Zanirati et al. (2012) ** amostras de grãos de kefir inexistentes

Os micro-organismos produtores de EPS em sMRS foram: seis isolados de *L. perolens*, quatro de *L. mali*, quatro de *L. satsumensis*, um de *L. parafarraginis*, um de *L. diolivorans* e um de *L.*

casei, provenientes de grãos de kefir cultivados em leite ou água com açúcar mascavo, de diferentes localidades brasileiras (Belo Horizonte, Curitiba, Salvador e Viçosa) (Tabela 11).

Nas placas de ágar MRS contendo lactose (IMRS), foi observado o crescimento de todos os isolados. Porém, não houve produção de EPS. Neste meio esperava-se uma produção de Heps, como o kefirano ou heteropolissacarídeos semelhantes. Wang et al. (2008) conseguiram encontrar, entre BAL, *L. kefiranofaciens* produtor de Heps 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 sete a nove 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. Entre os isolados testados neste trabalho, havia culturas de *L. kefiranofaciens*. No entanto, nenhuma delas demonstrou ser capaz de produzir EPS nas condições avaliadas. Assim, sugere-se que se usássemos outras condições de cultivo (tempo, temperatura e tensão de oxigênio) detectaríamos linhagens produtoras de EPS no meio contendo lactose.

O rendimento da produção de EPS, expressa em grama por litro (g/L), variou de 3,62 g/L a 36,30 g/L entre os lactobacilos testados (Tabela 12). *L. satsumensis* 10P, proveniente de grãos de kefir de água açucarada de Salvador, produziu 36,30 g/L o que corresponde a 10 vezes mais a quantidade produzida por *L. mali* 21U1 (3,62 g/L), isolado de grãos de kefir de água açucarada de Viçosa. Esses valores são semelhantes aos encontrados por Paiva (2013) que verificou a produção de EPS de cinco lactobacilos e encontrou rendimento de 2,55 a 34,1 g/L.

Santos et al. (2005), avaliando a produção de dextrano por *Leuconostoc mesenteroides* em diferentes condições de cultivo (maltose, lactose, galactose e sacarose), verificaram valores de 6,88 a 7,66g/L. Em outro estudo, a produção de EPS em leite fermentado por cinco estirpes de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* variou de 12,2±2,2mg/L a 38,7±1,6mg/L, enquanto por dez estirpes de *L. plantarum* os valores variaram de 19,3±4,1mg/L a 102,8±6,1 mg/L (Piermaria, 2008), sendo tais valores bastante distintos, apesar de ter utilizado a mesma técnica de extração de EPS (precipitação alcoólica). A explicação para a distinção de rendimento decorre da quantidade de inóculo adicionada e das condições de cultivo, onde se observou variação na fonte

de carbono, tensão de oxigênio e nos parâmetros de incubação. No presente estudo, utilizou-se 1,5% (v/v) de micro-organismos ativos, sacarose como fonte de carbono e incubação em anaerobiose a 37°C durante 48 horas. Enquanto Piermaria (2008) utilizou inóculo de 1% (v/v), lactose como fonte de carbono e incubação em aerobiose a 37°C até se atingir o pH 4,0.

Tabela 12 – Produção de EPS em caldo sMRS, expressa em grama por litro por lactobacilos isolados de grãos de kefir

| Origem do Grão* | Micro-organismo** | Produção de EPS (g/L) |
|------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| KASA | <i>L. satsumensis</i> 10P | 36,30 |
| | <i>L. perolens</i> 11P3 | 33,73 |
| | <i>L. satsumensis</i> 10P2 | 33,72 |
| | <i>L. perolens</i> 11P | 30,57 |
| | <i>L. perolens</i> 13PA | 23,00 |
| KLSA | <i>L. satsumensis</i> 23P3 | 28,89 |
| | <i>L. casei</i> 22P2 | 28,10 |
| | <i>L. mali</i> 23PA | 20,09 |
| KACU | <i>L. satsumensis</i> 18P | 19,47 |
| | <i>L. perolens</i> 17P2 | 18,23 |
| | <i>L. perolens</i> 16P3A | 7,70 |
| | <i>L. perolens</i> 19P | 6,25 |
| | <i>L. parafarraginis</i> 16PA | 5,88 |
| KABH | <i>L. diolivorans</i> 1Z | 9,27 |
| KAVI | <i>L. mali</i> 19U | 5,06 |
| | <i>L. mali</i> 22U | 4,90 |
| | <i>L. mali</i> 21U1 | 3,62 |

* KASA – kefir de água de Salvador; KLSA – kefir de leite de Salvador; KACU – kefir de água de Curitiba; KABH – kefir de água de Belo Horizonte; KAVI – Kefir de água de Viçosa **O número de células viáveis (UFC/mL) variou de $2,0 \times 10^7$ a $8,0 \times 10^7$

5.7 Determinação da pureza dos EPS produzidos por *Lactobacillus* spp.

Todos os EPS extraídos de sobrenadante das culturas apresentaram baixo teor de proteína residual (Tabela 13). A pesquisa de carboidratos simples nos EPS não revelou presença de glicose, sacarose ou galactose em nenhuma das amostras (Figura 15 e 16) e, por esse motivo, todas foram utilizadas com confiabilidade em estudos posteriores.

Tabela 13 – Pesquisa de resíduos de proteína (mg/mL) em mostras de EPS produzida por *Lactobacillus* spp., pelo método de Bradford

| Micro-organismo | Amostras | Absorvância (590nm) | Concentração de proteína (mg/L) |
|--------------------------|----------|---------------------|---------------------------------|
| <i>L. diolivorans</i> | 1Z | 0,242 | 0,000 |
| <i>L. satsumensis</i> | 10P | 0,243 | 0,002 |
| <i>L. satsumensis</i> | 10P2 | 0,241 | 0,000 |
| <i>L. perolens</i> | 11P | 0,241 | 0,000 |
| <i>L. perolens</i> | 11P3 | 0,243 | 0,002 |
| <i>L. perolens</i> | 13PA | 0,242 | 0,001 |
| <i>L. parafarraginis</i> | 16PA | 0,242 | 0,000 |
| <i>L. perolens</i> | 16P3A | 0,241 | 0,000 |
| <i>L. perolens</i> | 17P2 | 0,243 | 0,002 |
| <i>L. satsumensis</i> | 18P | 0,242 | 0,000 |
| <i>L. perolens</i> | 19P | 0,242 | 0,000 |
| <i>L. mali</i> | 19U | 0,244 | 0,005 |
| <i>L. mali</i> | 21U1 | 0,242 | 0,000 |
| <i>L. casei</i> | 22P2 | 0,241 | 0,000 |
| <i>L. mali</i> | 22U | 0,242 | 0,001 |
| <i>L. mali</i> | 23P3 | 0,243 | 0,002 |
| <i>L. satsumensis</i> | 23PA | 0,242 | 0,000 |

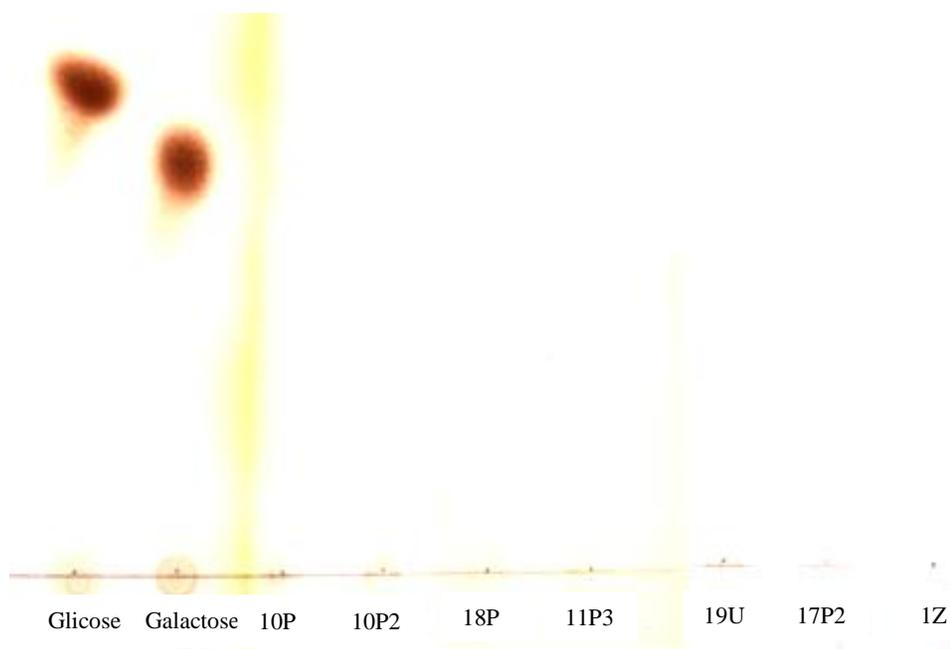


Figura 15 – Perfil de corrida na cromatografia de camada delgada de padrões de glicose e galactose e de amostras de exopolissacarídeos produzidos por *Lactobacillus* spp. isolados de grãos de kefir.

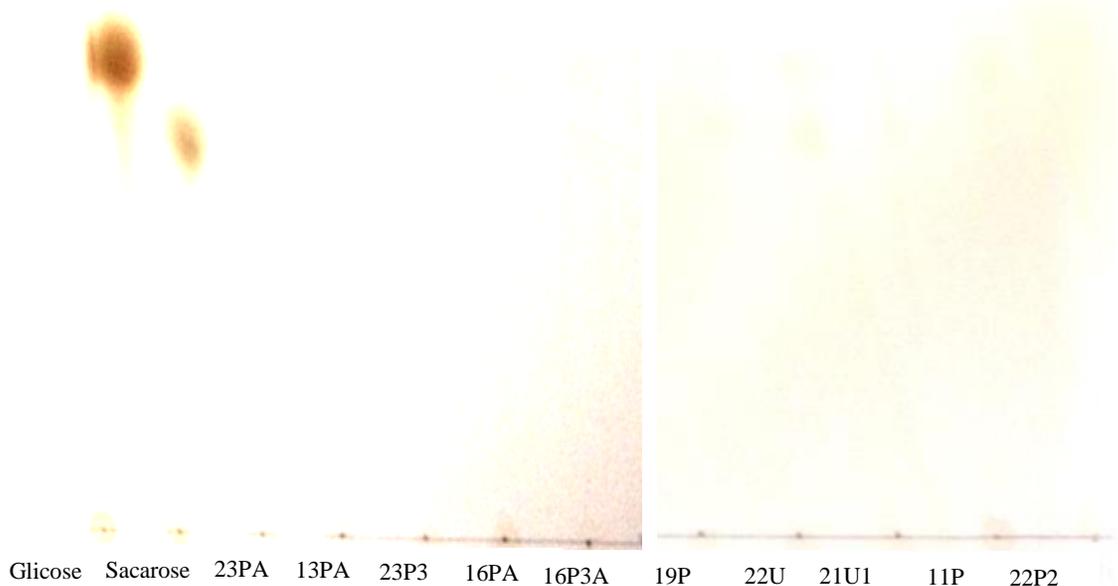


Figura 16 – Perfil de corrida na cromatografia de camada delgada de padrões de glicose e galactose de exopolissacarídeos produzidos por *Lactobacillus* spp. isolados de grãos de kefir.

Isto demonstra a eficiência do método de extração, no qual inicialmente se faz uma centrifugação em temperatura ambiente para a retirada de micro-organismos e material em suspensão e, posteriormente se faz a precipitação a frio com dois volumes de etanol. A adição de etanol modifica a constante dielétrica de forma tal que os polissacarídeos perdem a estabilidade e se precipitam. A baixa temperatura facilita a precipitação e dificulta a re-dissolução. A separação do precipitado (EPS) é realizada por centrifugação e o precipitado obtido pode ser dissolvido em água destilada quente (Piermaria, 2008).

No entanto, no caso dos grãos de água, o pH das amostras solubilizadas em NaOH ficou muito elevado ($\text{pH} \approx 14$) e nesta condição extrema não se pode realizar a determinação da massa molecular dos EPS, uma vez que este pH pode danificar a coluna de separação do cromatógrafo e tampouco pode-se utilizar tais amostras nos ensaios em culturas de células. Por esse motivo, após a solubilização fez-se a neutralização das soluções até o pH 7,0 com ácido clorídrico 0,1M. Com a neutralização, as amostras continuaram homogêneas, sem a formação de precipitados e puderam continuar sendo estudadas. As amostras foram centrifugadas e o sobrenadante filtrado em filtros estéreis Chromafil Xtra de $0,45\mu\text{m}$.

5.8 Quantificação de carboidratos nos EPS produzidos por *Lactobacillus* spp.

Devido ao fato das amostras terem sido obtidas a partir do mesmo método de extração, por apresentarem ausência de proteína e de monossacarídeos, e por terem sido preparadas na mesma concentração (cerca de 10g/L) e apresentarem carboidratos em sua composição (Tabela 14), isto demonstra que a substância extraída do meio de cultura é um exopolissacarídeo.

Tabela 14 - Concentração de carboidratos (g/L) nas amostras de EPS produzidas por *Lactobacillus* spp.

| Micro-organismo | Amostra | Concentração média (g/L) $\pm \sigma$ |
|--------------------------|----------------|---|
| <i>L. diolivorans</i> | 1Z | 9,49 \pm 0,14 |
| <i>L. satsumensis</i> | 10P | 9,50 \pm 0,46 |
| <i>L. satsumensis</i> | 10P2 | 9,21 \pm 1,12 |
| <i>L. perolens</i> | 11P | 8,48 \pm 0,63 |
| <i>L. perolens</i> | 11P3 | 8,54 \pm 0,84 |
| <i>L. perolens</i> | 13PA | 8,91 \pm 2,70 |
| <i>L. parafarraginis</i> | 16PA | 8,43 \pm 0,80 |
| <i>L. perolens</i> | 16P3A | 7,45 \pm 0,93 |
| <i>L. perolens</i> | 17P2 | 6,42 \pm 0,45 |
| <i>L. satsumensis</i> | 18P | 8,97 \pm 1,37 |
| <i>L. perolens</i> | 19P | 7,94 \pm 0,54 |
| <i>L. mali</i> | 19U | 8,14 \pm 0,08 |
| <i>L. mali</i> | 21U1 | 7,43 \pm 0,45 |
| <i>L. casei</i> | 22P2 | 6,58 \pm 0,55 |
| <i>L. mali</i> | 22U | 7,64 \pm 1,37 |
| <i>L. mali</i> | 23PA | 8,07 \pm 0,86 |
| <i>L. satsumensis</i> | 23P3 | 9,28 \pm 2,48 |
| Média geral | | 8,20 \pm 1,02 |

5.9 Determinação da massa molecular de EPS produzidos pelos *Lactobacillus* spp.

A massa molecular (MM) é um dos fatores que determinam as propriedades funcionais dos EPS (De Vuyst e Degeest, 1999). A determinação da mesma foi realizada nas amostras produzidas pelos isolados *L. satsumensis* (10P, 10P2, 18P); *L. perolens* (11P3, 17P2); *L. mali* (19U); *L. diolivorans* (1Z) e nos EPS obtidos dos grãos de kefir de água e de leite de Curitiba e Salvador (Tabela 15 e Apêndice E).

Tabela 15 - Massas moleculares (Da) determinadas por CLAE de exclusão molecular, de EPS obtidos a partir de micro-organismos isolados de kefir água açucarada e de leite

| Micro-organismo/Origem | Amostra | Tempo de retenção (minutos) | M.M (Da) | Percentual de cada fração na amostra (%) |
|-----------------------------|---------|-----------------------------|--------------------------|--|
| <i>L. satsumensis</i> /KASA | 10P | 8,674 | 1,44 x 10 ⁶ a | 38,42 |
| | | 10,999 | 2,13 x 10 ⁴ b | 61,58 |
| | 10P2 | 10,967 | 2,25 x 10 ⁴ b | 100 |
| <i>L. satsumensis</i> /KACU | 18P | 6,528 | 7,09 x 10 ⁷ * | 79,63 |
| | | 11,05 | 1,94 x 10 ⁴ b | 20,37 |
| <i>L. perolens</i> /KASA | 11P3 | 6,514 | 7,27 x 10 ⁷ * | 43,45 |
| | | 10,933 | 2,40 x 10 ⁴ b | 56,55 |
| <i>L. perolens</i> /KACU | 17P2 | 6,5 | 7,46 x 10 ⁷ * | 27,08 |
| | | 10,946 | 2,34 x 10 ⁴ b | 72,92 |
| <i>L. mali</i> /KAVI | 19U | 6,624 | 5,96 x 10 ⁷ * | 100 |
| <i>L. diolivorans</i> /KABH | 1Z | 6,523 | 7,15 x 10 ⁷ * | 100 |

*Valores estimados por extrapolação da curva

Letras minúsculas distintas nas colunas indicam diferença significativa pelo teste de Tukey (P < 0,05).

A MM dos EPS analisados neste estudo revelou uma grande diversidade entre os mesmos. As BAL produzem EPS cujas frações variaram de 1,94x10⁴ a 7,46 x 10⁷ Da. As culturas de micro-organismos, mesmo estando na mesma condição de cultivo, apresentaram diferenças, inclusive na mesma estirpe. Pode-se observar que todas as culturas possuíram frações de elevada massa molecular (>10⁶ Da), com exceção da amostra 10P2 que apresenta uma fração de baixa massa molecular (\approx 10⁴ Da).

As amostras 18P, 11P3, 17P2, 19U e 1Z apresentaram frações com massas moleculares superiores a 10⁶ Da e, portanto, estão fora dos padrões utilizados na curva de calibração. Desta maneira, seus valores não podem ser determinados com exatidão e diante disto, seus valores foram determinados por extrapolação da curva, sendo portanto estes dados estimados.

A presença de duas frações distintas na cromatografia de exclusão molecular não é incomum. Na análise de massa molecular de EPS extraídos de grão de kefir de água açucarada de La Plata

(Buenos Aires/Argentina) foram detectados dois picos, um correspondente a uma massa molecular de $9,7 \times 10^4$ Da e outro correspondente a $1,12 \times 10^6$ Da (Piermaria, 2008).

Mozzi et al. (2006) avaliaram a produção de Heps por 31 estirpes de bactérias lácticas que incluem as espécies: *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, *L. helveticus* e *S. thermophilus*) e demonstraram grande diversidade na massa molecular dos EPS produzidos. Apenas cinco estirpes produziram EPS com alta massa molecular, sendo elas $1,19 \times 10^6$; $1,80 \times 10^6$; $1,78 \times 10^6$; $2,2 \times 10^6$ e uma superior a $5,0 \times 10^6$ demonstrando que a produção de EPS de baixa massa molecular é mais provável de ocorrer do que a de alta. Em nossas amostras, a prevalência de massas moleculares elevadas foi maior.

A massa molecular é um dos fatores determinantes nas propriedades funcionais do EPS, entretanto as propriedades físicas e reológicas dos EPS em solução estão relacionadas a estrutura tridimensional e estes estudos podem beneficiar a indústria de alimentos, por exemplo (De Vuyst e Degeest, 1999).

Os micro-organismos *Lactobacillus satsumensis* (10P e 18P), *L. perolens* (11P3 e 17P2) parecem produzir EPS com diferentes massas moleculares quando cultivadas em sMRS, a 37°C e em anaerobiose (Tabela14). Resultados semelhantes foram observados por Grobber et al. (1995 e 1996), que relataram a produção de diferentes composições de EPS à partir da mesma estirpe, dependendo das condições de fermentação utilizadas e da técnica de extração aplicada.

Uma das principais aplicações destas estirpes produtoras de EPS poderia ser na indústria de alimentos. Na qual, a bebida fermentada por BAL produtora de EPS de $2,5 \times 10^4$ Da pode apresentar menor susceptibilidade à separação do soro lácteo, viscosidade mais elevada, e maiores escores sensoriais do que a bebida fermentada por estirpe não produtora de EPS (Qin et al., 2011).

5.10 Caracterização estrutural primária de EPS por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

A composição primária dos EPS produzidos por *Lactobacillus* spp. e extraídos de grãos de kefir de leite e de água açucarada foi obtida por integração da área abaixo dos sinais dos espectros (Figura 17 e Apêndice F) e estão apresentadas na Tabela 16. De modo geral, os EPS de *Lactobacillus* spp. isolados de grãos de kefir de leite e de água açucarada são formados em sua maioria por α -D-glicose, com ligações α (1-6), assim como a maioria dos polissacarídeos encontrados na literatura (Das e Goyal, 2014).

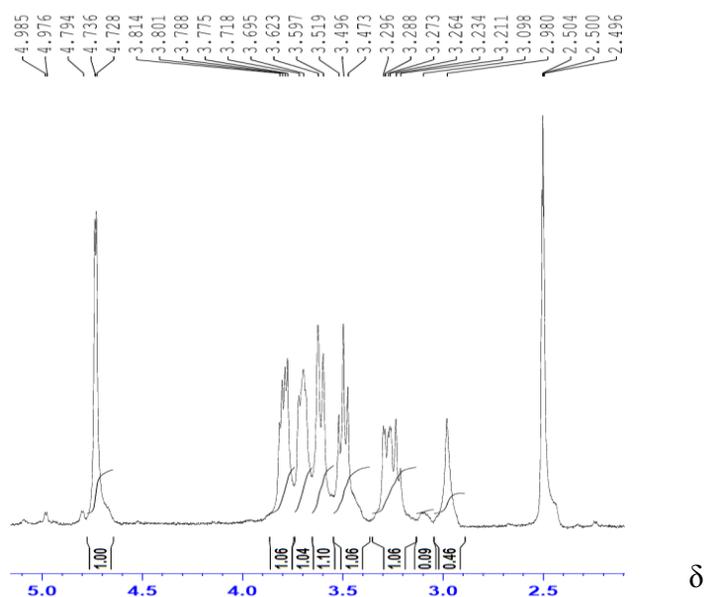


Figura 17 - Espectros de ^1H RMN do EPS extraído de grão de kefir de água de Salvador. Os valores expressos são referentes aos deslocamentos químicos expresso em delta (δ) e a a intensidade expressa pela área (abaixo do sinal).

Lactobacillus perolens (16P3A) e *L. mali* (21U) produziram EPS formados predominantemente por α -D-glicose, que representa o padrão característico de homopolissacarídeos, enquanto as outras BAL pesquisadas podem ter produzido EPS com perfil heteropolissacarídeos, que é caracterizado pela presença de outras hexoses, além da glicose.

A biossíntese de do homopolissacarídeo dextrano, que é formado predominantemente por α -D-glicose requer a sacarose como substrato específico e a alta especificidade da enzima

glicosiltransferase está envolvida na reação de polimerização. Enquanto os Heps podem ser produzidos por glicose, galactose, ramnose e N-acetyl-galactosamina. Estes precursores são formados no citoplasma e muitas enzimas e/ou proteínas estão envolvidas na biossíntese e secreção deste composto que não é exclusiva para esta via metabólica (De Vuyst e Deegest, 1999).

Tabela 16 - Composição primária de EPS produzidos por *Lactobacillus* spp. e extraídos de grãos de kefir de água açucarada e de leite

| Grão | Micro-organismos | Proporção (≈) e Tipo de carboidrato |
|---------------|----------------------------|---|
| KLSA | <i>L. mali</i> 23PA | 97% α-glicose + 3% outros* |
| KABH | <i>L. diolivorans</i> 1Z | 94% α-glicose + 6% outros* |
| KACU | <i>L. perolens</i> 16P3A | 99% α-glicose + 1% outros* |
| | <i>L. satsumensis</i> 18P | 95% α-glicose + 5% outros* |
| KASA | <i>L. satsumensis</i> 10P | 88% α-glicose + 12 outros* |
| | <i>L. satsumensis</i> 10P2 | 99% α-glicose + 1% outros* |
| | <i>L. perolens</i> 11P | 90% α-glicose + 10% outros* |
| | <i>L. perolens</i> 11P3 | 96% α-glicose + 4% outros* |
| | <i>L. perolens</i> 13PA | 92% α-glicose + 8% outros* |
| KAVI | <i>L. mali</i> 19U | 88% α-glicose + 12% outros* |
| | <i>L. mali</i> 21U1 | 99% α-glicose + 1% outros* |
| Grão de Kefir | | Proporção (≈) e Tipo de carboidrato |
| KACU | | 99% α-glicose + 1% outros |
| KASA | | 99% α-glicose + 1% outros |
| KLCU | | Não elucidada (6 diferentes picos na mesma proporção) |
| KLSA | | Não elucidada (6 diferentes picos na mesma proporção) |

*Um ou mais monômeros ainda não identificados e/ou outras conformações

Os EPS de grãos de kefir de água açucarada de Curitiba e Salvador são formados predominantemente por α-glicose e por isso podem ser classificados também como dextrano, com predominância α-D-glicose, com ligações α (1-6). Os dextranos se diferenciam dos outros Hop (mutano e alternano, por exemplo) devido a presença de ramificações e da porcentagem e dos tipos de ligações químicas presentes. Os mutanos, são glucanos insolúveis devido a presença de muitas ligações α-(1→3) e ausência de ligação contínua de α-(1→6); e alternanos por causa da alternância de ligações α-(1→6) por α-(1→3) (Robty, 1998; Leathers e Cotê, 2008).

Os EPS de grãos de leite, KLCU e KLSA, são semelhantes entre si, porém a composição primária não foi elucidada. As amostram apresentam seis picos que podem ser diferentes

carboidratos ou o mesmo carboidrato em diferentes conformações. Na maioria dos estudos, considera-se que o EPS extraído dos grãos de kefir seja o kefirano, que é um heteropolissacarídeo composto por quantidades iguais de glicose e galactose (Rimada e Abraham, 2001; Piermaria et al., 2008b; Ghasemlou et al., 2011).

Paiva e colaboradores (2016) utilizaram a espectroscopia de infra vermelho (NIR) para complementação dos resultados obtidos RMN e distinção de α -glucano. Neste estudo, o EPS 1PS produzido por *L. kefiranofasciens* isolado de kefir de leite é diferente dos EPS 10P e 10P2 produzido por *L. satsumensis* isolados de grãos de kefir de água açucarada, apesar de apresentar a mesma massa molecular.

5.11 Avaliação, *in vitro*, a atividade antagonista das bebidas fermentadas contra alguns patógenos envolvidos em doenças transmitidas por alimentos

A avaliação, *in vitro*, da atividade antagonista das bebidas fermentadas de kefir de leite e de água açucarada contra alguns patógenos frequentemente envolvidos em doenças transmitidas por alimentos foi verificada pela presença de halo de inibição. Quando o teste foi realizado no ágar MRS, observou-se que todas as bebidas fermentadas durante 48 horas, indiferente da região de origem dos grãos, inibiram o crescimento de todos os patógenos. No entanto, quando as bebidas foram previamente filtradas e/ou neutralizadas com NaOH 0,1N (pH=7), não se constatou a presença de halo de inibição. Isso indica que o efeito antagonista pode ser devido a ácidos orgânicos gerados durante a produção da bebida.

A atividade antagonista de kefir já foi anteriormente verificada frente a vários patógenos, tais como *E. coli*, *B. cereus*, *L. monocytogenes*, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *Salmonella Typhi* e *Staphylococcus aureus* (Rodrigues et al., 2005; Ulosoy et al., 2007; Silva et al., 2009; Santos et al., 2013).

Não houve atividade antagonista quando se realizou o mesmo procedimento em ágar BHI. Isto pode ter ocorrido porque bactérias lácticas crescem melhor em ágar MRS do que em ágar BHI. Portanto, a produção de ácidos orgânicos deve estar prejudicada nesse segundo meio e,

consequentemente, a inibição dos patógenos. Dessa forma, esse resultado reforça que a inibição dos patógenos provavelmente pode ser atribuída à produção de metabólitos como os ácidos orgânicos (ácido láctico e acético), que diminuem o pH do meio e agem como substâncias antimicrobianas devido a sua capacidade de acidificação citoplasmática.

A quantidade e os tipos de ácidos orgânicos produzidos durante o processo de fermentação dependem das espécies de micro-organismos e das condições de crescimento. O efeito antimicrobiano dos ácidos orgânicos é devido a redução do pH e também da forma não dissociada que é capaz de difundir na membrana plasmática de modo passivo, diminuindo o pH intracelular (Madgan et al., 2010). O equilíbrio das formas dissociada e não dissociada e a extensão da dissociação depende do pH do meio. Em baixo pH, uma grande quantidade de ácido láctico permanece na forma não dissociada (Partanen et al., 2003).

O kefir de leite apresentou pH em torno de 4,6 e o de água próximo a 4,3, sendo que tais valores podem contribuir com a atividade antimicrobiana dos patógenos avaliados. Outros ácidos orgânicos, como o acético, propiônico e butírico, também podem ser produzidos por via metabólica heterofermentativa (Guzel-Seydim et al., 2000). Eles possuem maior efeito antagônico se comparado ao ácido láctico devido ao maior pKa (láctico (pKa 3,54); acético (pKa 4,75); propiônico (pKa 4,87), butírico (pKa 4,82) (Namazian e Heidary, 2003). O ácido acético pode agir sinergicamente com o ácido láctico diminuindo o pH do meio e consequentemente, aumenta a toxicidade do ácido acético (Adam, 1988).

Garrote e colaboradores (2000) em estudo da ação de ácidos orgânicos, não observaram efeito inibitório quando utilizaram sobrenadantes neutralizados e concluíram que apesar do ácido láctico ser importante para a inibição, a presença de ácido acético potencializa o efeito inibitório.

A membrana plasmática dos micro-organismos é relativamente impermeável aos íons H^+ e OH^- . Dessa forma, a concentração citoplasmática desses íons permanece razoavelmente constante, apesar da grande variação que pode ocorrer no meio extracelular (Madgan et al., 2010). Os ácidos fortes não causam muitos problemas à célula quando comparados aos fracos, pois se dissociam facilmente, liberando prótons, os quais não conseguem se difundir pela membrana,

não alcançando, assim, o citoplasma. Os ácidos fracos são mais danosos por se apresentarem majoritariamente na sua forma não dissociada (em determinados valores de pH) no meio externo e com isso conseguem se difundir pela membrana plasmática. Devido ao pH do citoplasma, o ácido sofre desprotonação e a liberação de H^+ afeta o metabolismo celular ao diminuir o pH intracelular. A acidez citoplasmática pode interferir em processos vitais para a célula como a transcrição do DNA, a síntese de proteínas e as atividades enzimáticas. Dependendo dos danos causados e da capacidade da célula de se adaptar ao aumento da concentração de prótons citoplasmático, os prejuízos causados podem levar à sua inativação (Madgan et al., 2010).

Muitos autores, já atribuíram a atividade inibitória de *Lactobacillus* sobre o crescimento de outros micro-organismos, ao ácido lático. Devido ao pH das bebidas fermentadas de leite e água açucarada (pH 4,6 e 4,3, respectivamente), o ácido lático nas amostras apresenta-se na forma não dissociada e sendo portanto, capaz de penetrar na membrana plasmática e causar a acidificação intracelular.

5.12 Ação protetora de *Lactobacillus* spp. e seus respectivos EPS sobre a adesão e invasão de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis em cultura de células CACO-2/TC7

A adesão e a invasão de *Salmonella* spp. no epitélio intestinal representam um passo crítico para o início do processo de infecção (Londero et al., 2014). Assim, a ação protetora de *Lactobacillus* spp. isolados de grãos de kefir e de EPS produzidos por estes e extraídos dos grãos de kefir de leite e de água açucarada foi avaliada em células Caco-2/TC7. Não se observou diminuição da adesão de *S. Enteritidis* às células Caco2-TC7, quando tratadas previamente (1h, 37°C) com *Lactobacillus* spp. (Figura 18), demonstrando ausência de efeito protetor dos isolados nas condições avaliadas.

Em contrapartida, uma ação protetora da adesão de *S. Enteritidis* foi verificada quando se testou alguns EPS produzidos pelos isolados 10P, 18P e 11P3 e extraídos dos grãos KACU, KASA, KLCU e KLSA (Figura 19). A capacidade do EPS de aderir às bactérias ou enterócitos poderia ser responsável pelo efeito protetor observado, por interferir em algum sítio de ligação sobre a superfície da célula eucariótica (Abraham et al., 2010).

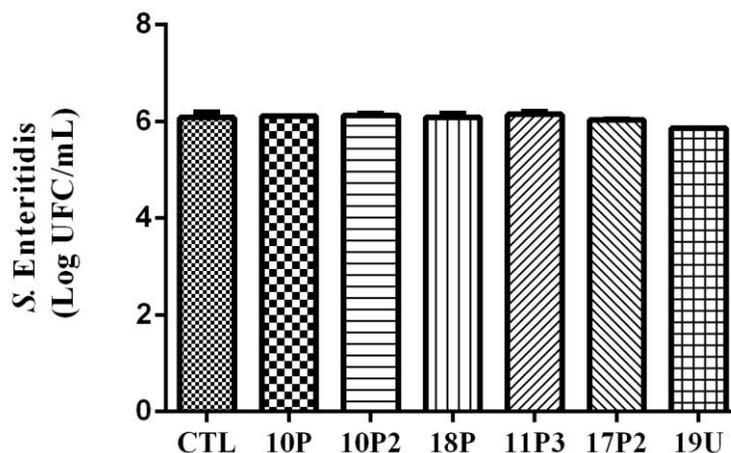


Figura 18 – Densidade (\log_{10} UFC/mL) de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis aderida em células Caco-TC7 previamente incubadas (1h, 37°C) na presença ou não de *Lactobacillus* spp. isolados de kefir.

Legenda: CTL: Controle; 10P, 10P2, 18P: *L. satsumensis*; 11P3 e 17P2: *L. perolens*; 19U: *L. mali*)

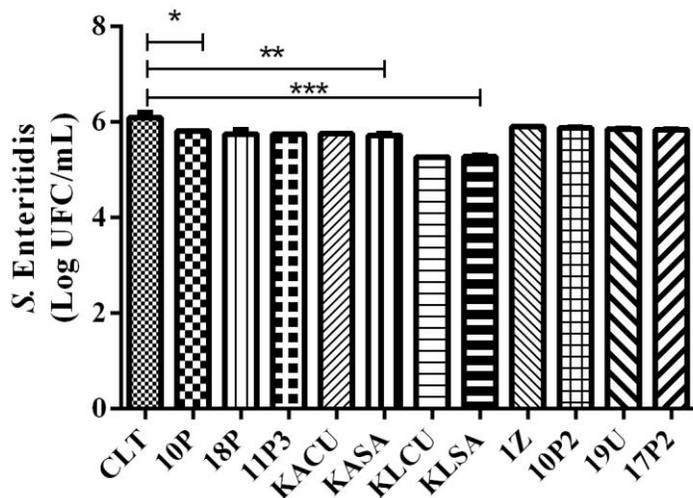


Figura 19 – Densidade (\log_{10} UFC/mL) de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis aderidas em células Caco-TC7 previamente incubadas ou não (CTL) com EPS produzidos por *Lactobacillus* spp. (10P, 18P, 11P3, 1Z, 10P2, 19U e 17P2) isolados de grãos de kefir ou extraídos de grãos de água (KACU e KASA) e de leite (KLCU e KLSA). * ($P < 0,05$) ** ($P < 0,01$) *** ($P < 0,001$)

Observou-se também uma redução do número de *S. Enteritidis* que invadiram as células Caco2-TC7 previamente incubadas com lactobacilos isolados de grãos de kefir de água açucarada

(Figura 20), com EPS produzidos por esses isolados ou com EPS extraídos dos grãos de kefir de água açucarada e de leite de Curitiba e Salvador (Figura 21).

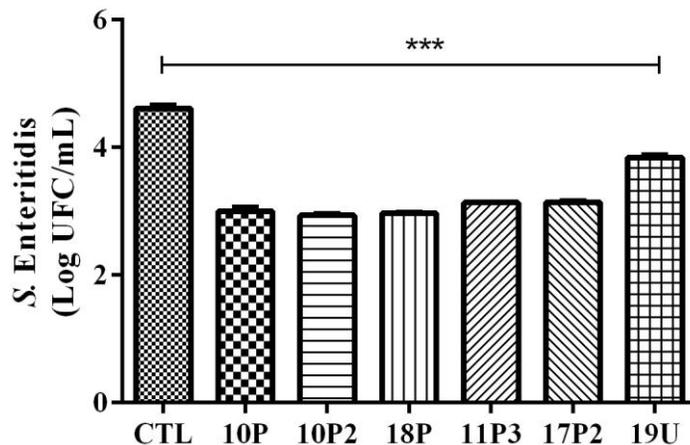


Figura 20 – Densidade (\log_{10} UFC/mL) de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis invadindo células Caco-TC7 previamente incubadas (1h, 37°C) ou não (CTL) com *Lactobacillus* 10P, 10P2, 18P: *L. satsumensis*; 11P3 e 17P2: *L. perolens*; 19U: *L. mali*. *** ($P < 0,001$)

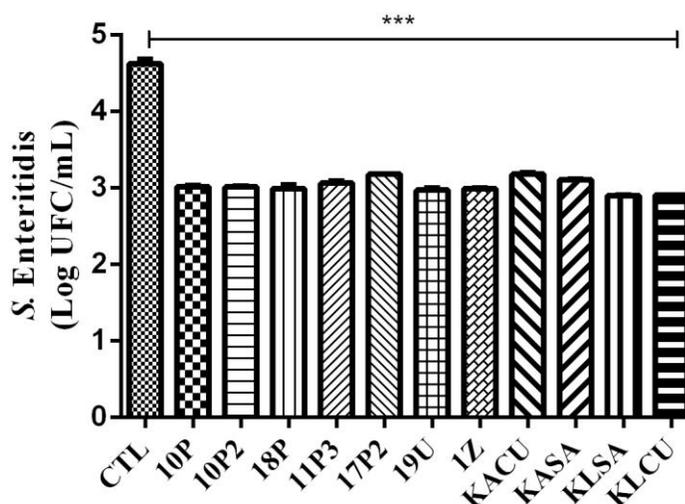


Figura 21 – Densidade (\log_{10} UFC/mL) de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis invadindo células Caco-TC7 previamente incubadas (1h, 37°C) ou não (CTL) com EPS produzido por *Lactobacillus* spp. (*L. satsumensis* (10P, 10P2 e 18P); *L. perolens* (11P3 e 17P2); *L. mali* (19U)); *L. diolivorans* (1Z) ou extraídos de grãos de kefir de água (KACU e KASA) e de leite (KLSA). *** ($P < 0,001$)

A capacidade de prevenção da adesão e da invasão de *S. Enteritidis* em células Caco2/TC7 pode ser influenciada pela capacidade de adesão e enumeração de BAL (Golowczyc et al., 2007; Londero et al., 2014). Aparentemente, quando se aumenta a proporção entre probiótico e patógeno, a capacidade de adesão e invasão deste último diminui, ou seja, a capacidade de proteção das células epiteliais do intestino contra a invasão de *Salmonella* spp. é dose dependente (Coconnier et al., 1993; Londero et al., 2014). Londero et al. (2014) demonstraram que não houve proteção das células Caco-2/TC7 por BAL e leveduras de soro lácteo fermentado com grãos de kefir nas concentrações respectivas de 10^7 UFC/mL e 10^6 UFC/mL contra a adesão e a invasão de *S. Enteritidis*, enquanto que o efeito protetor foi observado quando utilizou-se concentração dez vezes maior dos micro-organismos probiótico.

Neste trabalho nós demonstramos que *L. satsumensis* 10P, 10P2 e 18P, *L. perolens* 11P3 e 17P2 e *L. mali* 19U são capazes de antagonizar a invasão de *S. enterica* sorovar Enteritidis *in vitro*, o que demonstra que podemos obter um kefir com propriedades probióticas se utilizarmos essas estirpes como culturas iniciadoras (Figura 20).

Os EPS extraídos das culturas e dos grãos de kefir exerceram um efeito inibitório *in vitro* sobre a adesão e invasão de *S. enterica* sorovar Enteritidis em células Caco-2/TC-7 (Figura 19 e 21) enquanto, paradoxalmente, os lactobacilos produtores somente protegem contra a invasão (Figura 20). A diminuição da adesão do enteropatógeno parece estar relacionada à presença do EPS e como os lactobacilos foram cultivados em meio MRS sem adição de sacarose (carboidrato indutor) isto pode desfavorecer a produção de EPS. Assim, experimentos nos quais os lactobacilos sejam cultivados em meio contendo sacarose antes da inoculação na cultura de células podem ajudar a esclarecer o fenômeno.

Embora o mecanismo protetor ainda não seja compreendido, sugere-se que os EPS poderiam agir bloqueando os receptores na superfície de células eucarióticas, conforme o efeito protetor proposto por Ruas-Madiedo e colaboradores (2010). As infecções por *Salmonella* são iniciadas quando o patógeno invade o epitélio intestinal. As células M representam a principal porta de entrada (Kaufmann et al., 2001). As membranas apicais de células M são relativamente acessíveis para bactérias presentes no lúmen uma vez que possuem quantidades reduzidas de

muco e IgA. A acessibilidade à superfície das células M é reforçada pela presença de uma borda irregular e um glicocálix mais fino do que dos enterócitos vizinhos. As microvilosidades irregulares das células M também tornam a superfície apical destas células mais maleável do que a dos enterócitos e isto pode facilitar os rearranjos do citoesqueleto e membrana que são necessários para a invasão eficiente da *Salmonella* (Jepson e Clark, 2001).

A *Salmonella* induz o englobamento celular e a formação do vacúolo. O vacúolo é direcionado para a porção basal e a bactéria é exocitada e em seguida fagocitada pelo macrófago. No macrófago ela se multiplica e induz a apoptose do mesmo, pela ativação da caspase-1. Tem-se uma resposta inflamatória inicial induzida pela produção de IL-1 e IL-18. Esta resposta inflamatória inicial é ainda agravada por uma infinidade de citocinas, a maioria das quais são induzidas por LPS. Após a lise do macrófago, a bactéria é liberada e a mesma induz a sua penetração na porção basal dos enterócitos, com formação de vacúolo. É um patógeno intracelular que se dissemina para as células adjacentes a medida que as células hospedeiras morrem. Outra forma de disseminação é através das células dendríticas (Kaufmann et al., 2001).

5.13 Micro-organismos metabolicamente ativos no kefir de leite e de água açucarada

Kefir é um produto lácteo fermentado que é produzido por uma mistura de bactérias produtoras de ácidos láctico e acético e de leveduras (Kim et al. 2015). As comunidades microbianas ativas nos grãos de kefir de leite e de água de Curitiba (KLCU e KACU) e Salvador (KLSA e KASA) foram identificadas por meio de análise de similaridade dos *reads* transcritos com as sequências de nucleotídeos presentes no banco de dados, Refseq-genomic, do National Center for Biotechnology Information (NCBI). Considerou-se que o *read* transcrito é similar ao de uma determinada espécie quando apresentou índice de identidade e cobertura superior a 95%. Quando o *read* apresentou índice inferior a 95% os mesmos foram considerados não classificados.

A comunidade de bactérias ativas no kefir de leite de Curitiba (KLCU), determinada por meio da abundância relativa (%), é formada por bactérias lácticas e acéticas (Figura 22). Foi observada uma maior prevalência de bactérias lácticas (70,18%) do que de bactérias acéticas (3,10%).

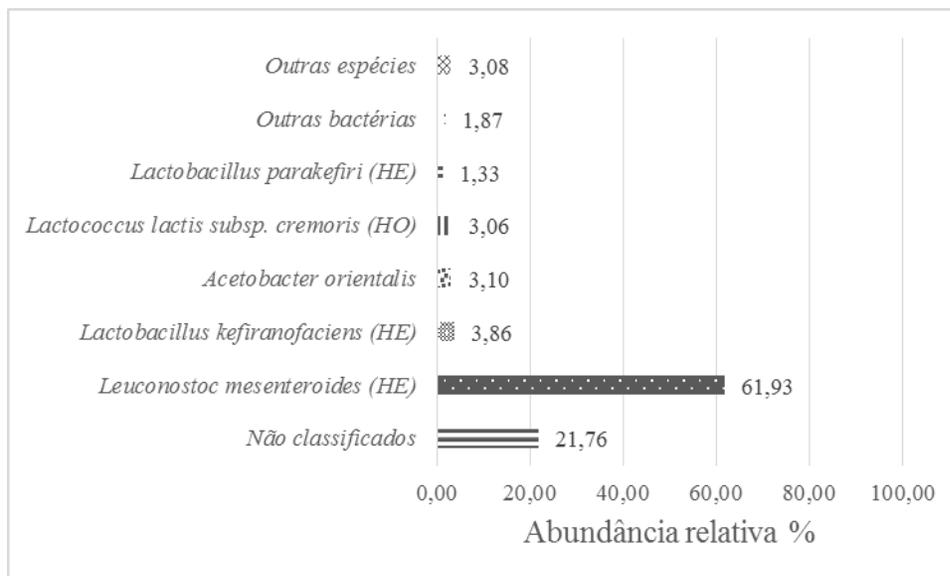


Figura 22 - Abundância relativa (%) de espécies bacterianas ativas no kefir de leite de Curitiba (KLCU).

Legenda: (HE) heterofermentativa; (HO) homofermentativa

As bactérias do ácido lático apresentam a característica de produzir ácido lático a partir de hexoses e, por serem organismos fermentadores, obtêm sua energia a partir da fosforilação de substratos durante a oxidação de carboidratos. Os organismos homofermentativos (HO) contribuem exclusivamente com a produção de ácido lático e consequentemente com a acidificação do meio, enquanto os heterofermentativos (HE) contribuem além da produção de ácido lático, com a formação de etanol e gás carbônico. Quando os HE utilizam o citrato como fonte de carbono, produzem diacetil e a acetoína que são substâncias responsáveis por parte do aroma e sabor de diversos derivados do lácteos (Jay, 2005; Bosh et al., 2006; Mendes et al., 2008; Choi et al., 2012; Van der Borgert et al., 2013; Anandharaj e Sivasankari, 2014; Capuani et al., 2014).

Leuconostoc mesenteroides é a espécie predominante (61,93%) no kefir de leite produzido com grãos provenientes de Curitiba (Figura 22). Esta espécie é heterofermentativa, possui grande importância na produção de *flavor* de alimentos fermentados e a capacidade de produzir o exopolissacarídeo glucano, contendo principalmente ligações glicosídicas α -1,6 com

ramificações em α -1,3. Este EPS possui aplicação promissora como espessante para melhoria da textura de produtos lácteos (Jung et al. 2014; Kang et al. 2014). A capacidade de produção de EPS também pode ser atribuída as espécies *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* e *Lactobacillus parakefiri* (De Vuyst e Degeest, 1999; Wang et al., 2011; Paulo et al., 2012; Abraham, 2012).

A presença de bactérias ácido acéticas (BAA) em kefir já foi descrita em vários trabalhos, inclusive no Brasil, porém a sua relevância ainda é pouco discutida (Magalhães et al. 2010; Magalhaes et al. 2011; Altay et al. 2013). A produção do ácido acético pode contribuir com a atividade antagonista contra micro-organismos patogênicos devido a redução do pH do meio e também da forma não dissociada que é capaz de difundir na membrana plasmática de modo passivo, diminuindo o pH intracelular (citoplasma) do patógeno (Madgan et al. 2010). Porém, o mesmo não possui apenas um papel positivo na produção de alimentos fermentados, uma vez que o pode produzir um *off-flavor* de vinagre, o que pode influenciar nas características sensoriais de bebidas fermentadas (Sengun e Karabiyikli, 2011).

As BAA são bactérias quimiorganotróficas, que produzem altas concentrações de ácido acético a partir de etanol. São Gram negativo, aeróbicas, não formadoras de esporos, com forma de bastonete, de ocorrência única, em pares ou em cadeias. Possuem temperatura ótima de crescimento entre 25°C e 30°C e pH ótimo entre 5,0 e 6,5, enquanto algumas estirpes podem crescer em valores mais baixos de pH entre 3,0 e 4,0 (Sengun e Karabiyikli, 2011).

Na classificação atual, BAA pertencem à família *Acetobacteraceae* e os gêneros *Acetobacter* e *Gluconobacter* são os que possuem mais espécies identificadas (Garrity et al., 2004). A principal diferença fisiológica entre estes gêneros se deve ao fato do *Acetobacter* oxidar o etanol em ácido acético e, subsequentemente, completar a oxidação de ácido acético em água e gás carbônico. Por outro lado, o gênero *Gluconobacter* é incapaz de realizar a oxidação completa do ácido acético. Isto ocorre porque as BAA têm duas enzimas que desempenham um papel no processo de oxidação, a álcool desidrogenase e a aldeído desidrogenase. A atividade da enzima álcool desidrogenase de *Acetobacter* é mais estável sob ácido acético do que a de

Gluconobacter, o que explica a maior produção de ácido acético por *Acetobacter* (Sengun e Karabiyikli, 2011).

Outras 94 espécies e dois gêneros de bactérias também estão ativas no kefir, porém estão presentes em menor quantidade (1,87%) (Figura 22). Estes micro-organismos são: *Acetobacter* sp. (0,16%), *Lactobacillus kefiri* (0,16%), *Lactobacillus plantarum* (0,14%), *Acetobacter ghanensis* (0,13%), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (0,13%), *Lactobacillus helveticus* (0,12%), *Leuconostoc pseudomesenteroides* (0,11%), *Tetragenococcus muriatricus* (0,09%), *Leuconostoc inhae* (0,09%), *Acetobacter pasteurianus* (0,07%), *Acetobacter tropicalis* (0,07%), *Acetobacter syzygii* (0,05%), *Acetobacter malorum* (0,04%), *Leuconostoc argentinum* (0,04%), *Gluconobacter oxydans* (0,04%), *Pediococcus damnosus* (0,03%), *Leuconostoc gasicomitatum* (0,03%), *Komagataeibacter intermedius* (0,02%), *Acetobacter cibirongensis* (0,02%), *Leuconostoc gelidum* (0,02%), *Lactobacillus parabuchneri* (0,02%), *Gluconacetobacter europaeus* (0,02%), *Weissella paramesenteroides* (0,017%), *Lactobacillus collinoides* (0,017%), *Lactobacillus paracasei* (0,014%), *Gluconacetobacter xylinus* (0,012%), *Lactobacillus buchneri* (0,012%), *Acetobacter senegalensis* (0,010%), *Lactobacillus brevis* (0,010%), *Komagataeibacter xylinus* (0,008%), *Acetobacter nitrogenifigen* (0,008%), *Acetobacter aceti* (0,007%), *Gluconobacter japonicus* (0,007%), *Lactobacillus parafarraginis* (0,007%), *Leuconostoc carnosum* (0,006%), *Bacillus cereus* (0,006%), *Lactobacillus gallinarum* (0,006%), *Lactobacillus coryniformis* (0,005%), *Weissella hellenica* (0,005%), *Streptococcus macedonicus* (0,005%), *Acetobacter pomorum* (0,005%), *Lactobacillus paucivorans* (0,005%), *Lactobacillus equigenerosi* (0,005%), *Lactobacillus sakei* (0,005%), *Leuconostoc citreum* (0,004%), *Enterococcus faecalis* (0,004%), *Weissella* sp. (0,004%), *Gluconacetobacter hansenii* (0,004%), *Acetobacter cerevisiae* (0,004%), *Gluconobacter albidus* (0,004%), *Lactobacillus kisonensis* (0,004%), *Lactococcus lactis* (0,003%), *Lactobacillus acetotolerans* (0,003%), *Acetobacter indonesiensis* (0,003%), *Lactococcus raffinolactis* (0,0035), *Enterococcus malodoratus* (0,002%), *Lactobacillus malefermentans* (0,002%), *Lactobacillus dextrinicus* (0,002%), *Lactococcus garvieae* (0,002%), *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (0,002%), *Pediococcus lolii* (0,002%), *Lactobacillus mali* (0,002%), *Lactobacillus sunkii* (0,002%), *Lactobacillus casei* (0,002%), *Acetobacter orleanensis* (0,002%), *Komagataeibacter europaeus* (0,0015%), *Lactobacillus fermentum* (0,0014%), *Gluconobacter cerinus* (0,001%),

Lactobacillus versmoldensis (0,001%), *Lactobacillus acidipiscis* (0,001%), *Lactobacillus rhamnosus* (0,001%), *Leuconostoc lactis* (0,0009%), *Gluconacetobacter diazotrophicus* (0,0008%), *Lactobacillus mindensis* (0,0007%), *Lactobacillus paralimentarius* (0,0007%), *Lactobacillus namurensis* (0,0007%), *Lactobacillus pentosus* (0,0006%), *Gluconacetobacter oboediens* (0,0006%), *Streptococcus thermophilus* (0,0005%), *Gluconobacter thailandicus* (0,0004%), *Enterococcus durans* (0,0003%), *Pediococcus acidilactici* (0,0003%), *Leuconostoc kimchii* (0,0003%), *Listeria monocytogenes* (0,0002%), *Pediococcus claussenii* (0,0002%), *Lactobacillus crustorum* (0,0002%), *Lactobacillus zeae* (0,0002%), *Streptococcus agalactiae* (0,0002%), *Propionibacterium acnes* (0,0002%), *Lactobacillus paracollinoides* (0,0001%), *Lactobacillus paraplantarum* (0,0001%), *Lactobacillus fructivorans* (0,0001%), *Lactobacillus oligofermentans* (0,0001%), *Lactobacillus* sp. (0,0001%), *Streptococcus gallolyticus* (0,0001%) e *Weissella cibaria* (0,0001%). Entre estes, destaca-se os micro-organismos patogênicos *Bacillus cereus* (intoxicação e infecção alimentar) e *Listeria monocytogenes* (infecção alimentar).

As outras espécies identificadas (3,08%) na amostra são leveduras, fungos filamentosos e outros organismos. Os *reads* não classificados (21,76%) (Figura 22) são constituídos pelos *reads* que apresentaram identidade inferior a 95% e os não mapeados.

Em relação as leveduras, no KLCU, observa-se maior atividade da *Yarrowia lipolytica* (9,43%) e *Saccharomyces cerevisiae* (3,41%) (Figura 23). *Yarrowia lipolytica* é uma levedura estritamente aeróbia, heterolática e incapaz de crescer acima 32°C. O nome da espécie se origina da sua capacidade de hidrolisar lipídeos, embora também possa hidrolisar proteínas. Foi classificada como micro-organismo geralmente considerado como seguro (GRAS) pela American Food and Drug Administration (FDA) para a produção de ácido cítrico. Na natureza, as estirpes de *Y. lipolytica* são muitas vezes isoladas de produtos lácteos e em meios ricos em lipídeos (Nicaud, 2012). Uma vez que no cultivo dos grãos foi utilizado leite desnatado, a presença desta levedura pode ser justificada pela atividade proteolítica.

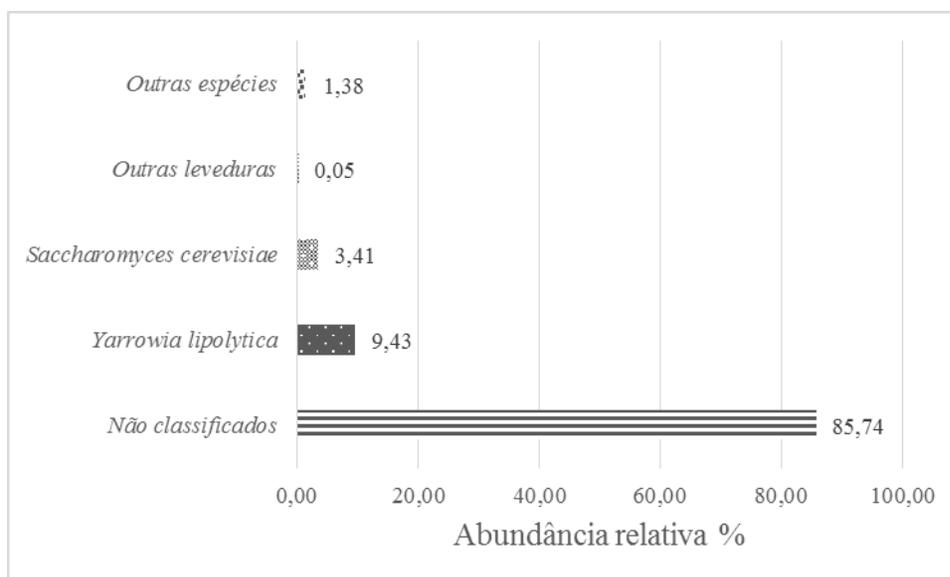


Figura 23 - Abundância relativa (%) de espécies de leveduras ativas no kefir de leite de Curitiba (KLCU).

S. cerevisiae já foi isolada a partir de vários tipos de alimentos fermentados. Estes alimentos fermentados podem ser divididos em três grupos, fermentado amiláceo não-alcoólico, bebidas alcoólicas e leite fermentado. As possíveis funções da *S. cerevisiae* nestes alimentos são: produção de compostos de aroma (ésteres, álcoois, ácidos orgânicos, aldeídos, cetonas entre outros), fermentação de carboidratos com formação de álcoois, estimulação das bactérias produtoras de ácido láctico proporcionando metabólitos essenciais (piruvato, aminoácidos e vitaminas) e até mesmo propriedades probióticas. De modo geral, *S. cerevisiae* é incapaz de crescer em leite. No entanto, isolados podem metabolizar lactato e serem cultivados em meio contendo galactose (Jespersen, 2003).

A presença de *S. cerevisiae* exerce um efeito positivo sobre o crescimento e produção de kefirano por *L. kefiranofaciens*, quando comparado com a cultura pura. A principal explicação é devido a remoção contínua do ácido devido ao consumo do mesmo por *S. cerevisiae* o que mantém o pH do meio mais elevado, favorecendo a condição ótima para produção de kefirano por *L. kefiranofaciens* que é em pH 5 (Cheirsilp et al., 2003).

As outras espécies de leveduras identificadas (0,05%) foram *Pichia kluyveri* (0,04%) e *Vanderwaltozyma polyspora* (0,01%), embora a maioria dos *reads* não tenham sido classificados (85,74%). As outras espécies identificadas (1,38%) são constituídas por bactérias e outros organismos distintos (Figura 23).

A comunidade de bactérias ativas no kefir de leite de Salvador (KLSA), determinada por meio da abundância relativa (%), é formada por bactérias lácticas e acéticas (Figura 24). Observando-se uma maior prevalência de bactérias lácticas (67,69%) do que de bactérias acéticas (1,03%).

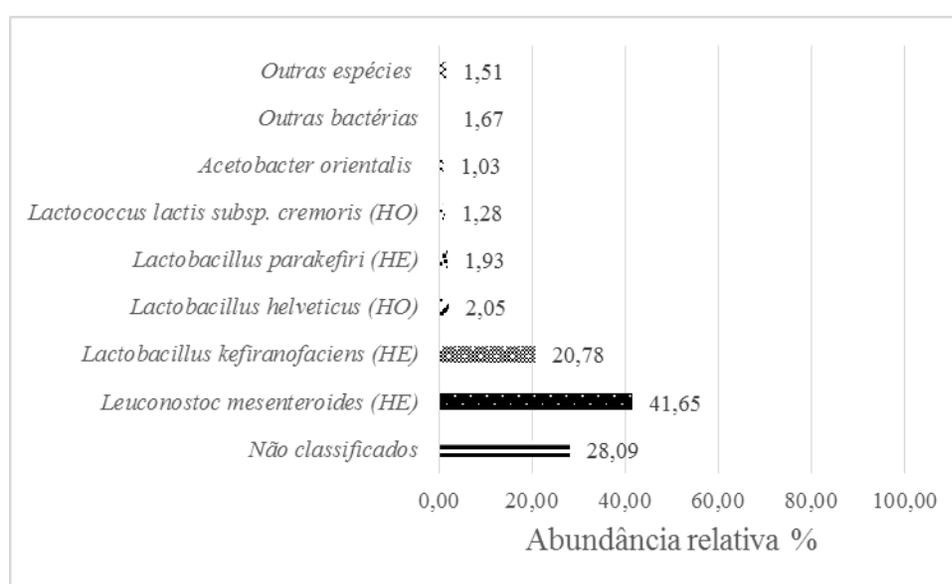


Figura 24 - Abundância relativa (%) de espécies bacterianas ativas no kefir de leite de Salvador (KLSA).

Legenda: (HE) heterofermentativa; (HO) homofermentativa

De modo geral, as bactérias ativas no grão de KLSA assemelham-se às encontradas no KLCU, destacando-se a espécie *Leuconostoc mesenteroides* e *Lactobacillus kefiranofaciens*. Uma maior atividade destes micro-organismos pode estar relacionada à maior capacidade de produção do EPS kefirano.

Outras 75 espécies e 2 gêneros de bactérias também estão ativas no kefir, porém estão presentes em menor quantidade (1,67%) (Figura 24). Estas bactérias são: *Lactobacillus kefiri* (0,23%), *Leuconostoc pseudomesenteroides* (0,19%), *Leuconostoc gelidum* (0,19%), *Lactobacillus*

fermentum (0,13%), *Lactobacillus rhamnosus* (0,12%), *Lactobacillus parabuchneri* (0,10%), *Lactobacillus gallinarum* (0,08%), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (0,06%), *Streptococcus macedonicus* (0,06%), *Leuconostoc inhae* (0,06%), *Leuconostoc argentinum* (0,06%), *Lactobacillus brevis* (0,04%), *Lactobacillus acetotolerans* (0,035%), *Lactobacillus collinoides* (0,02%), *Leuconostoc gasicomitatum* (0,02%), *Lactobacillus coryniformis* (0,018%), *Lactobacillus paracasei* (0,016%), *Pediococcus damnosus* (0,015%), *Bifidobacterium crudilactis* (0,015%), *Tetragenococcus muriaticus* (0,014%), *Lactobacillus parafarraginis* (0,013%), *Lactobacillus paucivorans* (0,013%), *Lactobacillus buchneri* (0,012%), *Lactobacillus gasseri* (0,012%), *Enterococcus faecalis* (0,010%), *Lactobacillus delbrueckii* (0,010%), *Lactobacillus casei* (0,001%), *Lactobacillus amylovorus* (0,008%), *Lactobacillus kisonensis* (0,008%), *Lactobacillus hilgardii* (0,007%), *Lactobacillus amyolyticus* (0,007%), *Lactobacillus sunkii* (0,006%), *Gluconobacter oxydans* (0,005%), *Leuconostoc carnosum* (0,004%), *Acetobacter tropicalis* (0,004%), *Acetobacter malorum* (0,004%), *Acetobacter* sp. (0,004%), *Lactobacillus namurensis* (0,003%), *Acetobacter cebinongensis* (0,003%), *Enterococcus faecium* (0,003%), *Lactobacillus equigenerosi* (0,003%), *Enterococcus malodoratus* (0,003%), *Weissella* sp. (0,003%), *Leuconostoc citreum* (0,003%), *Lactococcus lactis* (0,003%), *Lactobacillus plantarum* (0,003%), *Lactobacillus lindneri* (0,002%), *Lactobacillus acidophilus* (0,002%), *Pediococcus acidilactici* (0,002%), *Lactobacillus nagelii* (0,002%), *Komagataeibacter intermedius* (0,002%), *Lactobacillus paracollinoides* (0,002%), *Lactobacillus versmoldensis* (0,002%), *Gluconacetobacter hansenii* (0,002%), *Acetobacter pasteurianus* (0,002%), *Lactobacillus oeni* (0,002%), *Lactobacillus paralimentarius* (0,002%), *Pediococcus inopinatus* (0,001%), *Acetobacter senegalensis* (0,001%), *Gluconobacter japonicus* (0,001%), *Oenococcus oeni* (0,001%), *Lactobacillus crispatus* (0,001%), *Lactobacillus mali* (0,001%), *Lactobacillus senmaizukei* (0,0007%), *Leuconostoc fallax* (0,0007%), *Lactobacillus hordei* (0,0006%), *Acetobacter ghanensis* (0,0005%), *Lactobacillus amylotrophicus* (0,0005%), *Lactobacillus satsumensis* (0,0005%), *Pediococcus claussenii* (0,0005%), *Acetobacter aceti* (0,0004%), *Acetobacter cerevisiae* (0,0004%), *Lactobacillus suebicus* (0,0004%), *Lactobacillus mindensis* (0,0003%), *Leuconostoc lactis* (0,0002%), *Lactobacillus curvatus* (0,0001%) e *Oenococcus kitaharae* (0,0001%).

As outras espécies identificadas (1,51%) na amostra são leveduras, fungos filamentosos e outros organismos. Os *reads* não classificados (28,09%) (Figura 24) são constituídos pelos *reads* que apresentaram identidade inferior a 95% e os não mapeados.

Em relação às leveduras, no KLSA observa-se maior atividade da *Yarrowia lipolytica* (10,21%) e *Saccharomyces cerevisiae* (1,70%). As outras espécies identificadas (0,32%) são constituídas por bactérias e outros organismos distintos (Figura 25).

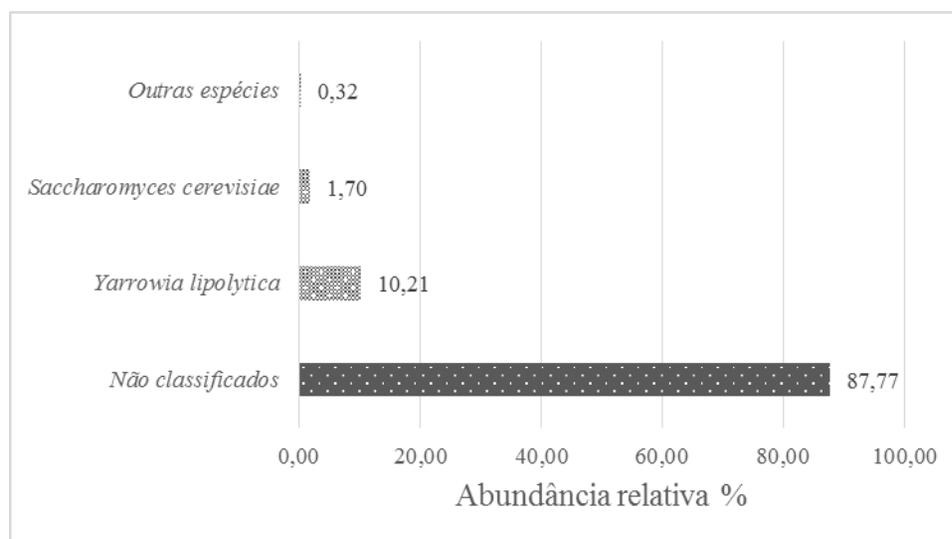


Figura 25 - Abundância relativa (%) de espécies de leveduras ativas no kefir de leite de Salvador (KLSA).

Assim como as BAL, as leveduras ativas no KLSA também assemelham-se às encontradas no KLCU e desta maneira, pode-se considerar que a comunidade ativa nas bebidas fermentadas de leite apresenta uma grande diversidade de BAL e algumas espécies de BAA e leveduras. A espécie *Yarrowia lipolytica* nunca haviam sido relatadas em estudos anteriores em kefir de leite.

A diversidade de micro-organismos já foi estudada por Magalhães e colaboradores (2011) que identificaram no kefir brasileiro as seguintes espécies de BAL: *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus parabuchneri*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus casei* e *Lactococcus lactis*; de BAA: *Acetobacter lovaniensis*; e leveduras: *Kluyveromyces lactis*, *Kazachstania aeróbia*, *Lachancea meyersii* e *Saccharomyces cerevisiae*.

Leite e colaboradores (2013b) também avaliando as comunidades microbianas de kefir brasileiro, por PCR, identificaram as bactérias *L. kefiranofaciens*, *Lactobacillus kefir* e *Lactobacillus parakefiri*; e a levedura *S. cerevisiae*.

Os dados referentes a BAL, BAA e leveduras são complementares aos encontrados por Zanirati e colaboradores (2015) que isolaram gêneros *Lactobacillus* e *Lactococcus* em grãos de kefir de leite do Brasil. Na amostra KLCU foram identificadas as espécies: *Lactobacillus kefir* (38%), *Lactococcus lactis* (31%), *Lactobacillus kefiranofaciens* (25%) e *Lactobacillus satsumensis* (6%). Na amostra KLSA: *Lactococcus lactis* (69%), *Lactobacillus casei* (13%), *Lactobacillus kefir* (6%), *Lactobacillus mali* (6%) e *Lactobacillus satsumensis* (6%).

Nas duas amostras de kefir de leite analisadas neste trabalho, de modo geral, o número de microorganismos metabolicamente ativos é relativamente pequeno se comparado à grande diversidade microbiana identificada nessas amostras e, diante disso, poderia-se propor a criação de cultura mista iniciadora para produção de kefir de leite. Esta cultura mista deveria ser composta por BAL e leveduras. A partir dos resultados observados neste trabalho, poderia-se propor uma cultura iniciadora para produção de kefir de leite que tivesse em sua composição as seguintes espécies de BAL: *L. mesenteroides*, *L. kefiranofaciens*, *L. helveticus* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*; e as leveduras: *Yarrowia lipolytica* e *Saccharomyces cerevisiae*.

Tal proposta, apresenta pequenas diferenças em relação à composição da cultura iniciadora de uma marca comercial (Clerici Sacco, Cadorago, Itália), não comercializada no Brasil, cuja descrição é composta por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis diacetylactis*, *Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc* spp. e levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Clerici Sacco, 2011).

A comunidade de bactérias ativas no kefir de água açucarada de Curitiba (KACU), determinada por meio da abundância relativa (%), é formada por bactérias lácticas e acéticas (Figura 26). Observando-se uma maior prevalência de bactérias lácticas (22,38%) do que de bactérias acéticas (8,13%).

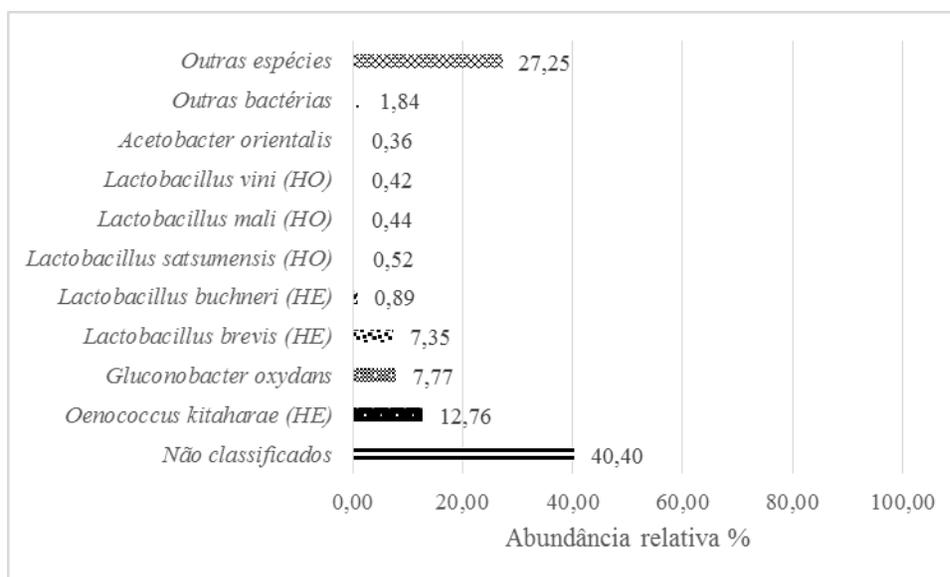


Figura 26 - Abundância relativa (%) de espécie bacterianas ativas no kefir de água de Curitiba (KACU).

Entre as BAL, destacam-se as espécies *Oenococcus kitaharae*, *Lactobacillus brevis* e *Lactobacillus buchneri*. *O. kitaharae* é uma bactéria heterofermentativa, que produz ácido lático, dióxido de carbono e etanol ou ácido acético a partir de D-glucose e vários outros carboidratos como D-frutose, D-galactose, D-manose, maltose, melibiose e D-trealose. No entanto, não produz ácido a partir de sacarose, lactose, amido, L-arabinose, D-xilose, L-ramnose, D-melezitose, D-manitol ou D-sorbitol e é incapaz de formar dextrano a partir de sacarose (Endo e Okada, 2006). Em cultivo em placa, as colônias podem ser visualizadas em ágar MRS depois de sete dias de incubação à temperatura de 30°C, em aerobiose, não foi observado crescimento nas temperaturas de 15°C e 37°C (Endo e Okada, 2006). Esta condição de cultivo difere da metodologia que normalmente é utilizada para BAL, na qual se considera a incubação das placas em temperatura de 37°C durante 48 horas, em aerobiose. Este fato pode explicar a não identificação desta espécie por Zanirati e colaboradores (2015), que identificaram na amostra KACU apenas as espécies *Lactobacillus perolens* (34%), *Lactococcus lactis* (33%), *Lactobacillus casei* (11%), *Lactobacillus satsumensis* (11%) e *Lactobacillus parafarragini* (11%). Assim, caso se queira isolar este micro-organismo para estudos posteriores a partir de KACU, as condições ótimas de crescimento são temperatura de 30°C e pH entre 6,0 e 6,8 (Endo e Okada, 2006).

L. buchneri é uma espécie heterofermentativa que se destaca pela produção de ácido láctico, etanol, ácido acético, CO₂ e H₂ em pH 4,0. Utiliza uma gama de carboidratos como substratos, incluindo glicose e xilose, e possui alta tolerância ao etanol. Apresenta também propriedades probióticas de redução do colesterol, tolerância ao ácido e bile e atividade antimicrobiana (Elferink et al. 2001; Zeng et al. 2010; Liu et al. 2011).

Outras 69 espécies e 3 gêneros de bactérias também estão ativas no kefir, porém estão presentes em menor quantidade (1,84%) (Figura 26). Estas bactérias são: *Lactobacillus hilgardii* (0,35%), *Gluconobacter japonicus* (0,26%), *Acetobacter* sp. (0,17%), *Staphylococcus aureus* (0,16%), *Gluconacetobacter xylinus* (0,11%), *Gluconobacter roseus* (0,10%), *Lactobacillus plantarum* (0,09%), *Acetobacter ghanensis* (0,07%), *Lactobacillus parafarraginis* (0,04%), *Gluconacetobacter hansenii* (0,04%), *Gluconacetobacter europaeus* (0,04%), *Pediococcus damnosus* (0,04%), *Lactobacillus collinoides* (0,03%), *Gluconobacter albidus* (0,03%), *Acetobacter syzygii* (0,03%), *Lactobacillus helveticus* (0,02%), *Lactobacillus kefiranofaciens* (0,02%), *Gluconobacter frateurii* (0,02%), *Komagataeibacter xylinus* (0,02%), *Pediococcus claussenii* (0,02%), *Lactobacillus rhamnosus* (0,017%), *Gluconacetobacter oboediens* (0,014%), *Acetobacter indonesiensis* (0,014%), *Acetobacter tropicalis* (0,01%), *Stenotrophomonas maltophilia* (0,01%), *Lactobacillus* sp. (0,01%), *Gluconobacter thailandicus* (0,009%), (0,009%), *Lactobacillus paracollinoides* (0,008%), *Acetobacter malorum* (0,007%), *Oenococcus oeni* (0,007%), *Leuconostoc mesenteroides* (0,006%), *Lactobacillus coryniformis* (0,006%), *Lactobacillus salivarius* (0,004%), *Clostridium difficile* (0,004%), *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (0,003%), *Pediococcus inopinatus* (0,003%), *Lactobacillus oryzae* (0,003%), *Komagataeibacter hansenii* (0,003%), *Lactobacillus nagelii* (0,003%), *Lactobacillus uvarum* (0,002%), *Gluconacetobacter* sp. (0,003%), *Lactobacillus fermentum* (0,002%), *Acetobacter pasteurianus* (0,002%), *Acetobacter senegalensis* (0,002%), *Lactobacillus hordei* (0,002%), *Lactobacillus paracasei* (0,002%), *Bacillus gaemokensis* (0,002%), *Komagataeibacter europaeus* (0,001%), *Lactobacillus casei* (0,001%), *Gluconacetobacter diazotrophicus* (0,001%), *Bacillus amyloliquefaciens* (0,001%), *Gluconacetobacter rhaeticus* (0,001%), *Lactobacillus rossiae* (0,001%), *Lactobacillus acidifarinae* (0,001%), *Komagataeibacter intermedius* (0,001%), *Lactobacillus capillatus* (0,0001%), *Acetobacter aceti* (0,0008%), *Acetobacter cibinongensis* (0,0007%), *Acetobacter nitrogenifigens* (0,0007%), *Gluconobacter*

cerinus (0,0006%), *Lactobacillus siliginis* (0,0006%), *Acidomonas methanolica* (0,0006%), *Lactobacillus parabuchneri* (0,0006%), *Lactobacillus curvatus* (0,0004%), *Lactobacillus acidophilus* (0,0003%), *Enterococcus faecalis* (0,0003%), *Tistrella mobilis* (0,0003%), *Acetobacter orleanensis* (0,0002%), *Lactobacillus fabifermentans* (0,0002%), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (0,0001%) e *Lactobacillus amylovorus* (0,00001%).

As outras espécies identificadas (27,25%) na amostra são leveduras, fungos filamentosos e outros organismos. Os *reads* não classificados (40,40%) (Figura 26) são constituídos pelos *reads* que apresentaram identidade inferior a 95% e os não mapeados.

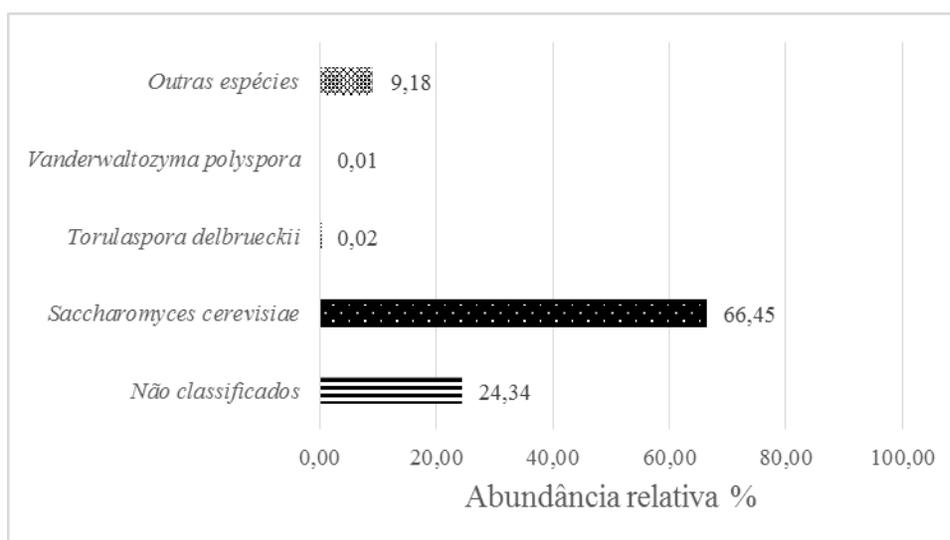


Figura 27 - Abundância relativa (%) de espécies de leveduras ativas na bebida fermentada de água com açúcar de Curitiba (KACU).

A comunidade ativa de leveduras, no kefir de água açucarada de Curitiba (KACU), é composta por *Saccharomyces cerevisiae* (66,45%), *Torulaspora delbrueckii* (0,02%) e *Vanderwaltozyma polyspora* (0,01%). As outras espécies identificadas (9,18%) são constituídas por bactérias e outros organismos distintos e os *reads* não identificados foram 24,34% (Figura 27).

No KACU, observa-se predominantemente a atuação da levedura *Saccharomyces cerevisiae* cujas principais funções fermentativas na metabolização de carboidratos, gerando ácidos, álcoois, compostos aromáticos e metabólitos essenciais para a estimulação de BAL já foram descritas.

Fermentação mista composta por *S. cerevisiae* e leveduras não-*Saccharomyces*, como por exemplo, *Torulaspota delbrueckii*, permite produção de glicerol, manoproteínas e substâncias aromáticas (isoprenoides, terpenos, fenóis voláteis, vanilina e lactonas) que melhoram as características sensoriais da bebida kefir ou outras bebidas fermentadas (Renault et al., 2009; Belda et al., 2015).

Os dados referentes às BAL, BAA e leveduras são complementares aos encontrados por Zanirati e colaboradores (2015) que identificaram as seguintes espécies de BAL na amostra KACU: *Lactobacillus perolens* (34%), *Lactococcus lactis* (33%), *Lactobacillus casei* (11%), *Lactobacillus satsumensis* (11%) e *Lactobacillus parafarragini* (11%).

A comunidade de bactérias ativas no kefir de água de Salvador (KASA), determinada por meio da abundância relativa (%), é formada por bactérias lácticas e acéticas (Figura 28). Observou-se uma maior prevalência de bactérias lácticas (20,91%) do que de bactérias acéticas (4,42%). Porém, a maior parte dos *reads* identificados eram de outras espécies (29,63%), principalmente da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

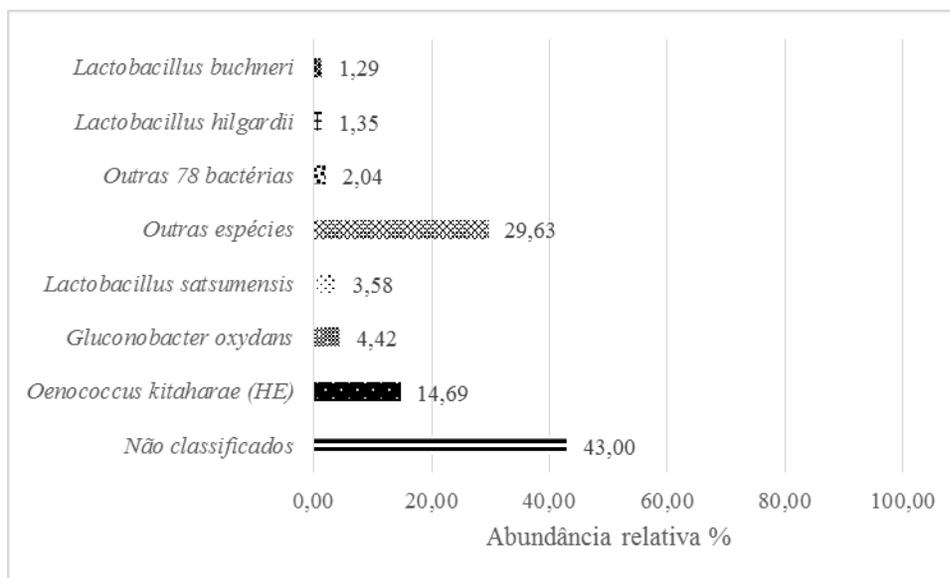


Figura 28 - Abundância relativa (%) de espécies bacterianas ativas no kefir de água de Salvador (KASA).

Além das espécies *Oenococcus kitaharae*, *Gluconobacter oxydans* e *Lactobacillus buchneri*, cujas funções já foram mencionadas, destaca-se *Lactobacillus satsumensis*.

Outras 82 espécies e 1 gênero de bactérias também estão ativas no kefir, porém estão presentes em menor quantidade (2,04%) (Figura 28). Estes micro-organismos são: *Lactobacillus mali* (0,35%), *Acetobacter orientalis* (0,35%), *Lactobacillus diolivorans* (0,23%), *Acetobacter* sp. (0,19%), *Gluconobacter japonicus* (0,18%), *Lactobacillus paracasei* (0,12%), *Gluconobacter roseus* (0,07%), *Lactobacillus brevis* (0,06%), *Acetobacter ghanensis* (0,045%), *Acetobacter syzygii* (0,03%), *Lactobacillus capillatus* (0,03%), *Lactobacillus casei* (0,03%), *Lactobacillus parafarraginis* (0,02%), *Lactobacillus helveticus* (0,02%), *Gluconacetobacter xylinus* (0,019%), *Lactobacillus plantarum* (0,018%), *Gluconobacter albidus* (0,016%), *Gluconacetobacter europaeus* (0,015%), *Oenococcus oeni* (0,015%), *Lactobacillus parakefiri* (0,014%), *Lactobacillus paracollinoides* (0,013%), *Lactobacillus kisonensis* (0,012%), *Lactobacillus collinoides* (0,011%), *Lactobacillus parabuchneri* (0,011%), *Lactobacillus rossiae* (0,011%), *Komagataeibacter intermedius* (0,011%), *Lactobacillus namurensis* (0,010%), *Gluconobacter thailandicus* (0,010%), *Gluconobacter frateurii* (0,009%), *Lactobacillus kefiranofaciens* (0,008%), *Lactobacillus uvarum* (0,007%), *Acetobacter indonesiensis* (0,006%), *Lactobacillus acidipiscis* (0,006%), *Lactobacillus rhamnosus* (0,006%), *Lactobacillus vini* (0,006%), *Lactobacillus nagelii* (0,006%), *Acetobacter malorum* (0,006%), *Gluconacetobacter oboediens* (0,005%), *Lactobacillus panis* (0,005%), *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (0,005%), *Lactobacillus hokkaidonensis* (0,005%), *Lactobacillus composti* (0,004%), *Lactobacillus coryniformis* (0,004%), *Gluconacetobacter hansenii* (0,004%), *Lactobacillus acetotolerans* (0,004%), *Lactobacillus paralimentarius* (0,003%), *Lactobacillus hordei* (0,003%), *Acetobacter senegalensis* (0,002%), *Lactobacillus suebicus* (0,002%), *Lactobacillus senmaizukei* (0,002%), *Lactobacillus sunkii* (0,002%), *Lactobacillus similis* (0,002%), *Stenotrophomonas maltophilia* (0,002%), *Lactobacillus gallinarum* (0,001%), *Gluconacetobacter rhaeticus* (0,001%), *Pediococcus damnosus* (0,001%), *Enterococcus faecium* (0,001%), *Bifidobacterium asteroides* (0,001%), *Lactococcus lactis* (0,0008%), *Pediococcus claussenii* (0,0008%), *Komagataeibacter europaeus* (0,0007%), *Komagataeibacter xylinus* (0,0007%), *Lactobacillus mindensis* (0,0007%), *Lactobacillus manihotivorans* (0,0006%), *Lactobacillus pobuzihii* (0,0006%), *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (0,0005%),

Acetobacter pasteurianus (0,0004%), *Scardovia inopinata* (0,0004%), *Lactobacillus alimentarius* (0,0004%), *Acetobacter cibirongensis* (0,0003%), *Lactobacillus malefermentans* (0,0003%), *Scardovia inopinata* (0,0003%), *Lactobacillus salivarius* (0,0001%), *Lactobacillus ultunensis* (0,0001%), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (0,0001%), *Pediococcus acidilactici* (0,0001%), *Clostridium autoethanogenum* (0,00005%) e *Lactobacillus fermentum* (0,00005%).

A comunidade ativa de leveduras, no kefir de água açucarada de Salvador (KASA), é composta predominantemente por *Saccharomyces cerevisiae* (72,09%). As outras espécies identificadas (9,13%) são constituídas por bactérias e outros organismos distintos e os *reads* não identificados foram 18,02% (Figura 29).

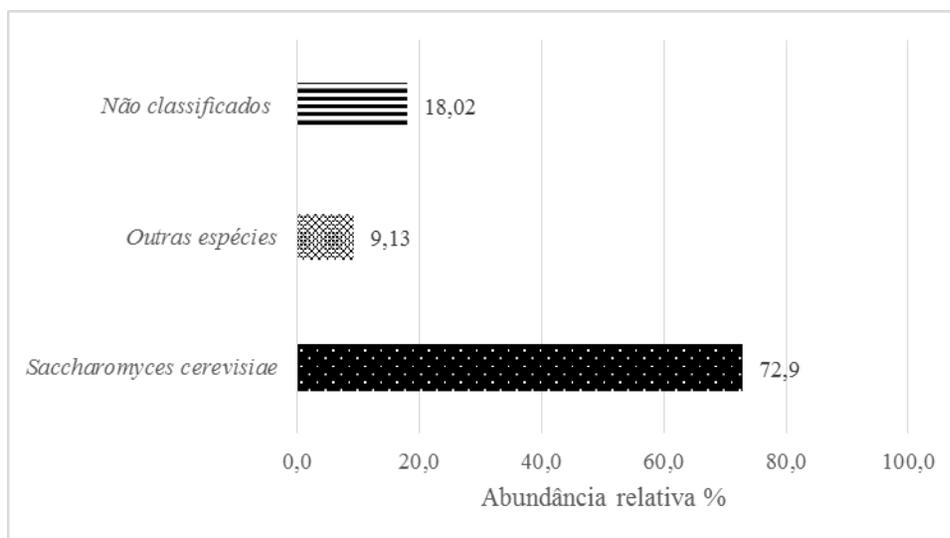


Figura 29 - Abundância relativa (%) de espécies de leveduras no kefir de água de Salvador (KASA).

Os dados referentes às BAL, BAA e leveduras são complementares aos encontrados por Zanirati e colaboradores (2015) que identificaram as seguintes espécies de BAL na amostra KASA: *Lactobacillus casei* (39%), *Lactobacillus perolens* (28%), *Lactococcus lactis* (11%), *Lactobacillus satsumensis* (11%), *Lactobacillus parafarraginis* (6%) e *Oenococcus oeni* (5%).

Várias metodologias independentes de cultivo têm sido utilizadas para o estudo da microbiota associada a grãos de kefir e à bebida produzida em diferentes substratos. Todos os trabalhos

apresentam resultados importantes e complementares no que se refere à diversidade microbiana nos grãos, no entanto, até o presente momento, nenhum trabalho avaliou os micro-organismos metabolicamente ativos no kefir, que são o alvo deste estudo.

Os dados apresentados neste trabalho demonstraram a sensibilidade e riqueza de resultados que a análise metatranscriptômica nos permite avaliar. A técnica nos permitiu fazer uma avaliação preliminar da diversidade da microbiota metabolicamente ativa em amostras de kefir de leite e de água açucarada cultivados no Brasil. Ainda que outras abordagens possam ser obtidas a partir da análise dos dados gerados neste estudo, foi possível perceber que bactérias do ácido lático dos gêneros *Leuconostoc*, *Oenococcus* e *Lactobacillus* e leveduras dos gêneros *Saccharomyces* e *Yarrowia* são micro-organismos importantes no processo de obtenção dessa bebida fermentada.

5.14 Avaliação da síntese de expolissacarídeos

Um grande número de homopolissacarídeos, incluindo dextranos, mutanos, alternanos e levanos são biosintetizados de modo extracelular e requerem a sacarose como substrato específico. A reação de polimerização requer uma enzima altamente específica denominada glicosiltransferase e a energia necessária provém da hidrólise da sacarose (De Vuyst e Deegest, 1999).

A análise metatranscritômica demonstrou a presença do gene da enzima glicosiltransferase (GT) das famílias 1 e 2 nas bebidas fermentadas de água com açúcar mascavo de Curitiba (KACU) e Salvador (KASA). A presença de genes expressos da GT nas amostras pode sugerir a produção de homopolissacarídeos.

A GT1 é muitas vezes referida como uridina difosfato (UDP) glicosiltransferase (UGT) que catalisa a transferência de um radical glicosil da UDP- α -D-glucose para uma vasta gama de moléculasceptoras, incluindo a glicose. UGT desempenham um papel importante na estabilização das células microbianas, conferindo proteção contra compostos tóxicos (etanol, por exemplo), baixo pH; propriedades de biossíntese, armazenamento e transporte de metabólitos secundários e na formação de biofilme o que permite a manutenção deste micro-organismo no

ambiente (De Vuyst e Deegest, 1999; Unligil e Rini, 2000; Sakakibara et al., 2011; Snauwaert et al., 2015).

A biossíntese de heteropolissacárideos bacterianos ocorre em sucessivos passos. Em primeiro lugar são produzidos nucleotídeos de açúcares, que fornecem monossacárideos específicos ativados como precursores para os passos de síntese subsequentes. Em segundo lugar, porções monossacarídeas dos nucleotídeos de açúcares precursores são sequencialmente transferidos por GT altamente específica para o açúcar receptor, resultando na formação de unidades repetidas de carboidratos. Finalmente, as unidades de repetição são polimerizadas e o polímero é exportado a partir da célula (Li e Wang, 2012).

Os heteropolissacarídeos são feitos por polimerização de unidades precursoras repetidas formadas no citoplasma. O primeiro passo envolvido na via catabólica de lactose e biossíntese de EPS é o transporte da lactose para dentro da célula via Sistema Fosfoenolpiruvato/Fosfotransferase (PEP/PTS) ou antiporte com galactose (ver Figura 2) (De Vuyst e Deegest, 1999).

Ao entrar na célula via PEP/PTS a lactose será fosforilada (P) formando lactose-6-P. A lactose-6-P, por ação da fosfo- β -galactosidase, formará galactose-6-P e glicose. A glicose-6-P será utilizada na glicólise (aumento de biomassa) e a glicose na síntese de EPS (De Vuyst e Deegest, 1999). Porém, a fosfo- β -galactosidase não foi encontrada nos dados avaliados. Diante disso, sugere-se que a maior parte da lactose foi transportada para dentro da célula pela via antiporte de galactose (ver Figura 2).

Na via antiporte, a lactose se transformará em glicose e galactose devido a ação da β -galactosidase. A galactose será utilizada na via antiporte e a glicose será utilizada na glicólise ou na produção de EPS (De Vuyst e Deegest, 1999). A β -galactosidase foi encontrada nas amostras KLCU e KLSA. Micro-organismos que apresentam atividade de β -galactosidase estão relacionados a maior atividade metabólica nos grãos de kefir, contribuindo para o abaixamento do pH, aumento da acidez titulável e principalmente, com a produção de EPS (Gradova et al., 2015).

A glicose poderá se transformar em glicose-6-P e posteriormente em glicose-1-P que é o açúcar precursor de exopolissacarídeos, por ação das enzimas glicoquinase e fosfoglucomutase, respectivamente (De Vuyst e Deegest, 1999). A glicoquinase foi encontrada apenas na amostra KLCU e a fosfoglucomutase na amostra KLCU e KLSA.

O precursor glicose-1-P poderá se transformar em UDP-glicose, UDP-galactose e TDP-ramnose. Estes três componentes, em diferentes proporções, irão compor o EPS (De Vuyst e Deegest, 1999). Glicose-1-P formará UDP-glicose por ação da UDP-glicose pirofosforilase, presente nas amostras KLCU e KLSA. UDP-glicose formará EPS ou se transformará em UDP-galactose, por ação da UDP-galactose-4-epimerase (De Vuyst e Deegest, 1999). A galactose-4-epimerase foi encontrada nas amostras KLCU e KLSA.

A glicose-1-P formará dTDP-glicose, dTDP-4ceto-6 deoxy-mannose e finalmente dTDP-rhamnose, por ação das enzimas dTDP-glicose pirofosforilase, desidratase, epimerase redutase, respectivamente (De Vuyst e Deegest, 1999). Estas três enzimas não foram encontradas em nenhuma amostra. Por este motivo, sugere-se que os EPS presentes nos grãos de leite sejam formados pelos monossacarídeos de glicose e galactose. Um exemplo de heteropolissacarídeo constituído de proporções iguais de desses monômeros é o kefirano.

As enzimas envolvidas na síntese de heteropolissacarídeos e cujos genes estão expressos nas amostras de kefir de leite de Curitiba e Salvador estão descritas na Tabela 17.

Tabela 17 – Genes expressos de enzimas envolvidas na síntese de heteropolissacarídeos nas amostras de kefir de leite de Curitiba (KLCU) e Salvador (KLSA).

| Enzimas | Amostras |
|-----------------------------|-----------------|
| Fosfotransferase | KLCU e KLSA |
| β -galactosidase | KLCU e KLSA |
| Glicoquinase | KLCU |
| Fosfoglucomutase | KLCU e KLSA |
| UDP-glicose pirofosforilase | KLCU e KLSA |
| Galactose-4-epimerase | KLCU e KLSA |

6. CONCLUSÕES

De modo geral, as bactérias e leveduras estão imersas na matriz exopolissacarídea que constituem os grãos de kefir e estão distribuídas tanto na superfície quanto na porção interna dos grãos. As atividades metabólicas desses micro-organismos caracterizam as bebidas fermentadas de acordo com os padrões microbiológicos e físico-químicos preconizados pela legislação vigente e/ou podem ser utilizados para a elaboração desses requisitos, no caso de ausência de legislação específica. Os EPS produzidos por *Lactobacillus* spp. e extraídos de grãos de kefir apresentaram atividade biológica protetora contra a adesão e/ou invasão de *Salmonella enteritidis* sorovar Enteritidis em células Caco-2/TC-7. Estes resultados validam a utilização do kefir como alimento que possui alegações funcionais. Porém, mais estudos devem ser realizados com as bebidas, com as estirpes e com os EPS para avaliação do efeito protetor *in vivo*. E, por meio da análise transcriptômica, observou-se que os principais micro-organismos metabolicamente ativos no kefir de leite são *L. mesenteroides*, *L. kefiranofaciens*, *Yarrowia lipolytica* e *Saccharomyces cerevisiae*; e no de água açucarada são *Oenococcus kitaharae*, *Gluconobacter oxydans* e *Saccharomyces cerevisiae*; e que os genes transcritos de enzimas envolvidas na síntese de homopolissacarídeos composto por glicose e heteropolissacarídeo composto por glicose e lactose estavam presentes nas amostras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, A. G.; MEDRANO, M.; MOBILI, P. et al. Acción benéfica sobre la salud de bacterias ácido lácticas, levaduras y sus metabolitos. In: *Aspectos probióticos y tecnológicos de las bacterias lácticas*, v.1, p.71-80, 2010.

ABRAHAM, A. G. Exopolisacarídeos de bacterias lácticas y su aplicación en el desarrollo de alimentos funcionales. *Ciencia y investigación*, v.62, p.35-45, 2012.

ADAM, M.R. Growth inhibition of food borne pathogens by lactic and acetic acids and their mixtures. *Journal of Food Science Technology*, v.23, p.287-292, 1988.

ALTAY, F.; KARBANGLU-GÜLER, F. DIKMEN, C. D. et al. A review on traditional Turkish fermented non-alcoholic beverages: microbiota, fermentation process and quality characteristics. *International Journal of Food Microbiology*, v.167, p.44-56, 2013.

ANANDHARAJ, M.; SIVASANKARI, B. Isolation of potential probiotic *Lactobacillus oris* HMI68 from mother's milk with cholesterol-reducing property. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v.118, n.2, p.153-159, 2014.

BACSKAY, I.; SEPSEY, A.; FELINGER, A. Determination of the pore size distribution of high-performance liquid chromatography stationary phases via inverse size exclusion chromatography. *Journal of Chromatography A*, v.1339, p.110-117, 2014.

BALIMANE, P. V.; CHONG, S.; MORRISON, R. A. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. *Journal Pharmacology Toxicology Methods*, v.44, p. 301-312, 2000.

BELDA, I.; NAVASCUÉS, E.; MARQUINA, D. et al. Dynamic analysis of physiological properties of *Torulaspora delbrueckii* in wine fermentations and its incidence on wine quality. *Applied Microbiology Biotechnology*, v.99, p.1911-1922, 2015.

BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, vol. 30, n.15, p.2114-2120, 2014.

BOTTAZZI, V.; BIANCHI, F. A note on scanning electron microscopy of micro-organisms associated with the kefir granule. *Journal of Applied Bacteriology*, v.48, p.265-268, 1980.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n.18, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para

Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos. Brasília, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n.2 de 07 de janeiro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde. *Diário Oficial da União*. Brasília, 07 de janeiro de 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.62 de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. *Diário Oficial da União*. Brasília, 18 de setembro de 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. *Diário Oficial da União*. Brasília, DF, 24 de outubro de 2007.

CAMPOS, F. S.; CASSIMIRO, D. L.; CRESPI, M. S. et al. Preparation and characterisation of Dextran-70 hydrogel for controlled release of praziquantel. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.49, 2013.

CAPUANI, A.; STETINA, M.; GSTATTEBAUER, A. et al. Multivariate analysis of buckwheat sourdough fermentations for metabolic screening of starter cultures. *International Journal of Food Microbiology*, v.185, p.158-166, 2014.

CHANG, Y.; MCLANDBOROUGH, L.; MCCLEMENTS, D. et al. Interaction of cationic antimicrobial with food-grade biopolymers: dextran, chitosan, carrageenan, alginate and pectin. *Food Research International*, v.64, 2014.

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.

CHOI, H.; KIM, Y.; HWANG, I. et al. Evaluation of *Leuconostoc citreum* HO12 and *Weissella koreensis* HO20 isolated from kimchi as a starter culture for whole wheat sourdough. *Food Chemistry*, v.134, p.2208-2216, 2012.

CLERICI SACCO. *Lyofast MT 036 LV*. Clerici Sacco Proprietary, 2011.

CODEX ALIMENTARIUS. Codex standard for fermented milks. Codex Stan 243-2003. Revision, 2010. Roma, 2010.

COCONNIER, M.; BERNET, M.; KERNEIS, S. et al. Inhibition of adhesion of enteroinvasive pathogens to human intestinal Caco-2 cells by *Lactobacillus acidophilus* strain LB decreases bacterial invasion. *FEMS Microbiology Letters*, p.299-305, 1993.

CORONA, O.; RANDAZZO, W.; MICELI, A. et al. Characterization of kefir-like beverages produced from vegetable juices. *Food Science and Technology*, p.572-581, 2016.

DAS, D.; GOYAL, A. Characterization and biocompatibility of glucan: a safe food additive from probiotic *Lactobacillus plantarum* DM5. *Journal Science Food Agriculture*, v.94, p.683-690, 2014.

DEMIRHAN, E.; DILEK, K.; APAR, PAYER G. et al. A modelling study on kefir grain biomass growth: influence of various minerals. *International Journal of Dairy Technology* v.64, p.402-407, 2011.

DEMIRHAN, E.; GURSES, B.; YALÇIN, B. E. et al. Influence of vitamin (B₁, B₆, B₉, B₁₂, C) and Ions (Cu²⁺, Mn²⁺, PO₄³⁻) on kefir grain biomass growth. *Food Science Biotechnology*, n.22, p.1007-1013, 2013.

DE VOZ, W.; HUGENHOLTZ, J. Engineering metabolic highways in *Lactococci* and other lactic acid bacteria. *Trends in Biotechnology*, v.22, n.2, 2004.

DE VUYST, L.; DEEGEST, B. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Review*, v.23, p.153-177, 1999.

ELFERINK, S. J. W. H. O.; KROONEMAN, J.; GOTTSCHAL, J. C. et al. Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1,2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*. *Applied and environmental microbiology*, v.67, n.1, p.125-132, 2001.

ENDO, A.; OKADA, S. *Oenococcus kitaharae* sp. nov., a non-acidophilic and non-malolactic-fermenting oenococcus isolated from a composting distilled shochu residue. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v.56, p.2345-2348, 2006.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY-EFSA. Scientific opinion on lactose thresholds in lactose intolerance and galactosaemia. *EFSA Journal*, Parma, v.8, p.1-29, 2010.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. WHO - World Health Organization. *Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic and bacteria*. Cordoba, 2001.

FARNWORTH, E. R. Kefir - a complex probiotic. *Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods*, p.1-17, 2005.

FREY-KLETT, P.; BURLINSON, P.; DEVEAU, A. et al. Bacterial-fungal interactions: hyphens between agricultural, clinical, environmental, and food microbiologists. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.75, p.583-609, 2011.

GANGULY, N. K.; BHATTACHARYA, S. K.; SESIKERAN, B. et al. ICMR-DBT Guidelines for Evaluation of Probiotics in Food. *The Indian Journal of Medical Research*, v.134, p.22-25, 2011.

GARRITY, G. M.; BELL, J. A.; LILBURN, T. G. Taxonomic outline of the prokaryotes Bergey's manual of systematic bacteriology. 2ed. Nova Iorque: Springer, 2004, 401p.

GARROTE, G. L.; ABRAHAM, A. G.; DE ANTONI, G. L. Inhibitory Power of kefir: the role of organic acids. *Journal of Food Protection*, v.63, p.639-652, 2000.

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

GARROTE, G. L.; DELFEDERICO, L.; BIBILONI, R. et al. *Lactobacilli* isolated from kefir grains: evidence of the presence of S-layer proteins. *Journal of Dairy Research*, v.71 p.222-230, 2004.

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

GOLOWCZYC, M. A.; MOBILI, P.; GARROTE, G. L. et al. Protective action of *Lactobacillus kefir* carrying S-layer protein against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *International Journal of Food Microbiology*, v.118, p.264-273, 2007.

GRABHERR, M. G.; HAAS, B. J. YASSOUR, M. et al. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology*, v.29, n.7, p.644-654, 2011.

GRADOVA, N. B.; KHOKHLACHEVA, A. A.; MURZINA, E. D. et al. Microbial components of kefir grains as exopolysaccharide kefir producers. *Applied Biochemistry and Microbiology*, v.51, n.9, p.873-880, 2015.

GROBBEN, G. J.; SIKKEMA, J.; SMITH, M. R. et al. Production of extracellular polysaccharides by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* NCFB2772 grown in a chemically defined medium. *Journal Applied Bacteriology*, v.79, p103-107, 1995.

GROBBEN, G. J.; SIKKEMA, J.; SMITH, M. R. et al. Influence of fructose and glucose on the production of exopolysaccharides and the activities of enzymes involved in the sugar metabolism and the synthesis of sugar nucleotides in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772. *Journal Applied Microbiology Biotechnology*, v.46, p.279-284, 1996.

GUTIERREZ, E. M.; ZIBORDI, G.; SOUZA, M. C. Avaliação físico-química e sensorial analysis probiotic yogurts. *Yeast Research*, v.67, p.22-29, 2012.

GUZEL-SEYDIM, Z.; SEYDIM, A. C.; GREENE, A. K.; Organic acids and volatile flavor components evolved during refrigerated storage of kefir. *Journal Dairy Science*. v.83, p.1239-1242, 2000.

GUZEL-SEYDIM, Z.; WYFFELS, J. T.; SEYDIM, A. C. et al. Turkish kefir and kefir grains: microbial enumeration and electron microscopic observation. *International Journal of Dairy Technology*, vol 58, n.1, 2005.

GUZEL-SEYDIM, Z.; KOK-TAS, T.; GREENE, A. K. Kefir and koumiss: microbiology and technology. In: YILDIZ, F. *Development and manufacture of yogurt and other functional dairy products*. CRC Press, Boca Raton, 2010. Cap. 5; p.143-163.

GUZEL-SEYDIM, Z.; KOK-TAS, T., ERTEKIN-FILIZ, B. et al. Effect of different growth conditions on biomass increase in kefir grains. *Journal Dairy Science*, v.94, p.1239–1242, 2011.

GULITZ, A.; STADIE, J.; WENNING, M. et al. The microbial diversity of water kefir. *International Journal of Food Microbiology*, v.151, p.284-288, 2011.

HAAS, B. J.; PAPANICOLAOU, A.; YASSOUR, M. et al. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nature Protocols*, v.8, n.8, p.1494-1512, 2013.

HAMET, M. F.; PIERMARIA, J. A.; ABRAHAM, A. G. Selection of EPS-producing *Lactobacillus* strain isolated from kefir grains and rheological characterization of the fermented milks. *Food Science and Tecnology*, 63, p.129-135, 2015.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, v.1, 3ed. São Paulo: IMESP, 1985.

ILLUMINA. *Ribo-Zero Magnetic Kits*. Rev. A; Illumina Proprietary, 2014.a

ILLUMINA. *Truseq RNA sample prep. v2 ls protocol*. Rev. F; Illumina Proprietary, 2014.b

IRIGOYEN, A.; ARANA, I; CASTIELLA, M. et al. Microbiological, physicochemical, and sensory characteristics of kefir during storage. *Food Chemistry*, v.90, p.613-620, 2005.

ISMAIEL, A. A.; GHALY, M. F.; EI-NAGGAR, A. K. Milk kefir: ultrastructure, antimicrobial activity and efficacy on aflatoxin B1 production by *Aspergillus flavus*. *Current microbiology*, v.62, p.1602-1609, 2011.

ISMAIL, W. M.; YE, Y.; TANG, H. Gene finding in metatranscriptomic sequences. *Bio med Central Bioinformatics*, n.15, p.1-8, 2014.

JAY, J. M. Fermentação e produtos lácteos fermentados. In: *Microbiologia de Alimentos*. 6ed. - PortoAlegre: Artmed, cap.7, p.132-136, 2005.

JEPSON, M. A.; CLARK, M. A. The role of M cells in *Salmonella* infection. *Microbes and Infection*, v.3, p.1183-1190, 2001.

- JESPERSEN, L. Occurrence and taxonomic characteristics of strains of *Saccharomyces cerevisiae* predominant in African indigenous fermented foods and beverages. *Yeast Research*, n.3, p.191-200, 2003.
- JIANZHONG, Z.; XIAOLIA, L.; HANHU, J. et al. Analysis of the microflora in Tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis. *Food Microbiology*, n.26, p.770-775, 2009.
- JUNG, J. Y.; LEE, S. H. JIN, H. M. et al. Metatranscriptomic analysis of lactic acid bacterial gene expression. during kimchi fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, v.163, p.171-179, 2013.
- JUNG, J. Y.; LEE, S. H.; LEE, S. H. et al. Complete genome sequence of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* Strain J18, isolated from kimchi. *Journal of Bacteriology*, p.730-731, 2014.
- KAUFMANN, S. H. E.; RAUPACHA, B.; FINLAY, B. Introduction: microbiology and immunology: lessons learned from *Salmonella*. *Microbes and Infection*, v.3, p.1177-1181, 2001.
- KAKISU, E. J.; ABRAHAM, A. G.; PEREZ, P. F. et al. Inhibition of *Bacillus cereus* in milk fermented with kefir grains. *Journal of Food Protection*, v.70, p.1-4, 2007.
- KAKISU, E.; BOLLA, P.; ABRAHAM, A. et al. *Lactobacillus plantarum* isolated from kefir: Protection of cultured Hep-2 cells against *Shigella* invasion. *International Dairy Journal*, v.33, p.22-26, 2013.
- KANG, H.; NGUYEN, T. T. H.; JEONG, H. et al. Molecular cloning and characterization of a novel glucansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* LM34. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, n.19, p.605-612, 2014.
- KIM, D.; CHON, J.; KIM, H. et al. Detection and enumerations of lactic acid bacteria, acetic acid bacteria and yeast in grains and milk using quantitative real-time PCR. *Journal of Food Safety*, v.35, p.102-107, 2015.
- KOEPSSELL, H. J.; TSUCHIYA, H. M. Enzymatic synthesis of dextran. *Journal Bacteriology*, v.63, p. 293-295, 1952.
- KOROLEVA, N. S. Products prepared with lactic acid bacteria and yeasts. In: Robinson, R. K. (ed.). *Therapeutic properties of fermented milks*. Londres: Elsevier Applied Sciences Publishers, 1991. p. 159-179.
- KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, C.; POWERS, E. B. Phylogenetic relationships among species of *Pichia*, *Issatchenkia*, and *Williopsis* determined from multigene sequence analysis, and the proposal of *Barnettozyma* gen.nov., *Lindnera* gen.nov. and *Wickerhamomyces* gen.nov. *Federation of European Microbiological Societies*, p.939-954, 2008.
- LANGMEAD, B.; TRAPNELL, C.; POP, M. et al. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biology*, v.10, 2009.

- LANGMEAD, B.; SALZBERG, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature methods*, v.9, n.4, p. 357-360, 2012.
- LAUREYS, D.; DE VUYST, L. Kinetics of water kefir fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, v.80, p. 2564-2572, 2014.
- LEATHERS, T. D.; COTÊ, G. L. Biofilm formation by exopolysaccharide mutants of *Leuconostoc mesenteroides* strain NRRL B-1355. *Applied Microbiology Biotechnology*, v.78, p.1025-1031, 2008.
- LEITE, A. M. O.; LEITE, D. C. A.; DEL AGUILA, E. M. et al. Microbiological and chemical characteristics of Brazilian kefir during fermentation and storage processes. *Journal of Dairy Science*, v.44, p.4149-4159, 2013. a
- LEITE, A. M. O.; MIGUEL, M. A. L.; PEIXOTO, R. S.; et al. Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.44, p.341-349, 2013. B
- LI, J. WANG, N. The *gpsX* gene encoding a glycosyltransferase is important for polysaccharide production and required for full virulence in *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Biomed Central Microbiology*, v.12, 2012.
- LIU, S.; LEATHERS, T. D.; COPELAND, A. et al. Complete genome sequence of *Lactobacillus buchneri* NRRL. *Journal of Bacteriology*, v.193, n.15, p.4019-4020, 2011.
- LONDERO, A.; IRAPORDA, C.; GARROTE, G. L. et al. Cheese whey fermented with kefir micro-organisms: antagonism against *Salmonella* and immunomodulatory capacity. *International Journal of Dairy Technology*, v.67, p.1-9, 2014.
- MCCURDY, R. D.; GOFF, H. D.; STANLEY, D. W. Rheological properties of dextran related to food applications. *Food Hydrocolloids*, p.609-623, 1994.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V. et al. *Microbiologia de Brock*, 12ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- MADHURI, K. V.; PRABHAKAR, K. V. Microbial exopolysaccharides: biosynthesis and potential applications. *Oriental Journal of Chemistry*, v.30, p.1401-1410, 2014.
- MAGALHÃES, K. T.; PEREIRA, M. A.; NICOLAU, A. et al. Production of fermented cheese whey-based beverage using kefir grains as starter culture: Evaluation of morphological and microbial variations. *Bioresource Technology*, v.101, p. 8843-8850, 2010.
- MAGALHÃES, K. T.; PEREIRA, G. V. M.; CAMPOS, C. R. et al. Brazilian kefir: structure, microbial communities and chemical composition. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.42, p. 693-702, 2011.

MAGRA, T. I.; ANTONIOU, K. D.; PSOMAS, E. I. Effect of milk fat, kefir grain inoculum and storage time on the flow properties and microbiological characteristics of kefir. *Journal of Texture Studies*, v.43, p.299-308, 2012.

MALONE, J.; OLIVER, O. Microarrays, deep sequencing and the true measure of the transcriptome. *Journal of Biology*, v.34, p.1-9, 2011.

MARTINS, A. R.; MONTEIRO, R. L.; BURKERT, J. F. M. et al. Simultaneous enzymatic hydrolysis and lactic fermentation to obtain a yogurt with lactose content. *Ciência Agrotecnológica*, v. 36, p.551-559, 2012.

MARSHALL, V. M.; COLE, W. M.; BROOKER, B. E. Observations on the structure of kefir grains and the distribution of the microflora. *Journal of Applied Microbiology*, v.57, p.491-497, 1984.

MASCARENHAS, M. A. C. *Kefir: Avaliação da qualidade físico-química e sensorial em produtos derivados de kefir, leite e iogurte líquido natural*. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Gestão da Qualidade e Segurança Alimentar na Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar, Instituto Politécnico de Leiria, Portugal, 2011.

MEDRANO, M.; PEREZ, P. F.; ABRAHAM A. G. Kefiran antagonizes cytopathic effects of *Bacillus cereus* extracellular factors. *International Journal of Food Microbiology*, v.122, p.1-7, 2008.

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

MENDES, C. Q.; SUSIN, I.; NUSSIO, L. G. et al. Efeito do *Lactobacillus buchneri* na fermentação, estabilidade aeróbia e no valor nutritivo de silagem de cana-de-açúcar. *Revista Brasileira Zootecnia*, v.37, n.12, p.2191-2198, 2008.

MENDES, F.; SIEUWERTS, S.; HULSTER, E. et al. Transcriptome-based characterization of interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in lactose-grown chemostat cocultures. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 5949-5961, 2013.

MIGUEL, M. G. C. P.; CARDOSO, P. G.; LAGO, L. A. et al. Diversity of bacteria present in milk kefir grains using culture-dependent and culture-independent methods. *Food Research International*, v.43, p. 1523-1528, 2010.

MOINAS, M.; HORISBERGER, M.; BAUER, H. The structural organization of the Tibi grain as revealed by light, scanning and transmission microscopy. *Archive of Microbiology*, v.128, p. 157-161, 1980.

MONTANUCI, F. D.; GARCIA, S.; PRUDENCIO, S. H. Caracterização sensorial e aceitação de Kefir adoçado integral e desnatado com inulina. *Brazilian Journal Food Technology*, v.6, p.79-90, 2010.

MOZZI, F.; VANINGELGEM, F.; HÉRBERT, E. M. et al. Diversity of heteropolysaccharide-producing lactic acid bacterium strains and their biopolymers. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 72, p.4431-4435, 2006.

NAMAZIAN, M.; HEIDARY, H. Ab initio calculations of pKa values of some organic acids in aqueous solution. *Journal of Molecular Structure*, v.620, p.257-263, 2003.

NEPA. Núcleo de Estudos e pesquisas em Alimentação. Tabela brasileira de composição de alimentos. UNICAMP.- 4. ed. rev. e ampl. Campinas: NEPAUNICAMP, 2011. 161 p.

NICAUD, J. M. *Yarrowia lipolytica*. *Yeast*, n.29, p.409-418, 2012.

NIELSEN, B.; GURAKAN, G.; UNLU, G. Kefir: A multifaceted fermented dairy product. *Probiotics & Antimicrobial Protein*. n.6, p.123-135, 2014.

OBERMAN, H.; LIBUDZISZ, Z. Fermented milks. In: Wood, B. J. B. (ed.). *Microbiology of fermented foods*, 2ed. Londres: Blakie Academic e Professional, cap. 11, p.308-350. 1998.

OLIVEIRA, M. N.; DAMIM, M. R Efeito do teor de sólidos e da concentração de sacarose na acidificação, firmeza e viabilidade de bactérias do iogurte e probióticas em leite fermentado. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.23, p.172-176, 2003.

ORDÓÑEZ, J. A. O. RODRIGUEZ, M. I. C.; ÁLVAREZ, L. F. et al. *Tecnologia de Alimentos: Alimentos de Origem Animal*. Porto Alegre: Artmed, v.2, p.279, 2005.

PAIVA, I. M. *Caracterização estrutural e avaliação da capacidade imunomodulatória de exopolissacarídeos produzidos por lactobacilos isolados de kefir*. 2013. 99p. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

PAIVA, I. M.; STEINBERG, R. S. LULA, I. S. et al. *Lactobacillus kefiranofaciens* and *Lactobacillus satsumensis* isolated from Brazilian kefir grains produce alpha-glucans that are potentially suitable for food applications. *Food Science and Technology*, v.72, p.390-398, 2016.

PARTANEN, J. I.; JUUSOLA, P. M.; MINKKINEN, P. O. Determination of stoichiometric dissociation constants of lactic acid in aqueous salt solutions at 291.15 and at 298.15 K. *Fluid Phase Equilibria*, p.245-266, 2003.

PASTO, D. J.; JOHNSON, C. R. *Determinacion de estructuras orgánicas*. Barcelona: Reverté, 2003.

PAULO, E. M.; BOFFO, E. F.; BRANCO, A. Production, extraction and characterization of exopolysaccharides produced by the native *Leuconostoc pseudomesenteroides* R2 strain. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v.84, n.2, p.495-507, 2012.

PAYER, G.; APAR, D. K.; DEMIRHAN, E. et al. Experimental study on the effect of Mg²⁺, Zn²⁺, Ca²⁺ and Fe³⁺, ions on Kefir grain biomass propagation. *Current Opinion in Biotechnology*, v.22, p.93, 2011.

PIDOUX, M. The microbial flora of sugary kefir grain (the gingerbeer plant): biosynthesis of the grain from *Lactobacillus hilgardii* producing a polysaccharide gel. *Oxford University Press*, p.223-238, 1989.

PIERMARIA, J. *Polisacaridos de bacterias lácticas: su aplicación en alimentos funcionais*. 2008. 223p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos). Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA). Universidad Nacional de La Plata. La Plata.

PIERMARIA, J. A., DE CANAL, M. L., ABRAHAM, A. G. Gelling properties of kefiran, a food-grade polysaccharide obtained from kefir grain. *Food Hydrocolloids*, n.22, p.1520-1527, 2008. B

QIANYING, S.; SU, X.; LI, X. et al. A dextran-bonded stationary phase for saccharide separation. *Journal of Chromatography A*, v.1345, p.57-67, 2014.

QIN, Q. Q.; XIA, B.S.; XIONG, Y. et al. Structural characterization of the exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* 05-34 and its in situ application in yogurt. *Journal of Food Science*, v.76, p.1226-1230, 2011.

RANDAZZO, W.; CORONA, O.; GUARCELLO, R. et al. Development of new non-dairy beverages from Mediterranean fruit juices fermented with water kefir microorganisms. *Food Microbiology*, n.54, p.40-51, 2016.

REA, M. C.; LENNARTSSAN, T.; DILLON, P. et al. Irish kefir-like grains: structure, microbial composition and fermentation kinetics. *Journal Applied Bacteriology*, v.81, p.83-94, 1996.

RENAULT, P.; SERTIER, C. MARULLO, P. et al. Genetic characterization and phenotypic variability in *Torulaspota delbrueckii* species: Potential applications in the wine industry. *International Journal of Food Microbiology*, v.134, p.201-210, 2009.

RIMADA, P. S.; ABRAHAM, A. G. Polysaccharide production by kefir grains during whey fermentation. *Journal of Dairy Research*, v.68, p.653-661, 2001.

RIMADA, P. S.; ABRAHAM, A. G. Kefiran improves rheological properties of glucono- d-lactone induced skim milk gels. *International Dairy Journal*, n.16, p.33-39, 2006.

ROBTY, J. F. Essential os carbohydrate chemistry. Nova York: Springer Science, 1998, 250p.

RODRIGUES, K. L.; CAPUTO, L. R. G.; CARVALHO, J. C. T.; et al. Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract. *International Journal of Antimicrobial Agents*, n.25, p.404-408, 2005.

RUAS-MADIEDO, P.; ABRAHAM, A.; MOZZI, F. et al. Functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Research Signpost*, p.137-166, 2008.

RUAS-MADIEDO, P.; MEDRANO, M.; SALAZAR, N. et al. Exopolysaccharides produced by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains abrogate *in vitro* the cytotoxic effect of bacterial toxins on eukaryotic cells. *Journal of Applied Microbiology*. v.109, p.2079-2086, 2010.

RUBIO, M. T.; LAPPE, P.; WACHER, C. et al. Estudio microbiano y químico de la fermentación de soluciones de piloncillo inoculadas con Tibicos. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, v.35, p. 19–31, 1993.

SAKAKIBARA, K. Y.; HANADA, K. An evolutionary view of functional diversity in family 1 glycosyltransferases. *The Plant Journal*, v.66, p.182-193, 2011.

SALMINEN, S.; ISOLAURI, E. Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. *Antonie von Leewenhoek*, v.70, p.347-358, 1996.

SANTOS, M.; RODRIGUES, A.; TEIXEIRA, J. A. Production of dextran and fructose from carob pod extract and cheese whey by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512(f). *Biochemical Engineering Journal*, v.25, p.1-6, 2005.

SANTOS, J. P. V., ARAUJO, T. F.; FERREIRA, C. L. L. F. et al. Evaluation of antagonistic activity of milk fermented with kefir grains of different origins. *Brazilian Arch. Biology Technology*, v.56, p.823-827, 2013.

SCHAAFSSMA, G. Lactose and lactose derivatives as bioactive ingredients in human nutrition. *International Dairy Journal*, v.18, p.458-465, 2008.

SENGUN, I. Y.; KARABIYIKLI, S. Importance of acetic acid bacteria in food industry. *Food Control*, n.22, p.647-656, 2011.

SEPSEY, A., BACSKAY, I.; FELINGER, A. Molecular theory of size exclusion chromatography for wide pore size distributions. *Journal of Chromatography A*, v.1331, p.52-60, 2014.

SGARBIERI, V. C. Revisão: propriedades estruturais e físico-químicas das proteínas do leite. *Brazilian Journal Food Technology*, v.8, p.43-56, 2005.

SILVA, K. R.; RODRIGUES, S. A.; XAVIER FILHO, L. et al. Antimicrobial activity of broth fermented with kefir grains. *Applied Biochemistry Biotechnology*, v.152, p.316-325, 2009.

SIMOVA, E.; BESHKOVA, D.; ANGELOV, A. et al. Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v.28, p.1-6, 2002.

SNAUWAERT, I.; STRAGIER, P.; DE VUYST, L. et al. Comparative genome analysis of *Pediococcus damnosus* LMG 28219, a strain well-adapted to the beer environment. *Biomed Central*, n.16, 2015.

STADIE, J.; GULITZ, A. EHRMANN, M. A. et al. Metabolic activity and symbiotic interactions of lactic acid bacteria and yeasts isolated from water kefir. *Food Microbiology* v.35, p 92-98, 2013.

TANG, S.; LOMSADZE, A.; BORODOVSKY, M. Identification of protein coding regions in RNA transcripts. *Nucleic Acids Research*, p.1-10, 2015.

TURCO, L.; CATONE, T.; CALONI, F. et al. Caco-2/TC7 cell line characterization for intestinal absorption: How reliable is this in vitro model for the prediction of the oral dose fraction absorbed in human? *Toxicology in Vitro*, v.25, p.13-20, 2011.

TURULA, V. E.; JUNIOR GORE, T.; SINGH, S. et al. Automation of the anthrone assay for carbohydrate concentration determinations. *Analytical Chemistry*, v.82, p.1786-1792, 2010.

UNLIGIL, U. M.; RINI, J. M. Glycosyltransferase structure and mechanism. *Current opinion in structural biology*, v.10, p.510-517, 2000.

VARUZZA, L. *Introdução à análise de dados de sequenciadores de nova geração*. 2013.

VINDEROLA, G.; PERDIGÓN, G.; DUARTE, J. et al. Effects of the oral administration of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefirifaciens* on the gut mucosal immunity. *Cytokine*, v.36, p.254-260, 2006.

WANG, Y.; AHMED, Z.; FENG, W. et al. Physicochemical properties of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus Kefiranofaciens* ZW3 isolated from Tibet Kefir. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.43, p.283-288, 2008.

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

ZANIRATI, D. F. *Caracterização de bactérias lácticas da microbiota de grãos de kefir cultivados em leite ou água com açúcar mascavo por metodologias dependentes e independentes de cultivo*. 2012. 87f. Dissertação de Mestrado (Ciências Biológicas), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2012.

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

ZENG, X. Q.; PAN, D. D.; GUO, Y. X. The probiotic properties of *Lactobacillus buchneri* P2. *Journal of Applied Microbiology*, v.108, p. 2059-2066, 2010.

ZUCCO, F.; BATTO, A.; BISE, G. et al. An inter-laboratory study to evaluate the effects of medium composition on the differentiation and barrier function of Caco-2 cell lines. *ATLA*, v.33, p.603-618, 2005.

APENDICE

Apêndice A

Tabela 29 - Valores experimentais da curva de calibração com padrões de dextrano com distintas massas moleculares

| Número | Amostra (0,5%) | Tempo | Log (M.M.) | Área |
|--------|---------------------|--------|------------|---------|
| 1 | 3.800.000 | 8,274 | 6,579784 | 472197 |
| 2 | 2.340.000 | 8,300 | 6,369216 | 402661 |
| 3 | 848.200 | 8,806 | 5,928498 | 565805 |
| 4 | 548.000 | 9,423 | 5,738781 | 581313 |
| 5 | 326.600 | 9,618 | 5,514016 | 619763 |
| 6 | 145.000 | 9,797 | 5,161368 | 644548 |
| 7 | 97.000 | 10,106 | 4,986772 | 645089 |
| 8 | 342,24 ¹ | 11,713 | 2,534331 | 1014102 |

¹ Controle negativo (sacarose)

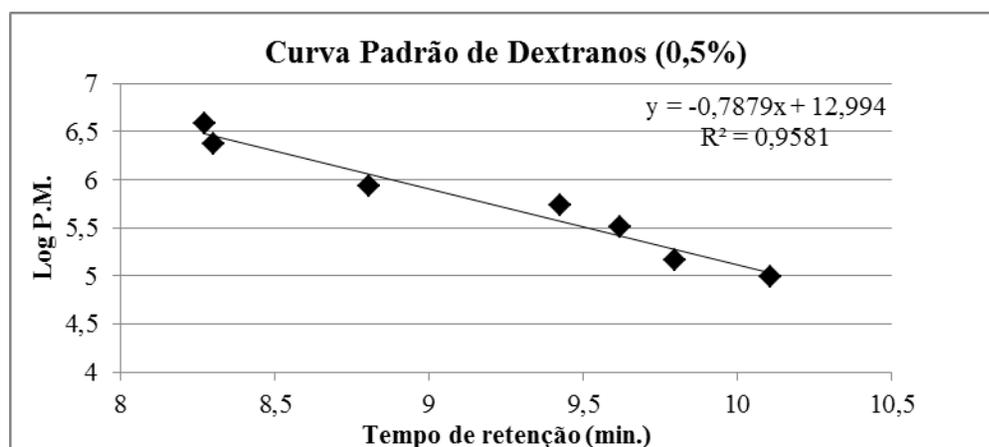


Figura 30 - Regressão linear correspondente ao logaritmo dos pesos moleculares dos padrões de dextranos em função do tempo de retenção analisados por cromatografia líquida de alta eficiência.

Apêndice B

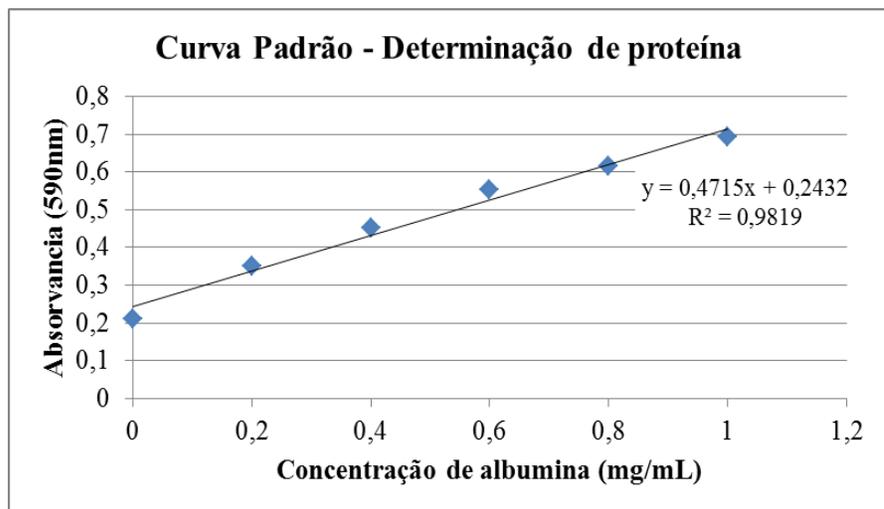


Figura 31 - Exemplo de uma das curvas padrões utilizadas na determinação de resíduos de proteína.

Apêndice C

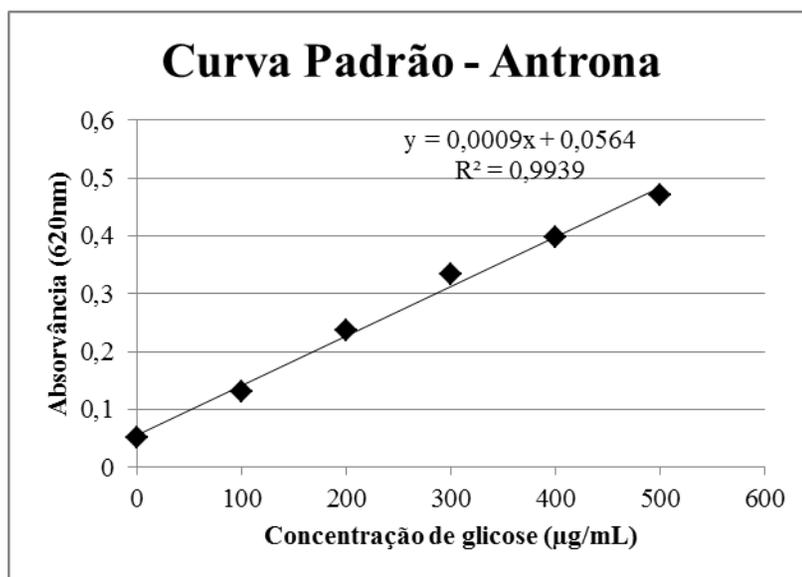
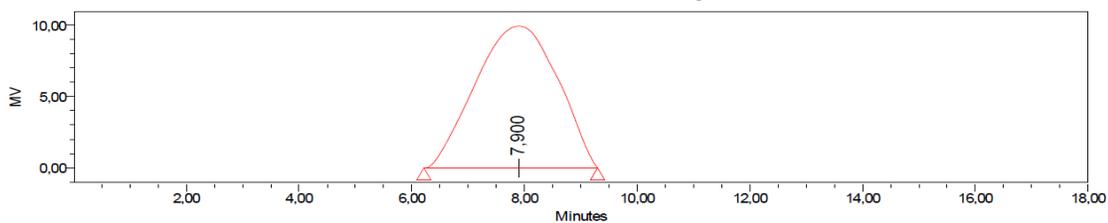


Figura 32 - Exemplo de uma das curvas padrões utilizadas na determinação da concentração de carboidratos.

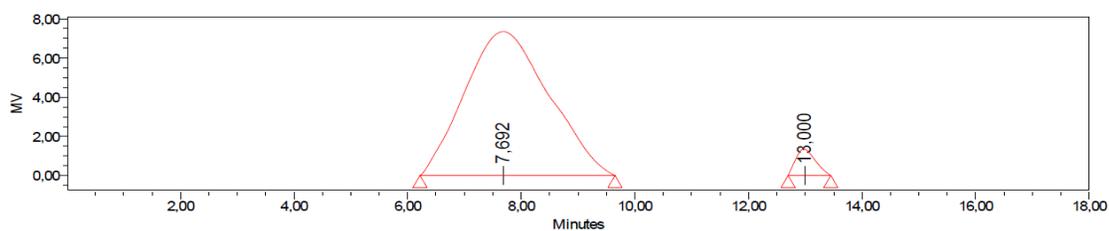
Apêndice D



Peak Results

| Name | RT | Area | Height | Amount | Units |
|------|-------|---------|--------|--------|-------|
| 1 | 7,900 | 1007839 | 9925 | | |

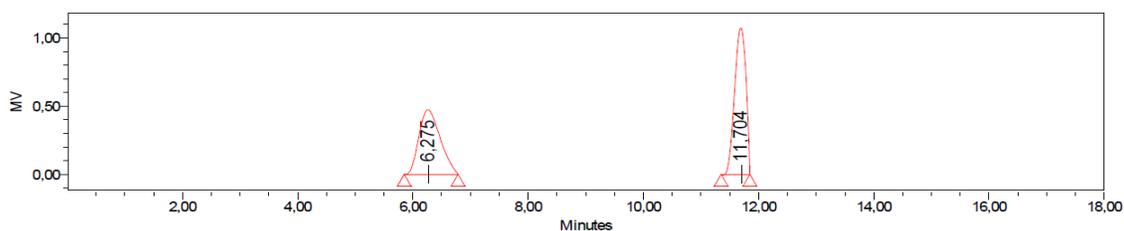
Cromatograma de solução de EPS extraído de grãos de kefir de leite de Curitiba



Peak Results

| Name | RT | Area | Height | Amount | Units |
|------|--------|--------|--------|--------|-------|
| 1 | 7,692 | 755288 | 7350 | | |
| 2 | 13,000 | 32373 | 1339 | | |

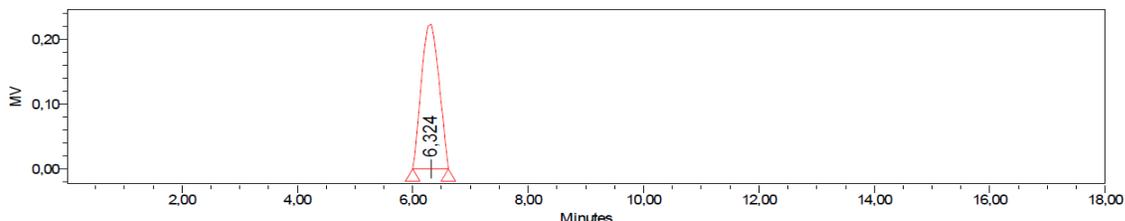
Cromatograma de solução de EPS extraído de grãos de kefir de leite de Salvador



Peak Results

| Name | RT | Area | Height | Amount | Units |
|------|--------|-------|--------|--------|-------|
| 1 | 6,275 | 12131 | 472 | | |
| 2 | 11,704 | 14716 | 1068 | | |

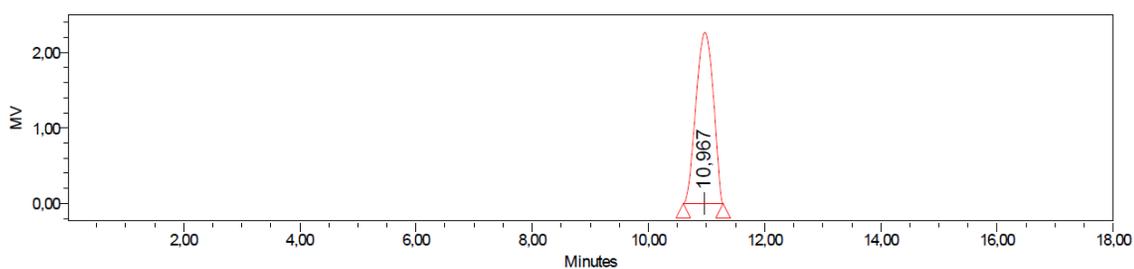
Cromatograma de solução de EPS extraído de grãos de kefir de água de Curitiba



Peak Results

| | Name | RT | Area | Height | Amount | Units |
|---|------|-------|------|--------|--------|-------|
| 1 | | 6,324 | 4704 | 221 | | |

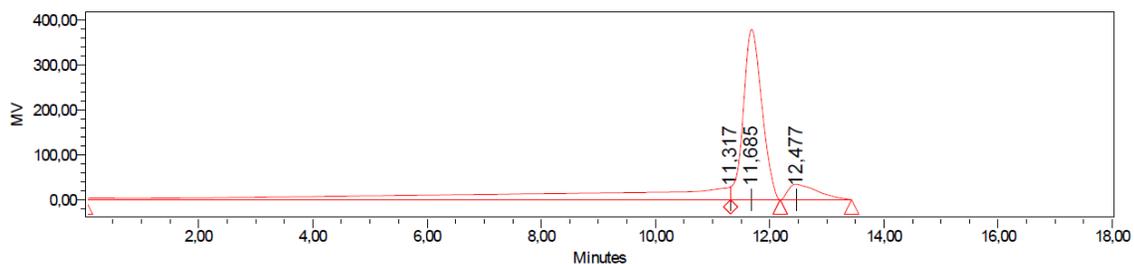
Cromatograma de solução de EPS extraído de grãos de kefir de água de Salvador



Peak Results

| | Name | RT | Area | Height | Amount | Units |
|---|------|--------|-------|--------|--------|-------|
| 1 | | 10,967 | 46944 | 2267 | | |

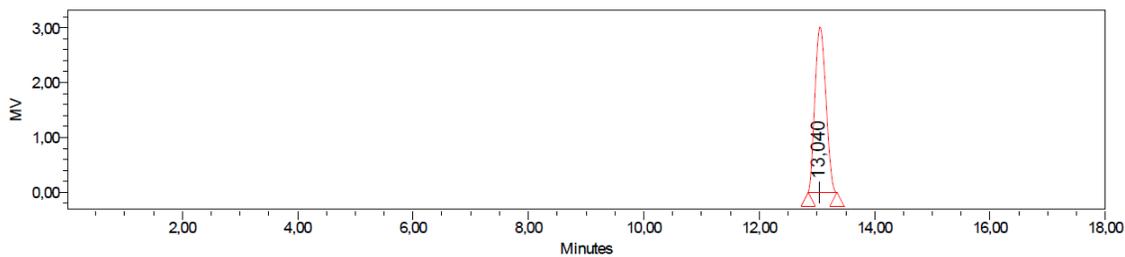
Cromatograma de EPS de kefir de leite de Curitiba.



Peak Results

| | Name | RT | Area | Height | Amount | Units |
|---|------|--------|---------|--------|--------|-------|
| 1 | | 11,317 | 6971951 | 28710 | | |
| 2 | | 11,685 | 8527661 | 378734 | | |
| 3 | | 12,477 | 1221543 | 34432 | | |

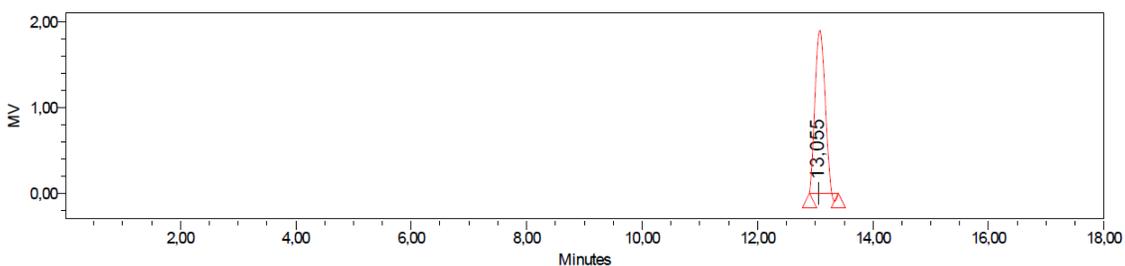
Cromatograma de EPS de kefir de leite de Salvador.



Peak Results

| | Name | RT | Area | Height | Amount | Units |
|---|------|--------|-------|--------|--------|-------|
| 1 | | 13,040 | 39704 | 2971 | | |

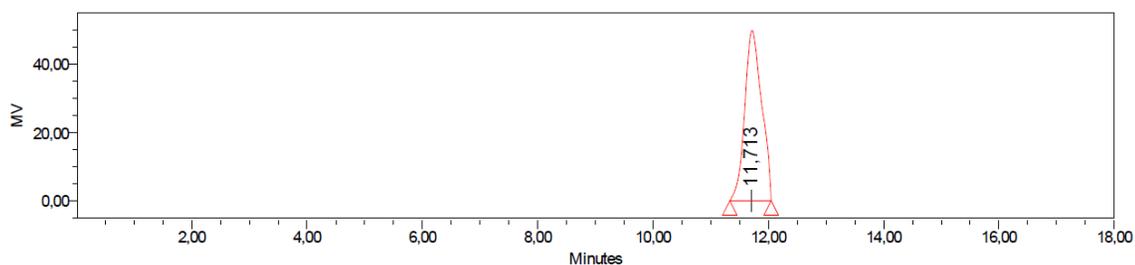
Cromatograma de EPS de kefir de água de Curitiba



Peak Results

| | Name | RT | Area | Height | Amount | Units |
|---|------|--------|-------|--------|--------|-------|
| 1 | | 13,055 | 23287 | 1832 | | |

Cromatograma de EPS de kefir de água de Salvador



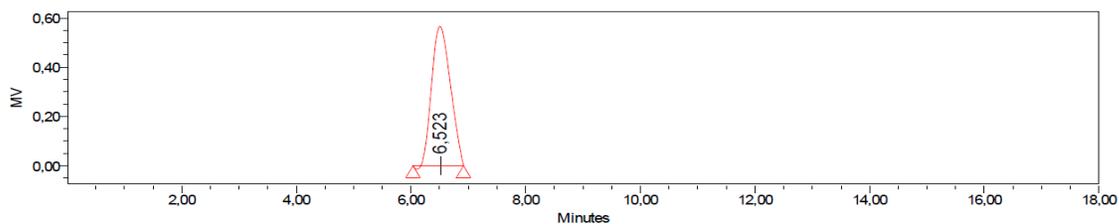
Peak Results

| | Name | RT | Area | Height | Amount | Units |
|---|------|--------|---------|--------|--------|-------|
| 1 | | 11,713 | 1014102 | 49819 | | |

Cromatograma de solução de sacarose 0,5% - Controle negativo

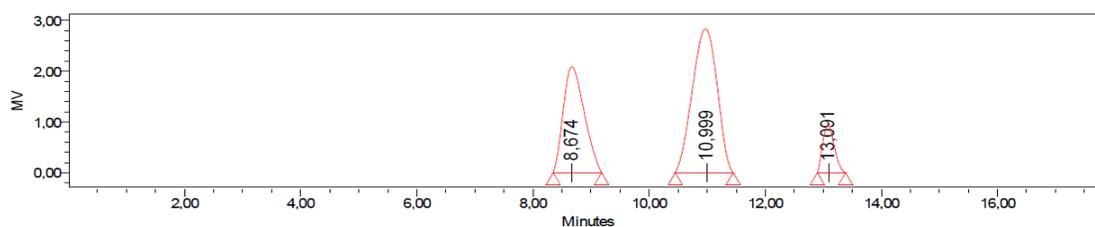
Figura 33 – Cromatogramas correspondentes à pesquisa de polissacarídeos obtidos a partir de bebidas fermentadas por grãos de kefir de Curitiba e Salvador, cultivados em água com açúcar mascavo e leite.

Apêndice E



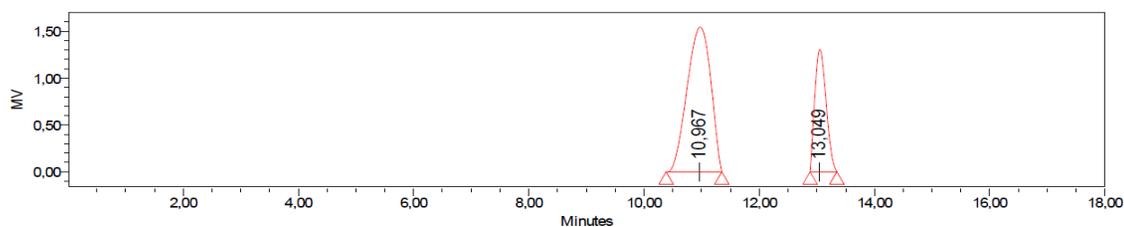
Peak Results

| | Name | RT | Area | Height | Amount | Units |
|---|------|-------|-------|--------|--------|-------|
| 1 | | 6,523 | 12988 | 563 | | |

Cromatograma de solução de EPS de *L. diolivorans* 1Z

Peak Results

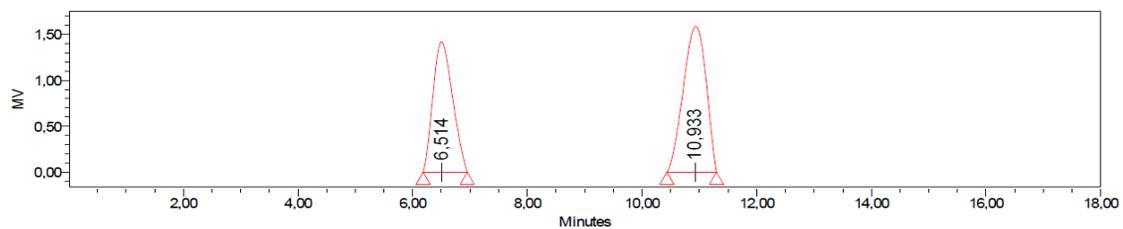
| | Name | RT | Area | Height | Amount | Units |
|---|------|--------|-------|--------|--------|-------|
| 1 | | 8,674 | 52374 | 2089 | | |
| 2 | | 10,999 | 83958 | 2816 | | |
| 3 | | 13,091 | 12957 | 934 | | |

Cromatograma de solução de EPS de *L. satsumensis* 10P

Peak Results

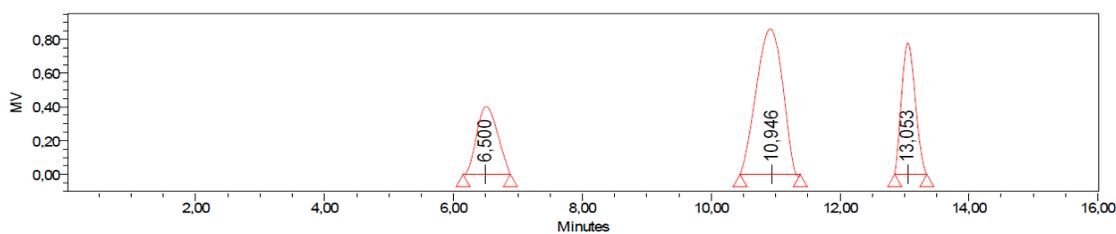
| | Name | RT | Area | Height | Amount | Units |
|---|------|--------|-------|--------|--------|-------|
| 1 | | 10,967 | 44114 | 1543 | | |
| 2 | | 13,049 | 17886 | 1305 | | |

Cromatograma de solução de EPS de *L. satsumensis* 10P2



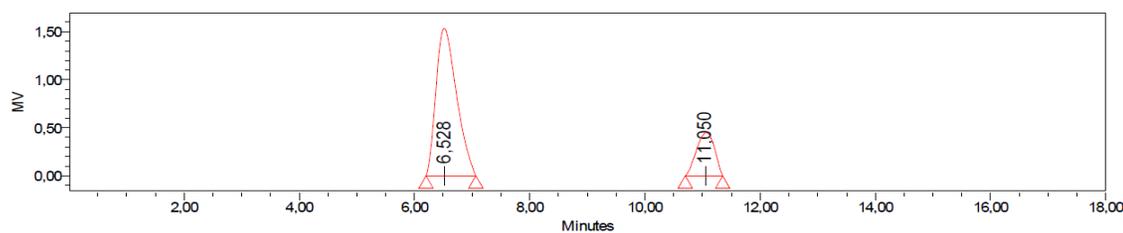
Peak Results

| | Name | RT | Area | Height | Amount | Units |
|---|------|--------|-------|--------|--------|-------|
| 1 | | 6,514 | 33623 | 1417 | | |
| 2 | | 10,933 | 43752 | 1589 | | |

Cromatograma de solução de EPS de *L. perolens* 11P3

Peak Results

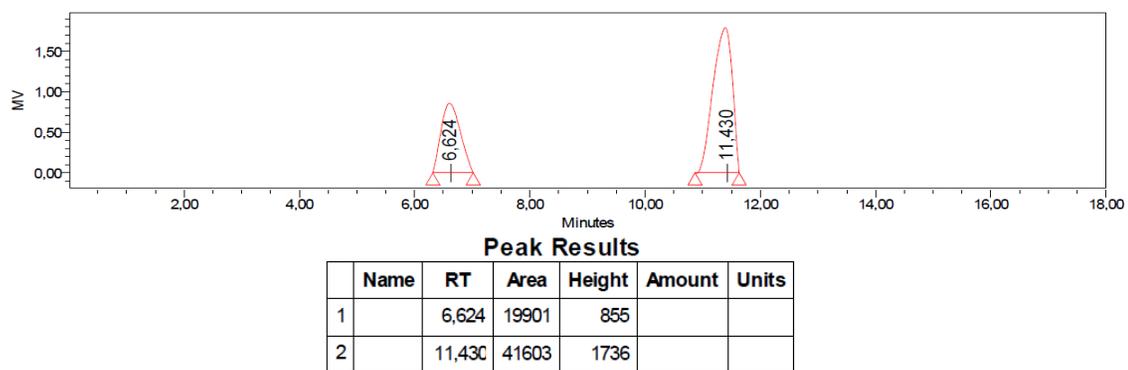
| | Name | RT | Area | Height | Amount | Units |
|---|------|--------|-------|--------|--------|-------|
| 1 | | 6,500 | 9050 | 403 | | |
| 2 | | 10,946 | 24364 | 855 | | |
| 3 | | 13,053 | 11480 | 779 | | |

Cromatograma de solução de EPS de *L. perolens* 17P2

Peak Results

| | Name | RT | Area | Height | Amount | Units |
|---|------|--------|-------|--------|--------|-------|
| 1 | | 6,528 | 38030 | 1532 | | |
| 2 | | 11,050 | 9727 | 449 | | |

Cromatograma de solução de EPS de *L. satusumensis* 18P



Cromatograma de solução de EPS de *L. mali* 19U

Figura 34 – Cromatogramas correspondentes à determinação das massas moleculares de exopolissacarídeos produzidos por *Lactobacillus* e extraídos de grãos de kefir.

APÊNDICE F

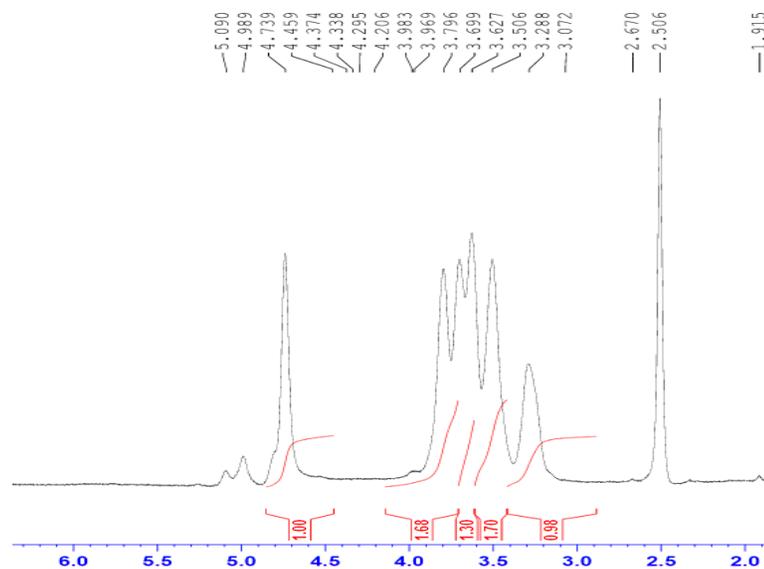


Figura 35 - Espectros de $^1\text{HMRN}$ do EPS produzido por *L. diolivorans*. Os valores expressos são referentes aos deslocamentos químicos expresso em delta (δ) e a intensidade expressa pela área (abaixo do sinal).

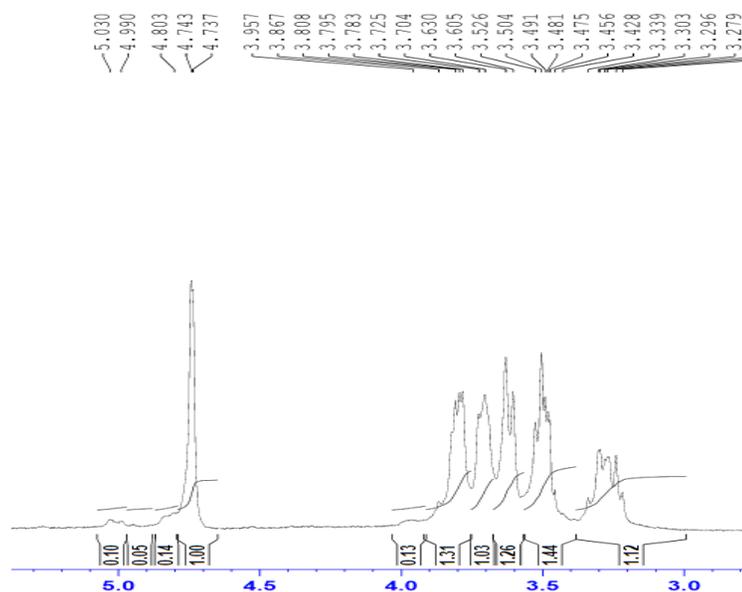


Figura 36 - Espectros de $^1\text{HRMN}$ do EPS produzido por *L. satsumensis* 10P. Os valores expressos são referentes aos deslocamentos químicos expresso em delta (δ) e a intensidade expressa pela área (abaixo do sinal).

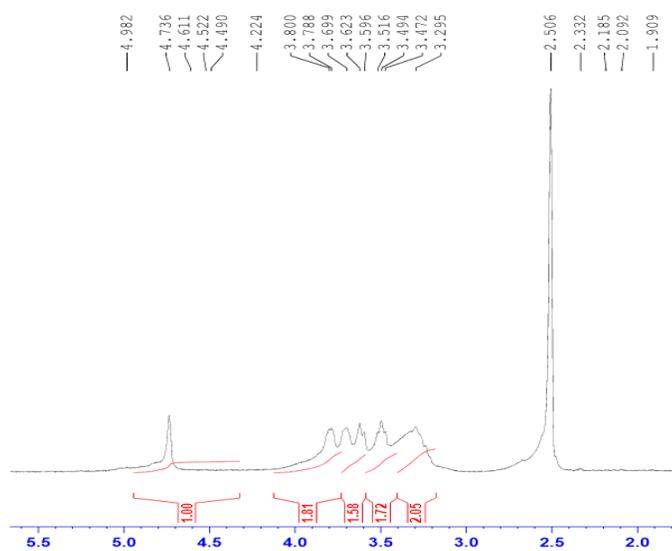


Figura 37 - Espectros de $^1\text{HRMN}$ do EPS produzido por *L. perolens* 11P3. Os valores expressos são referentes aos deslocamentos químicos expresso em delta (δ) e a intensidade expressa pela área (abaixo do sinal).

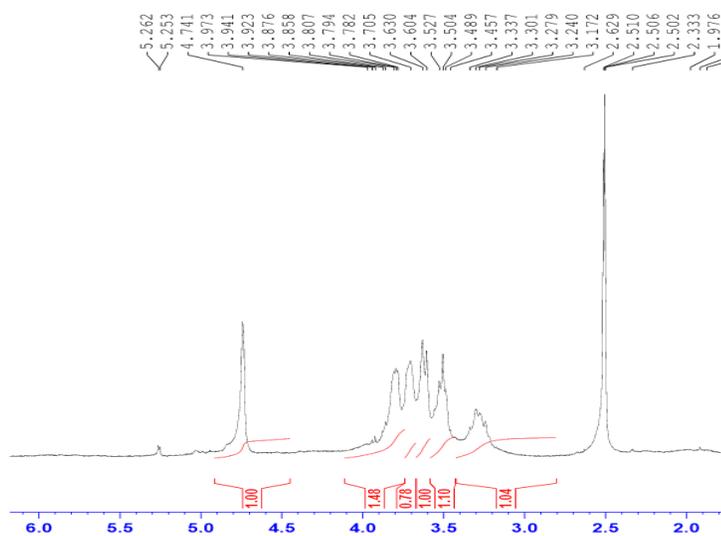


Figura 38 - Espectros de $^1\text{HRMN}$ do EPS produzido por *L. mali* 19U. Os valores expressos são referentes aos deslocamentos químicos expresso em delta (δ) e a intensidade expressa pela área (abaixo do sinal).

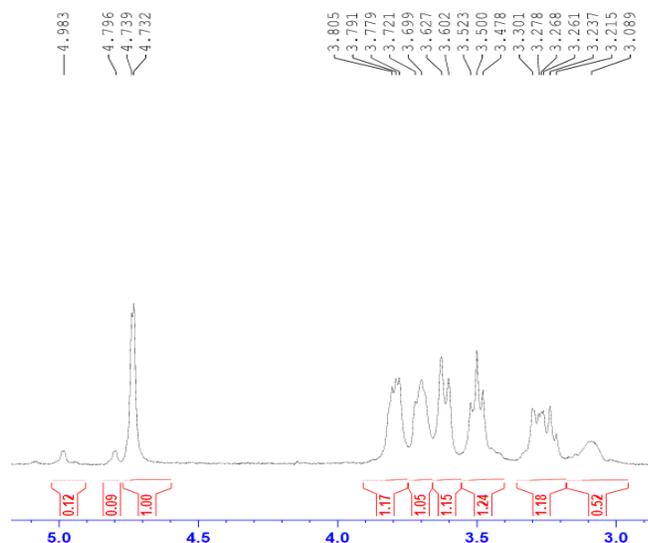


Figura 39 - Espectros de $^1\text{HRMN}$ do EPS extraído de grão de kefir de água de Curitiba. Os valores expressos são referentes aos deslocamentos químicos expresso em delta (δ) e a intensidade expressa pela área (abaixo do sinal).

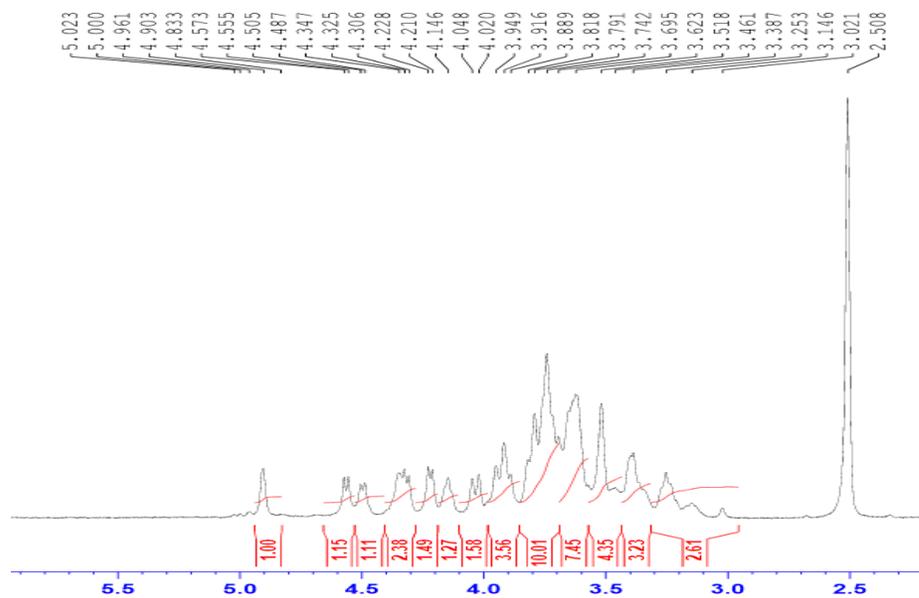


Figura 40 - Espectros de ^1H RMN do EPS extraído de grão de kefir de leite de Salvador. Os valores expressos são referentes aos deslocamentos químicos expresso em delta (δ) e a intensidade expressa pela área (abaixo do sinal).