

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



**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS DA  
MICROBIOTA DE GRÃOS DE KEFIR CULTIVADOS EM LEITE  
OU ÁGUA COM AÇÚCAR MASCAVO POR METODOLOGIAS  
DEPENDENTES E INDEPENDENTES DE CULTIVO**

**ORIENTADA: DÉBORA FERREIRA ZANIRATI**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. ÁLVARO CANTINI NUNES**

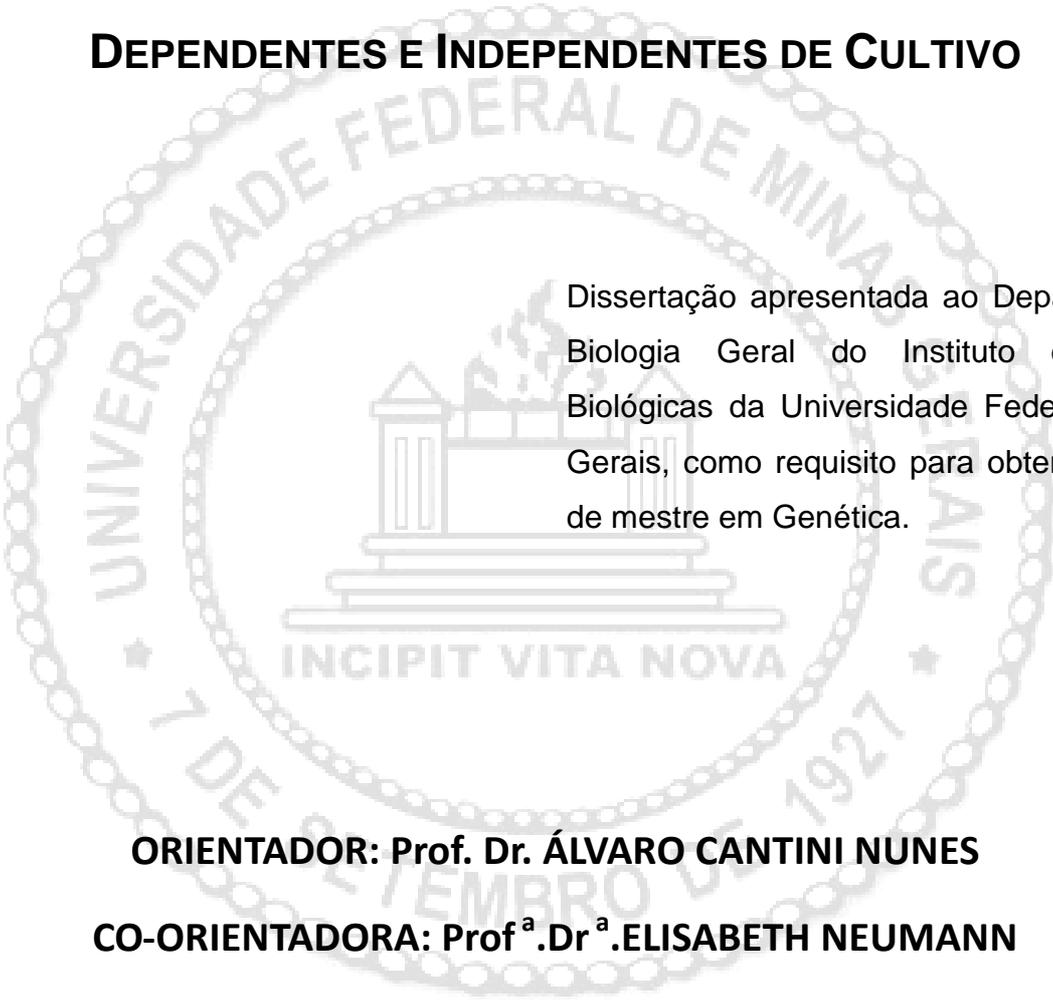
**CO-ORIENTADORA: Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup>.ELISABETH NEUMANN**

**BELO HORIZONTE/MG**

**Julho – 2012**

**DÉBORA FERREIRA ZANIRATI**

**CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS DA  
MICROBIOTA DE GRÃOS DE KEFIR CULTIVADOS EM LEITE  
OU ÁGUA COM AÇÚCAR MASCAVO POR METODOLOGIAS  
DEPENDENTES E INDEPENDENTES DE CULTIVO**



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

**ORIENTADOR: Prof. Dr. ÁLVARO CANTINI NUNES**

**CO-ORIENTADORA: Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup>.ELISABETH NEUMANN**

**BELO HORIZONTE/MG**

**Julho – 2012**

## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Maria das Graças e Sebastião, pelo amor incondicional e apoio em todos os momentos da minha vida. Ao meu amor, Gleison, por seu carinho, companheirismo e compreensão. À minha irmã Viviane, pela ajuda e incentivo para dedicação ao estudo e ao meu irmão-cunhado Vinícius, pela amizade.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus por cada dia de vida, por me dar saúde e perseverança para prosseguir.

Ao meu pai, Sebastião, sempre presente em meu coração e nas minhas lembranças, e a minha mãe, Maria das Graças, pelo amor e dedicação, por serem exemplo de vida e me apoiarem nas minhas decisões. Sou muito grata a vocês por tudo.

Ao meu amor, Gleison, pelo cuidado, carinho, compreensão, por sempre me incentivar e apoiar. Você foi essencial para a realização deste projeto e é essencial em minha vida. Eu te amo muito.

A minha irmã Vivi, por me incentivar a continuar, em meio às dificuldades que passamos juntas. E ao meu cunhado, pela amizade e cuidado comigo como se fosse sua irmã.

Ao meu orientador, professor Dr. Álvaro Cantini Nunes, pela oportunidade e confiança.

A minha Co-orientadora, professora Dra Elisabeth Neumann, pela disposição em ensinar e confiança.

Ao professor Dr. Jacques Robert Nicoli que contribui para o desenvolvimento deste projeto.

Aos membros da banca examinadora por aceitarem o convite.

À coordenação, professores e colegas do curso de Pós-Graduação em Genética do ICB-UFMG.

Aos amigos do Laboratório de Genética Molecular de Protozoários Parasitas – Sávio, Bruno, Luige, Igor, Lenice, Márcia Helena, Cínara e Camila por todos os momentos que compartilhamos no laboratório. Ao Sávio por todos os ensinamentos e grande contribuição para a realização deste projeto.

Ao Mário por toda ajuda inicial ao projeto e a todos do Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos, pelo auxílio, convivência e ensinamentos indispensáveis.

Aos meus bichinhos, Dinho e Zorro, por me alegrarem sempre.

A todos os meus familiares “Ferreira e Zanirati”.

Muito obrigada!

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....</b>	<b>ix</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>2</b>
<b>1- INTRODUÇÃO.....</b>	<b>3</b>
<b>1.1- Grãos de Kefir.....</b>	<b>3</b>
<b>1.2- Efeitos benéficos atribuídos ao consumo de Kefir.....</b>	<b>6</b>
<b>1.3- Bactérias do ácido láctico presentes em grãos de Kefir.....</b>	<b>8</b>
1.3.1-Gênero <i>Lactobacillus</i> .....	8
1.3.2-Gênero <i>Lactococcus</i> .....	10
1.3.3-Gênero <i>Leuconostoc</i> .....	11
<b>1.4- Operon de RNA ribossômico.....</b>	<b>12</b>
<b>1.5-Metodologias dependentes e independentes de cultivo para caracterização de microbiotas associadas a diferentes ecossistemas.....</b>	<b>13</b>
<b>2- RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA DA REALIZAÇÃO DO PROJETO.....</b>	<b>16</b>
<b>3- OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
<b>4- MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>18</b>
<b>4.1- Amostras de Kefir.....</b>	<b>18</b>
<b>4.2- Cultivo dos grãos de Kefir.....</b>	<b>18</b>
<b>4.3- Isolamento e identificação de bactérias lácticas de grãos de Kefir.....</b>	<b>18</b>
4.3.1-Extração do DNA dos isolados crescidos em meio MRS modificado e M- 17.....	20
4.3.2- Identificação dos isolados do gênero <i>Lactobacillus</i> por ARDRA.....	20
4.3.3-Identificação Molecular dos isolados – Outras bactérias do ácido láctico.....	21
<b>4.4- Técnicas independentes de cultivo para caracterização da microbiota dos grãos de Kefir.....</b>	<b>22</b>
4.4.1- Extração do DNA total.....	22
4.4.2- Amplificação por PCR do gene 16S rRNA.....	23
4.4.3- Purificação e Adenilação dos amplicons.....	23
4.4.4- Clonagem do gene 16S rRNA.....	23
4.4.5- Perfil de restrição do amplicon do gene 16S rRNA.....	24
4.4.6- Sequenciamento do gene 16S rRNA.....	24
<b>5- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>26</b>

<b>5.1- Isolamento e caracterização morfofisiológica de microorganismos de Kefir.....</b>	<b>26</b>
<b>5.2- Identificação molecular dos isolados.....</b>	<b>28</b>
<b>5.3- Identificação molecular da microbiota dos grãos de Kefir pelo método independente de cultivo.....</b>	<b>42</b>
<b>6-CONCLUSÃO.....</b>	<b>49</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>50</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>62</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Estrutura molecular dos exopolissacarídeos Kefirano (A) e Dextrano (B).....	4
<b>Figura 2.</b>	Microscopia eletrônica de grãos de Kefir cultivados em água com açúcar (A) e em leite (B).....	5
<b>Figura 3.</b>	Representação esquemática de um operon ribossômico típico de procariotos.....	13
<b>Figura 4.</b>	Percentagem relativa de bactérias lácticas (BAL) isoladas de grãos de Kefir cultivados em leite e água com açúcar mascavo.....	27
<b>Figura 5.</b>	Percentagem de isolados sugestivos de bactérias lácticas (BAL) com os respectivos números de amplicons de 16S-23S do rRNA (ITS-1).....	29
<b>Figura 6.</b>	Géis de agarose a 1,4% dos perfis de restrição da região intergênicas do 16S e 23S rRNA (ITS-1) dos isolados bacterianos de grãos de Kefir presuntivos do gênero <i>Lactobacillus</i> (três amplicons).....	31
<b>Figura 7.</b>	Percentagem de isolados de BAL de amostras de grão de Kefir cultivados em leite (gráficos à esquerda) ou água com açúcar mascavo (gráficos à direita).....	37
<b>Figura 8.</b>	Percentagem total de espécies de BAL obtidas das amostras de grãos de Kefir cultivados em leite ou água com açúcar mascavo.....	39
<b>Figura 9.</b>	Diversidade de espécies bacterianas nas amostras de grãos de Kefir, identificadas por método independente de cultivo.....	45

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1.</b>	Número total de colônias selecionadas de cada amostra de grão de Kefir, a partir do cultivo em meio MRS modificado com soro lático, M-17 e YPG.....	27
<b>Tabela 2.</b>	Número total de isolados selecionados de cada amostra de grão de Kefir, a partir do cultivo em meio MRS modificado com soro lático, separados pelo número de amplicons de ITS-1 (região intergênica 16S e 23S do rRNA).....	29
<b>Tabela 3.</b>	Identificação dos isolados de grão de Kefir, a partir do cultivo em meio MRS modificado com soro lático, por ARDRA do ITS-1 ou sequenciamento do 16S rRNA.....	32
<b>Tabela 4.</b>	Agrupamento molecular dos isolados bacterianos sugestivos de BAL com um e dois amplicons do ITS-1 do rRNA, obtidos do meio MRS modificado com soro lático.....	35
<b>Tabela 5.</b>	Sequenciamento do gene 16S do rRNA dos isolados bacterianos sugestivos de BAL com um e dois amplicons de ITS-1, obtidos do meio MRS modificado com soro lático.....	36
<b>Tabela 6.</b>	Descrição das espécies obtidas após análise do sequenciamento do gene 16S do rRNA dos clones das amostras de grãos de Kefir.....	43

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

$\beta$  - Beta

$\mu\text{g}$  – Micrograma

$\mu\text{l}$  – Microlítro

$^{\circ}\text{C}$  - Grau Célsius

% - Percentagem

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ARDRA – “Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis” / Análise de restrição do DNA ribossômico amplificado

BAL – Bactérias do Ácido Lático

BLAST – Basic Locus Alignment Search Tool

C – Citosina

$\text{CO}_2$  – Gás carbônico

DGGE – “Denaturing gradient gel electrophoresis”/ “Eletroforese em gel de gradiente desnaturante”

DNA – “Deoxyribonucleic acid” / Ácido Desoxirribonucléico

EDTA – “Ethylenediamine tetraacetic acid”/ “Ácido etilendiamino tetra-acético”

EPS – Exopolissacarídeo

FAO – “Food and Agriculture Organization of the United Nations”

g - Grama

G – Guanina

GRAS – “Generally Recognized as Safe” / Geralmente Reconhecido como Seguro

GTF – Glicosiltransferase

h - Hora

$\text{H}_2$  – Hidrogênio

IgA – Imunoglobulina A

IL-4 – Interleucina 4

IL-6 – Interleucina 6

IL-10 – Interleucina 10

ITS - “Internal Transcribed Spacer” / Espaçador Interno Transcrito

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

Kb – Kilobase

Kg - Kilograma

KLCU – Kefir de Leite de Curitiba

KLDI – Kefir de Leite de Divinópolis

KLSA – Kefir de Leite de Salvador

KLVI – Kefir de Leite de Viçosa

L – Litro

LB – Lysogeny Broth

LiCl – Cloreto de lítio

M – Molar

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MG – Minas Gerais

mg – Miligrama

mL – Mililitro

Mm – Milimolar

mm – milímetro

MRS – *Man – Rogosa – Sharpe*

n° - Número

N<sub>2</sub> – Nitrogênio

NaCl – Cloreto de sódio

NAGE – Núcleo de Análise de Genoma e Expressão Gênica

NCBI – National Center for Biotechnology Information

OTU – Operational Taxonomic Unit

pb – Pares de Bases

PCR – “Polymerase Chain Reaction” / Reação em Cadeia da Polimerase

PCR- DGGE - “Polymerase Chain Reaction - Denaturing gradient gel electrophoresis/  
Reação em Cadeia da Polimerase - Eletroforese em gel com gradiente de desnaturação.

pH – Potencial Hidrogeniônico

ppm – Partes por milhão

rRNA – Ácido ribonucléico ribossômico

Tris-HCl – “Trishydroxymethylaminomethane-hydrochloride” / Hidrocloreto de  
Trishidroximetilaminometano

tRNA – Ácido ribonucléico Transportador

UFC – Unidade Formadora de Colônia

UV – Ultra Violeta

V – Volts

WHO – “World Health Organization”/ Organização Mundial da Saúde

YPG – Yeast Peptone Glucose

## RESUMO

Os grãos de Kefir são estruturas semelhantes a pedaços de couve-flor, constituídos por um conjunto complexo de bactérias e leveduras firmemente aderidas e encapsuladas por uma trama de polissacarídeos insolúveis, utilizados para a produção de uma bebida fermentada, ácida, levemente alcoólica, denominada Kefir. Originalmente os grãos eram cultivados apenas em leite, mas atualmente outros substratos têm sido utilizados como meio de cultivo (solução aquosa de açúcar mascavo, leite de soja, dentre outros), o que pode alterar a microbiota dos mesmos. Diante disso, este trabalho pretende identificar e caracterizar as bactérias do ácido láctico de grãos de Kefir, utilizando métodos dependentes e independentes de cultivo. Para tanto, foram obtidas oito amostras de grãos provenientes de Viçosa (MG), Belo Horizonte (MG), Salvador (BA), Curitiba (PR) e Divinópolis (MG), sendo quatro cultivadas em água com açúcar mascavo e quatro em leite. Dez gramas de cada amostra foram diluídas e plaqueadas em ágar MRS modificado e ágar M-17. Após identificação preliminar, 117 isolados, sugestivos de *Lactobacillus*, foram submetidos à identificação por PCR-ARDRA, obtendo-se as seguintes espécies: *L. crispatus*, *L. casei*, *L. kefir*, *L. diolivorans*, *L. perolens*, *L. mali*, *L. satsumensis* e *L. parafarraginis*. Foram ainda isolados e identificados *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactococcus lactis* e *Oenococcus oeni*. Posteriormente, o DNA total extraído de dez gramas de quatro amostras de grão de Kefir foi submetido à reação de PCR do gene 16SrRNA e os amplicons obtidos foram clonados e transformados. Aleatoriamente, foram selecionadas 80 colônias que foram analisadas por PCR utilizando primers específicos do vetor TOPO 2.1. Os amplicons gerados de 50 colônias transformantes foram digeridos separadamente com as enzimas *TaqI* e *Sau3AI*, para agrupamento das amostras e posterior sequenciamento. Através desta metodologia, independente de cultivo, foram identificadas as seguintes espécies: *L. kefiranofaciens*, *L. kefir*, *L. satsumensis*, *L. hilgardii*, *L. mali*, *L. paracasei*, *L. nagelii*, *L. casei*, *Oenococcus kitaharae*, *Oenococcus oeni*, *Enterobacter ludwigii* e *Klebsiella pneumoniae*, sendo também identificados dois microorganismos não cultiváveis: Uncultured bacterium clone y-OTU2 e Uncultured *Lactobacillus*. Algumas espécies de *Lactobacillus* não puderam ser cultivadas, mas foram detectadas pelo método independente de cultivo. Outras foram cultivadas, porém não detectadas pelo método independente de cultivo. Este resultado sugere ser importante a utilização de ambos os métodos para o conhecimento da diversidade de bactérias do ácido láctico em grãos de Kefir. Além disso, o substrato onde o grão de Kefir é cultivado e o local de origem parecem interferir na diversidade de bactérias lácticas presentes no mesmo.

Palavras chave: Grãos de Kefir, *Lactobacillus* spp., Isolamento, PCR-ARDRA

## ABSTRACT

The Kefir grains are similar in structure to pieces of cauliflower, composed by a variety of bacteria and yeast which are firmly bonded and encapsulated by an insoluble polysaccharide matrix,, that are used to produce a sour, slightly alcoholic fermented beverage, called Kefir. Although Kefir grains were originally cultured in milk, other substrates have been used as culture medium (aqueous solution of brown sugar or soy milk). Thus, the aim of this study was to identify and characterize the lactic acid bacteria of kefir grains, using culture-dependent and culture-independent methods. For this purpose, eight samples of kefir grains were obtained from Viçosa (MG), Belo Horizonte (MG), Salvador (BA), Curitiba (PR) and Divinópolis (MG), four grown in water with brown sugar and four in milk. Ten grams of each sample were diluted and plated on modified MRS agar and M-17 agar. After preliminary identification tests, 117 isolates suggestive of *Lactobacillus* were submitted to identification by PCR-ARDRA and the species identified were: *L. crispatus*, *L. casei*, *L. kefir*, *L. diolivorans*, *L. perolens*, *L. mali*, *L. satsumensis* and *L. parafarraginis*. *Leuconostoc mesenteroides*, *Oenococcus oeni* and *Lactococcus lactis* were also isolated and identified by the culture-dependent method. Ten grams of four samples of Kefir grains were treated to obtain total DNA, being submitted to PCR and 16S rRNA gene amplicons obtained were cloned and transformed. Eighty colonies were randomly selected and analyzed by colony PCR using specific primers of the TOPO 2.1 vector. The amplicons of fifty transformant colonies were separately digested with restriction enzymes TaqI and Sau 3AI, for grouping of the samples and subsequent sequencing. Through this culture-independent method, species were identified as follows: *L. kefiranofaciens*, *L. kefir*, *L. satsumensis*, *L. hilgardii*, *L. mali*, *L. paracasei*, *L. nagelii*, *L. casei*, *Oenococcus kitaharae*, *Oenococcus oeni*, *Enterobacter ludwigii* and *Klebsiella pneumoniae*, and two non-cultivable microorganisms were also identified: uncultured bacterium clone-y OTU2 and uncultured *Lactobacillus*. Some species of lactobacilli were not recovered by culture-dependent method but were detected by culture-independent method. On the other hand, some lactobacilli were cultivated but not detected by culture-independent method. These results suggest that both culture-independent and culture-dependent methods are important to understand the diversity of lactic acid bacteria in Kefir grains. Besides, food matrix and origin place might interfere with lactic acid bacteria diversity of Kefir grains.

Keywords: kefir grains, *Lactobacillus* spp., Isolation, PCR-ARDRA.

## 1- INTRODUÇÃO

### 1.1- Grãos de Kefir

Os grãos de Kefir são semelhantes a pedaços de couve-flor constituídos por um conjunto complexo de mais de 40 espécies de bactérias do ácido láctico e leveduras que se encontram firmemente aderidas e encapsuladas por uma trama de polissacarídeos insolúveis que são secretados por algumas destas espécies (Marshall, 1993). Essa matriz polissacarídica, também chamada de kefirano, retém uma comunidade relativamente estável e constante de microrganismos (Marshall, 1993).

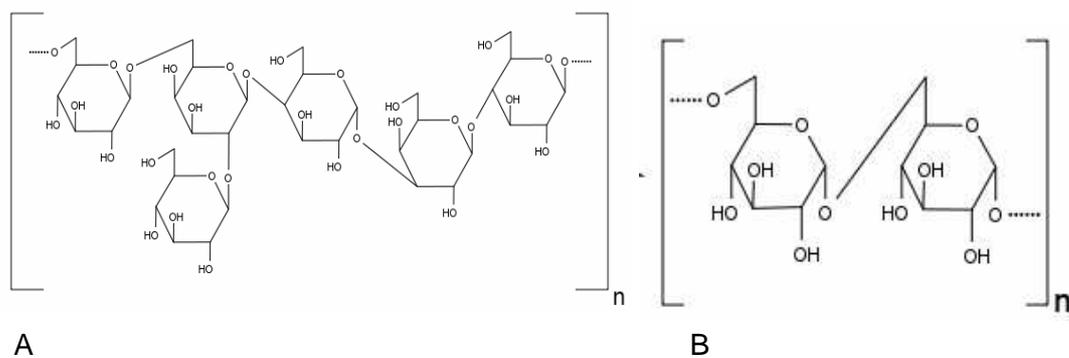
A partir dos grãos de Kefir, obtêm-se uma bebida fermentada, ácida, levemente alcoólica, denominada Kefir. (Guzel-Seydim et al., 2011). As leveduras e bactérias do ácido láctico coexistem em uma associação simbiótica responsável pelas propriedades do Kefir (Leroi e Pidoux, 1993; Zhou et al., 2009). Este termo se originou do eslavo “keif” que significa “bem-estar” ou “bem-viver”. O Kefir tem sido consumido há milhares de anos na região das montanhas do Cáucaso, de onde é originário, e somente no final do século XIX é que se popularizou fora da Rússia, sendo atualmente definido como o iogurte do século 21 (Schneendorf e Anfiteatro, 2004). Existem no mercado produtos comerciais à base de Kefir disponíveis em alguns países como, por exemplo, Kefir líquido, comercializado nos Estados Unidos, Kefir pastoso com cereais, comercializado na França e sorvete de Kefir, comercializado na Polônia (Gorsek e Tramsek, 2008; Zhou et al., 2009; Miguel et al., 2010).

No Brasil, de acordo com a Instrução Normativa nº 46 de 2007 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Kefir é o produto da fermentação do leite pasteurizado ou esterilizado obtido com cultivos ácido-lácticos elaborados com grãos de Kefir, *Lactobacillus kefiri*, espécies dos gêneros *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Acetobacter* com produção de ácido láctico, etanol e dióxido de carbono. Os grãos de Kefir são constituídos por leveduras fermentadoras de lactose (*Kluyveromyces marxianus*) e leveduras não fermentadoras de lactose (*Saccharomyces omnisporus*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces exiguus*), *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium* spp. e *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*.

No entanto, os grãos de Kefir também podem ser cultivados em açúcar mascavo, leite de soja ou sucos de frutas sendo a coloração dos mesmos dependentes do substrato utilizado

para o cultivo. Os grãos são amarelo-claros quando cultivados em leite, ocres e pardos se crescidos em açúcar mascavo ou purpúreos se cultivados em suco de uva (Guzel-Seidym et al., 2000). O tamanho dos grãos varia de 3 a 30 mm de diâmetro e a composição microbiológica dos mesmos depende da origem, das condições de cultivo e de armazenamento (Garrote et al., 2001; Farnworth e Mainville, 2003; Miguel et al., 2010).

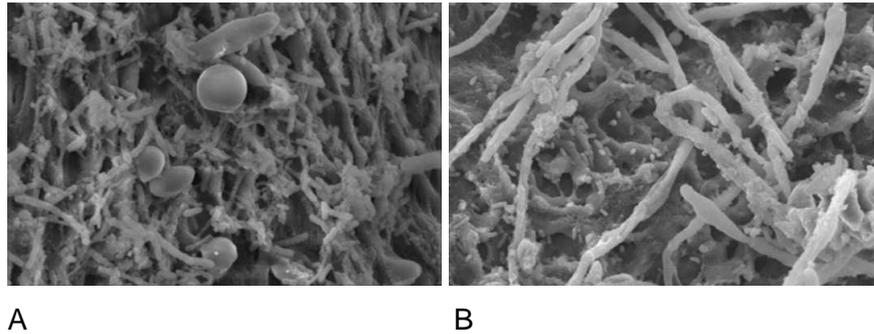
Os grãos de Kefir cultivados em leite são compostos por um complexo heteropolissacarídeo denominado kefirano, enquanto aqueles cultivados em água com açúcar mascavo são compostos por dextrano (Hsieh et al., 2012). A figura 1 mostra a estrutura molecular destes exopolissacarídeos presentes no grão de Kefir.



**Figura 1.** Estrutura molecular dos exopolissacarídeos Kefirano (A) e Dextrano (B).

Fonte: A- Micheli et al. (1999) e B - Waldher et al. (2010).

Nos grãos de Kefir é encontrada uma diversidade microbiológica elevada que inclui espécies de leveduras (*Kluyveromyces*, *Pichia* e *Saccharomyces*), bactérias do ácido láctico (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* e *Streptococcus*), bactérias do ácido acético e outros microorganismos ainda não descritos (Garrote et al., 1997; 2001; Guven e Gulmez, 2003; Miguel et al., 2010; Guzel-Seydim et al., 2011). A figura 2 ilustra a presença de bactérias e leveduras em grãos de Kefir cultivados em substratos diferentes.



**Figura 2.** Microscopia eletrônica de grãos de Kefir cultivados em água com açúcar (A) e em leite (B). Fonte: Hsieh, H.-H., et al. (2012); doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.04.014.

Várias bactérias do ácido lático têm sido isoladas de grãos de Kefir e identificadas por métodos dependentes de cultivo: *Lactobacillus acidophilus* (Angulo et al., 1993; Sabir et al., 2010), *Lactobacillus casei* (Angulo et al., 1993; Sabir et al., 2010; Magalhães et al., 2011), *L. delbrueckii* (Simova et al., 2002; Witthuhn et al., 2004), *L. helveticus* (Angulo et al., 1993; Lin et al., 1999; Simova et al., 2002; Mainville et al., 2006; Miguel et al., 2010; Sabir et al., 2010), *L. kefir* (Takizawa et al., 1998, Chen et al., 2008, Miguel et al., 2010, Magalhães et al., 2011), *L. parakefir* (Takizawa et al., 1998, Mainville et al., 2006, Miguel et al., 2010), *L. kefirgranum*, *L. kefiranofaciens* (Takizawa et al., 1998), *L. plantarum* (Garrote et al., 2001; Miguel et al., 2010), *L. satsumensis* (Miguel et al., 2010), *L. sunkii* (Miguel et al., 2011), *L. mali* (Hsieh et al., 2012), *L. hordei* (Gulitz et al., 2011; Hsieh et al., 2012), *Leuconostoc mesenteroides* (Lin et al., 1999; Garrote et al., 2001; Witthuhn et al., 2004; Hsieh et al., 2012), *Lactococcus lactis* (Garrote et al., 2001; Simova et al., 2002; Witthuhn et al., 2004, Chen et al., 2008), *Lactobacillus diolivorans* (Kesmen e Kacnaz, 2011), *Streptococcus thermophilus*, *L. brevis*, *L. paracasei* subsp. *paracasei* (Simova et al., 2002), *L. nagelii*, *L. hilgardii* e *Leuconostoc citreum* (Gulitz et al., 2011).

Bactérias do ácido lático também têm sido identificadas por métodos independentes de cultivo: *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus helveticus* (Zhou et al., 2009), *L. kefiranofaciens* (Zhou et al., 2009; Kesmen e Kacnaz, 2011), *L. casei* (Zhou et al., 2009; Magalhães et al., 2010), *Leuconostoc mesenteroides* (Zhou et al., 2009; Hsieh et al., 2012), *Leuconostoc citreum*, *L. parabuchneri* (Magalhães et al., 2010), *L. kefir* (Zhou et al., 2009; Miguel et al., 2010; Magalhães et al., 2010), *L. paracasei* (Miguel et al., 2010; Magalhães et al., 2010), *L. satsumensis*, *L. uvarum*, *L. plantarum* (Miguel et al., 2010), *L. mali* e *L. hordei* (Hsieh et al., 2012).

## 1.2- Efeitos benéficos atribuídos ao consumo de Kefir

Devido ao aumento do consumo da bebida Kefir em diversos países do mundo, o Kefir, grãos de Kefir, kefirano, e as bactérias encontradas no Kefir têm sido objeto de estudos científicos que visam demonstrar os benefícios potenciais dos mesmos para a saúde humana. O número de microorganismos no Kefir ( $10^7$  UFC/g) é alto o suficiente para considerá-lo como um probiótico. Durante o processo de fermentação, metabólitos microbianos e/ou constituintes degradados da matriz alimentar se acumulam na bebida e também podem produzir efeitos benéficos à saúde (Farnworth & Mainville, 2003).

O efeito antitumoral do kefirano foi primeiramente relatado por Shiomi et al. (1982) pela administração em camundongos do polissacarídeo, isolado a partir de grãos de Kefir, dissolvido na água durante sete dias, antes da inoculação de células de carcinoma de Ehrlich, e continuamente durante 24 dias. Em outro grupo, o início do tratamento com o polissacarídeo ocorreu no mesmo dia da inoculação de células tumorais e permaneceu durante 24 dias. Quarenta a 59% de inibição do crescimento do tumor foi encontrado nos camundongos que receberam 0,02 a 0,1% do polissacarídeo em água, tanto naqueles que receberam o polissacarídeo antes da inoculação de células tumorais ou ao mesmo tempo.

Moreno de LeBlanc et al. (2006) induziram câncer de mama em camundongos e observaram que camundongos que receberam alimentação durante 27 dias com Kefir e com uma fração sobrenadante de Kefir livre de células viáveis apresentaram uma redução no crescimento do tumor e aumento de células produtoras de IgA na lâmina própria.

Liu et al. (2002) realizaram um experimento para avaliação da atividade antimutagênica do Kefir em camundongos que foram alimentados com leite reconstituído, Kefir de leite, leite de soja ou Kefir de soja uma semana após a inoculação de células tumorais de sarcoma 180 sob a pele abdominal. Esses autores demonstraram que a administração oral de Kefir cultivado em leite ou soja resultou em inibição significativa do crescimento do tumor após 30 dias.

Os efeitos protetores do Kefir e da vitamina C contra a toxicidade de azoximetano em camundongos foi estudada por Sozmen et al. (2005), os quais verificaram que a administração de Kefir foi capaz de reduzir a gravidade das lesões no fígado dos animais provocadas por essa droga. Cenesiz et al. (2008) concluíram que o Kefir tem um efeito antioxidante em camundongos com formação de cripta colônica anormal induzida por azoximetano. No grupo azoximetano, os níveis de malondialdeído e óxido nítrico foram

aumentados no estômago, fígado, baço e cólon enquanto que o grupo Kefir-azoximetano apresentou níveis mais baixos destes compostos presentes nos órgãos.

Liu et al. (2006) relataram que a administração de Kefir de leite e Kefir de leite de soja baixaram o triacilglicerol sérico e as concentrações de colesterol total em camundongos.

Vinderola et al. (2005) investigaram a importância da dose do Kefir e a viabilidade das células para se obter uma resposta imune na mucosa intestinal de camundongos e foi observado que o Kefir aumentou a atividade fagocitária dos macrófagos peritoneal e pulmonar. Num segundo estudo, realizado em 2006, estes mesmos autores investigaram a capacidade imunomodulatória do kefirano produzido pelo *L. kefiranofaciens* presente no Kefir. A administração oral de kefirano (100 mg/kg) durante 7 dias resultou na melhora da mucosa intestinal com um número aumentado de células produtoras de IgA e causou um aumento concomitante de células produtoras de IL-4, IL-6 e IL-10 no intestino delgado.

Uma proporção significativa da população mundial é intolerante à lactose, devido à insuficiente atividade de  $\beta$ -galactosidase intestinal. A enzima  $\beta$ -galactosidase degrada lactose em glicose e galactose. Na ausência da enzima, a lactose intacta é transportada para o trato intestinal aonde as bactérias coliformes irão digeri-la e produzir dióxido de carbono que pode causar desconforto e sintomas gastrointestinais (Guzel-Seydim, et al. 2011). Durante a fermentação do ácido láctico, uma quantidade significativa de lactose é utilizada e a concentração total de lactose diminui. De Vrese et al. (1992) investigaram o efeito do consumo de Kefir na degradação de lactose. Em ensaios com animais, a equipe relatou que os picos de galactose pós-prandial no sangue aumentaram em 30% com o consumo de Kefir. Hertzler e Clancy (2003) realizaram um estudo em humanos para determinar o efeito da bebida Kefir sobre a intolerância a lactose em adultos com má digestão da lactose e foi concluído que o consumo de Kefir reduziu a severidade da flatulência em 71% dos pacientes do estudo.

Devido aos vários efeitos benéficos comprovados pela ingestão do Kefir e por conter um número alto de microorganismos ( $10^7$  UFC/g), o Kefir é uma fonte provável de probióticos de interesse. Pela definição da FAO/WHO (2002) probióticos são “microorganismos viáveis, que quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios para a saúde do hospedeiro”. Tal fato coloca este produto alimentar na categoria de “alimento funcional”. Segundo a Portaria nº 389, de 30/04/99 da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (ANVISA), “é alimento funcional todo aquele alimento ou ingrediente que, além das suas funções nutritivas básicas, quando consumido como parte da dieta

usual, produz efeitos metabólicos e/ou fisiológicos benéficos à saúde humana”. Por estas razões, pesquisas envolvendo o Kefir tem aumentado na última década, tanto para conhecimento dos microorganismos envolvidos nos potenciais benefícios como para desenvolvimento de tecnologias que garantam a persistência da funcionalidade durante a produção e armazenamento da bebida (Guzel-Seydim et al., 2011).

### **1.3- Bactérias do ácido láctico presentes em grãos de Kefir**

#### 1.3.1-Gênero *Lactobacillus*

O gênero *Lactobacillus* compreende um grupo grande e heterogêneo de microorganismos em forma de cocobacilos ou bastonetes, de baixo conteúdo G+C, Gram-positivo, geralmente catalase negativo, não esporulantes e anaeróbicos facultativos ou que crescem em microaerofilia (Bernardeau et al., 2008). Taxonomicamente, os lactobacilos são eubactérias que pertencem ao filo Firmicutes, classe Bacilli, ordem Lactobacillales, família Lactobacillaceae (Lebeer et al., 2008). Os lactobacilos são fermentadores de glicose, a maioria homofermentativa, onde o ácido láctico é o produto majoritário final da fermentação; mas há representantes heterofermentativos, também com produção de lactato, além de CO<sub>2</sub> e etanol em quantidades equimolares. A conversão de açúcares a ácido láctico, dentre outras características, faz dos *Lactobacillus* membros do grupo das bactérias lácticas (BAL), grande grupo de bactérias Gram-positivas utilizadas desde tempos imemoriais na elaboração, processamento e preservação de diversos produtos alimentícios (Cross, 2002).

Atualmente o gênero *Lactobacillus* apresenta 182 espécies e 27 subespécies (Euzéby, 2012<sup>a</sup>). Ocupam diversos nichos em que carboidratos fermentáveis encontram-se disponíveis, como o trato gastrointestinal e vaginal, a pele e os pulmões dos animais, além da matéria orgânica dos solos e associados aos vegetais (Felis e Dellaglio, 2007). Estão presentes em muitos tipos de alimentos como cereais, bebidas fermentadas, queijos e produtos lácteos, carnes e derivados, dentre outros (Hammes e Hertel, 2006).

Bactérias pertencentes ao gênero *Lactobacillus* são muito frequentemente empregadas como probióticos por serem consideradas seguras para a saúde do hospedeiro (GRAS - “generally recognized as safe”), uma vez que não são patogênicas e nem capazes de transmitir os fatores de resistência a antimicrobianos para bactérias patogênicas, o que

dificultaria a cura de infecções, um aspecto importante em relação aos riscos para a saúde pública e segurança dos produtos (Gomes e Malcata, 1999; Oliveira et al., 2002).

Muitos grupos de pesquisa descrevem a atividade imunomodulatória de espécies de *Lactobacillus*. Driessen e de Boer (1989) demonstraram que uma cepa de *L. casei* inibiu o crescimento de cepas patogênicas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Listeria* em camundongos provocando um aumento nos níveis de macrófagos. Malin et al. (1996) investigaram o efeito da ingestão de *L. rhamnosus* GG sobre a barreira imunológica intestinal em pequeno estudo de 14 crianças com Doença de Crohn e sete pacientes controles (hospitalizados para investigação de dor abdominal, mas sem evidência de doença intestinal). A Cepa GG foi administrada a pacientes e controles à  $10^{10}$ UFC, duas vezes ao dia, misturadas em líquido e foi observado um aumento significativo na produção de IgA nos pacientes com Doença de Crohn, mas não para os controles.

O efeito de microrganismos probióticos na modulação do colesterol sanguíneo já foi demonstrado por diversos trabalhos, como o de Gilliland (1990) que utilizando suínos alimentados com dieta rica em colesterol suplementada com *L. acidophilus*, mostraram uma redução significativa nas concentrações de colesterol sérico no grupo que recebeu a suplementação, em relação ao grupo controle. Outros estudos demonstraram que os níveis de colesterol no plasma sanguíneo são mais baixos em camundongos axênicos colonizados com *L. acidophilus* (Grunewald, 1982; Zacconi et al., 1992; Fukushima e Nakano, 1996; Tortuero, 1997). Taranto et al. (2000) mostraram que a administração de *L. reuteri* CRL 1098 ( $10^4$  células/dia) a camundongos durante 7 dias foi capaz de evitar a hipercolesterolemia. Observou-se um aumento de 17% na proporção entre lipoproteína de alta densidade e lipoproteína de baixa densidade e o colesterol total no soro e os níveis de triglicérides diminuíram 22 e 33%, respectivamente, em camundongos que receberam o *L. reuteri*.

*L. acidophilus*, *L. casei* e *L. helveticus* isoladas de Kefir na Turquia apresentaram propriedades probióticas potenciais, como demonstrado por Sabir et al. (2010). Estes realizaram testes *in vitro* avaliando fatores como a produção de peróxido de hidrogênio, produção de ácido lático, resistência a sais biliares e a suco gástrico, quantificação de exopolissacarídeos e resistência a antibióticos.

### 1.3.2- Gênero *Lactococcus*

O gênero *Lactococcus* é um grupo pequeno de microrganismos em forma de cocos, Gram-positivo, catalase negativo e não esporulantes (Cassalta e Montel, 2008). Taxonomicamente, os lactococos são eubactérias que pertencem ao filo Firmicutes, classe Bacilli, ordem Lactobacillales, família Streptococcaceae (Euzéby<sup>b</sup>, 2012).

Atualmente o gênero *Lactococcus* apresenta 7 espécies e 4 subespécies, sendo *Lactococcus chungangensis*, *Lactococcus fujiensis*, *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremonis*, *Lactococcus lactis* subsp. *hordniae*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *tractae*, *Lactococcus piscium*, *Lactococcus plantarum* e *Lactococcus raffinolactis* (Euzéby, 2012<sup>c</sup>). Este gênero é encontrado em plantas e em pele de animais, sendo que a espécie *Lactococcus garvieae* foi isolada de peixe, *Lactococcus plantarum* de plantas e *Lactococcus piscium* de salmão (Cassalta & Montel, 2008).

As espécies *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremonis* são mais frequentemente encontradas em queijo, leite e produtos fermentados apresentando a função de acidificação principalmente pela produção de ácido láctico. Contribuem para o desenvolvimento da textura, pela produção de exopolissacarídeo, e para o sabor pela produção de compostos aromáticos como álcoois, cetonas e aldeídos. Também podem ser usadas para a conservação de alimentos devido sua produção de ácidos orgânicos (Cassalta & Montel, 2008).

Os lactococcus são homofermentadores de glicose, onde o ácido láctico é o produto final majoritário da fermentação. As bactérias pertencentes ao gênero *Lactococcus* podem ser empregadas como probióticos sendo consideradas seguras (GRAS - "generally recognized as safe). A espécie *Lactococcus lactis* não pode ser considerado como um patógeno oportunista, uma vez que apenas dois casos de endocardite foram relatados na literatura médica ao longo de um período de 50 anos (Cassalta & Montel, 2008).

Um artigo recente de Samar et al. (2012) demonstrou uma nova bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* BMG6.14 que apresentou atividade antimicrobiana contra várias bactérias lácticas e cepas patogênicas incluindo *Listeria monocytogenes*.

Li et al. (2012) demonstraram que uma cepa recombinante de *Lactococcus lactis* MG1363 com atividade de  $\beta$ -galactosidase, comprovou aliviar os sintomas de diarreia induzida por

lactose em camundongos BALB/c modelo para intolerância a lactose, com o provável mecanismo de colonização predominante da comunidade microbiana intestinal, o que torna esta cepa um probiótico promissor para uso em pacientes com intolerância a lactose.

### 1.3.3- Gênero *Leuconostoc*

O gênero *Leuconostoc* é um grupo de microorganismos em forma de cocos ou cocobacilos, dispostos em pares ou cadeias, Gram-positivo, catalase negativo, não esporulante e anaeróbio facultativo (Ogier et al., 2008). Taxonomicamente, os leuconostocs são eubactérias que pertencem ao filo Firmicutes, classe Bacilli, ordem Lactobacillales, família Leuconostocaceae (Euzéby<sup>b</sup>, 2012).

Atualmente o gênero *Leuconostoc* apresenta 23 espécies e 3 subespécies (Euzéby, 2012<sup>d</sup>). Este gênero é encontrado em plantas frescas e a partir deste habitat natural disseminaram para vários nichos incluindo leite e produtos alimentares refrigerados (Ogier et al., 2008). Desempenham um importante papel em processos industriais e na fermentação de alimentos, tais com embutidos, produtos vegetais, cereais e lácteos (Ogier et al., 2008).

As espécies *Leuconostoc mesenteroides* e *Leuconostoc lactis* desempenham um papel importante na formação do aroma, sabor e textura dos produtos lácteos por produzir compostos aromáticos como diacetil e cetonas (Ogier et al., 2008).

Os leuconostocs são heterofermentadores de glicose, com a produção de ácido láctico, D-lactato, além de CO<sub>2</sub> e etanol como produtos da fermentação. As bactérias pertencentes ao gênero *Leuconostoc* podem ser empregadas como probióticos sendo consideradas seguras (GRAS - "generally recognized as safe). Alguns casos clínicos de infecções humanas por estes microorganismos tem sido relatados na literatura, levando a sua classificação como agentes patogênicos oportunistas. No entanto, estes casos relatados ocorreram apenas em pacientes imunodeprimidos (Ogier et al., 2008).

Várias linhagens de *Leuconostoc* isoladas de carne são produtoras de bacteriocina sendo elas *Leuconostoc gelidum* UAL 187, *Leuconostoc paramesenteroides*-La7a, *Leuconostoc carnosum* - Talla e *Leuconostoc carnosum* - La54a. Todas produzem bacteriocinas que são ativas contra *Listeria monocytogenes* e outras bactérias lácticas causadoras de deterioração da carne (Hastings et al.,1994). Parente et al. (1996) demonstraram a

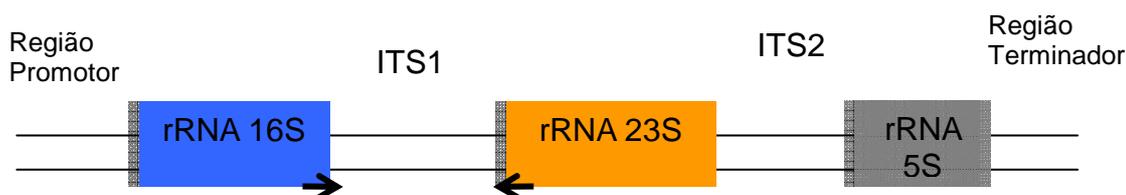
presença de uma bacteriocina, Leucocin F10, produzida por uma estirpe de *Leuconostoc carnosum*, isolado a partir de fermentado de carne, capaz de inibir *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus sakei*, algumas cepas de *Listeria monocytogenes* e *Streptococcus thermophilus*.

#### 1.4- Operon de RNA ribossômico

Os RNAs ribossômicos (rRNA) são moléculas antigas, constituintes importantes do ribossomo, responsável pela síntese proteica de todos os organismos, e de amplo interesse evolutivo tanto em procariotos como em eucariotos. Nos procariotos esta organela é formada por duas subunidades ribossômicas: a subunidade 30S, composta por proteínas e o 16S rRNA, e a subunidade 50S, composta por proteínas e pelos rRNAs 5S e 23S (Woese, 1987). Para garantir a produção dos três tipos de RNA em quantidades iguais, os genes que dão origem aos rRNAs de ambas as subunidades, 5S (120 pb), 16S (1542 pb) e 23S (2904 pb), estão organizados em um operon como ilustrado na Figura 3. Apesar da maioria das espécies de procariotos possuírem no máximo duas cópias do operon ribossômico, algumas espécies podem conter múltiplas cópias em seu genoma variando de três a oito e, em poucas espécies, chegando a 15 cópias (Tourova, 2003).

A escolha dos genes de rRNA para os estudos de caracterização da microbiota é decorrente de diversas características: os rRNAs são fundamentais para a maquinaria de síntese proteica e, portanto, são funcionalmente e evolutivamente homólogos para todos os seres vivos; estes genes não sofrem transferência lateral; os genes de rRNA possuem sequências extremamente conservadas, porém com fragmentos variáveis possibilitando a diferenciação de gêneros diferentes (Olsen et al., 1986; Woese, 1987; Tourova, 2003).

Dentre os três genes ribossômicos, os genes dos RNAs 16S e 23S possuem regiões altamente variáveis, permitindo o alinhamento das sequências, com variabilidade suficiente para a diferenciação de procariotos no nível de gênero e até mesmo de espécie. O gene 16S rRNA vem tendo destaque nos estudos de diversidade, evolução e ecologia dos procariotos por ter o tamanho adequado para ser estudado por sequenciamento e por possuir regiões filogeneticamente informativas em sua sequência (Pontes et al., 2007).



**Figura 3.** Representação esquemática de um operon ribossômico típico de procaríotos; ITS representam regiões espaçadoras intergênicas. As setas representam onde os primers se anexam para realização da PCR 16S-23S rRNA.

### 1.5- Metodologias dependentes e independentes de cultivo para caracterização de microbiotas associadas a diferentes ecossistemas

A descoberta, o cultivo e o isolamento de novos microrganismos vêm sendo um dos objetos de estudo dos microbiologistas desde os primórdios da bacteriologia. O cultivo de microorganismos foi de extrema importância para a consolidação da Microbiologia e as informações contidas atualmente em livros-texto vieram do estudo de organismos em cultura pura (Handelsman, 2004). Entretanto, o surgimento das técnicas moleculares e de métodos independentes de cultivo demonstrou que o cultivo não detectava a real diversidade dos microrganismos (Shapiro & Dworkin, 1997).

A metodologia dependente de cultivo consiste no isolamento e cultivo de microrganismos e sua identificação de acordo com as suas características morfológicas ou bioquímicas (Zhou et al., 2009). Nesta metodologia, as espécies que se apresentam em número reduzido competem pelo crescimento com as espécies microbianas numericamente mais abundantes (Hugenholtz et al., 1998) e algumas espécies podem ser incapazes de crescer *in vitro* (Head et al., 1998). Como alternativa a utilização dos vários testes fenotípicos, técnicas moleculares tem sido aplicadas com sucesso para análise filogenética, estudo de ecologia microbiana de ecossistemas e identificação dos diversos gêneros de BAL (Floresta, 2003).

Por muitos anos, as pesquisas da microbiota dos grãos de Kefir têm sido realizadas pelo método convencional, dependente de cultivo, com identificação fenotípica e/ou genotípica dos isolados selecionados. Recentemente, métodos moleculares independentes de cultivo

provaram ser ferramentas poderosas pois fornecem a mais completa realidade da diversidade microbiológica em amostras de alimentos (Giraffa 2004).

Alguns estudos mostraram que grãos de Kefir contêm microorganismos que não podem ser cultivados e que são viáveis somente no complexo ambiente do grão (Witthuhn, et al 2005). Por esta razão, também é necessário que o estudo da população dos grãos seja realizado por técnicas que não requerem isolamento de microorganismos (Kesmen e Kacmaz, 2011).

Dentre as abordagens moleculares, a técnica conhecida como ARDRA (análise de restrição do DNA ribossômico amplificado), que se utiliza das características dos operons ribossômicos (*rrn*), é uma das mais recomendadas na determinação de gêneros de BAL (Junior et al., 2004). De acordo com Nour (1998), os genes dos operons *rrn* estão organizados na seguinte ordem: 5' -16S - ITS1 - 23S - ITS2 - 5S - 3' (ITS - sigla em inglês para “espaçador interno transcrito”), sendo que a região ITS1 pode apresentar a inserção de um gene de tRNA-Ala (espaçador médio), dos genes tRNA-Ala e tRNA-Ile (espaçador longo) ou nenhuma inserção (espaçador curto) (Magalhães et al., 2005). A região 16S-23S do DNA (ITS1) é bastante variável entre as espécies de microorganismos, porém, bastante conservada em microorganismos da mesma espécie, sendo então utilizada em pesquisas de identificação microbiana, em nível de gênero e espécie, sendo pouco informativo para diferenciação de subespécies. Assim, a amplificação da região entre os genes 16S e 23S presentes no operon *rrn* permite a distinção entre os gêneros *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Streptococcus* (uma única ITS1 – um amplicon apenas), *Enterococcus* e *Oenococcus* (duas ITS1 diferentes – dois amplicons de tamanhos diferentes) e *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Weissella* e *Pediococcus* (três ITS1 diferentes – três amplicons de tamanhos diferentes) (Moreira et al., 2005).

Após esta separação de gêneros bacterianos pelo número de amplicons, pode-se realizar a digestão dos amplicons com um conjunto de endonucleases de restrição para identificação das espécies (ARDRA), sendo que um conjunto de 12 enzimas deve ser usado para distinguir as espécies de *Lactobacillus* (Moreira et al., 2005). Caso não haja um perfil de restrição no banco de dados, os microorganismos podem ser identificados pelo sequenciamento do gene 16S do rRNA (Viegas, 2008).

O emprego de metodologia convencional para isolamento e identificação geralmente torna a análise microbiológica de produtos probióticos relativamente demorada e os resultados podem ser influenciados pela pobre viabilidade ou pela baixa densidade de um

determinado microrganismo (Miguel et al., 2010). Ambos os métodos, dependentes e independentes de cultivo, têm algumas limitações e estão sujeitos a viés. Por esta razão, o método independente de cultivo tem sido utilizado como uma complementação para medidas de controle de qualidade de produtos probióticos e para determinar a real microbiota de comunidades (Temmerman et al., 2004).

Estudos recentes que tratam da identificação da microbiota dos grãos de Kefir e da bebida Kefir mostraram a importância de usar as ferramentas de biologia molecular para a real caracterização dos microorganismos presentes nestes tipos de produtos (Farnworth e Mainville, 2003). A associação dos métodos dependente e independente de cultivo foi utilizada para identificar e caracterizar a microbiota presente nos grãos de Kefir de diversas origens como Taiwan (Chen, et. al. 2008), Tibet (Zhaou, et. al. 2009), o estado brasileiro de Minas Gerais (Magalhães, et. al. 2010), outros estados brasileiros, o Canadá e os Estados Unidos da América (Miguel, et. al. 2010).

## 2- RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA DA REALIZAÇÃO DO PROJETO

Dada a importância dos probióticos para a manutenção da saúde humana e de outros animais, diversos grupos de pesquisa que trabalham com o tema no Brasil e no mundo estão constantemente buscando novas estirpes microbianas que possam reunir o maior número de propriedades probióticas possível. Nesse contexto, destaca-se o isolamento de *Lactobacillus* e outras bactérias do ácido lático de diversas fontes devido ao potencial probiótico apresentado por espécies deste grupo bacteriano.

Os grãos de Kefir são fonte em potencial de bactérias do ácido lático e, em especial, de *Lactobacillus* sp., uma vez que este gênero microbiano perfaz aproximadamente 80% da microbiota total destes grãos. Por outro lado, acredita-se que o substrato no qual os grãos de Kefir são cultivados pode interferir na composição da microbiota associada aos mesmos e, conseqüentemente, na capacidade funcional dos microorganismos presentes. Por este motivo, é importante o isolamento de microorganismos de interesse de grãos cultivados em substratos diferentes.

Técnicas tradicionais de isolamento e identificação de microorganismos (dependentes de cultivo) são importantes, uma vez que nos permitem obter os isolados, conservá-los e propagá-los em laboratório para uso futuro. No entanto, essas técnicas não nos permitem conhecer a totalidade da microbiota associada a um determinado ecossistema, pois existem microorganismos não cultiváveis nas condições disponíveis em laboratório, que podem ser detectados pela técnica independente de cultivo.

### 3- OBJETIVOS

O objetivo geral da pesquisa foi identificar e caracterizar as bactérias do ácido láctico de grãos de Kefir cultivados em substratos diferentes, utilizando técnicas dependentes e independentes de cultivo.

Os objetivos específicos foram (1) isolar bactérias lácticas de grãos de Kefir cultivados em água com açúcar mascavo e em leite, (2) identificar bioquímica e molecularmente os isolados obtidos de grãos de Kefir utilizando-se a técnica de ARDRA para *Lactobacillus* e o agrupamento molecular seguido de sequenciamento do gene 16S rRNA para outras bactérias lácticas, e (3) obter e analisar, por método independente de cultivo, a composição bacteriana dos grãos de Kefir cultivados em água com açúcar mascavo e em leite por sequências de fragmentos do gene 16S rRNA.

## **4- MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1- Amostras de Kefir**

Para a realização deste trabalho foram utilizadas oito amostras de grãos de Kefir, provenientes dos seguintes locais: (1) Salvador - Bahia; (2) Curitiba - Paraná (3) Viçosa – Minas Gerais; (4) Belo Horizonte – Minas Gerais, e (5) Divinópolis – Minas Gerais. De Belo Horizonte foi utilizada apenas uma amostra cultivada em água com açúcar mascavo e de Divinópolis apenas uma amostra cultivada em leite. Das outras três localidades foram analisadas uma amostra de grão de Kefir de água com açúcar mascavo e uma amostra de grão de Kefir de leite, totalizando oito amostras disponíveis para o estudo.

As amostras de grão de Kefir foram descritas como KLSA - Kefir de Leite de Salvador; KASA - Kefir de água de Salvador; KLCU- Kefir de leite de Curitiba; KACU - Kefir de água de Curitiba; KLVI - Kefir de leite de Viçosa; KAVI- Kefir de água de Viçosa; KABH - Kefir de água de Belo Horizonte e KLDI - Kefir de Leite de Divinópolis.

### **4.2- Cultivo dos grãos de Kefir**

Os grãos de Kefir foram mantidos em leite desnatado 10% estéril (250 mL) ou em água com açúcar mascavo 5% estéril (250 mL), à temperatura ambiente por 24 h. Foram feitos repasses diários nos substratos citados até que fosse atingida uma massa de grãos com peso mínimo de vinte gramas, sendo que dez gramas foram usadas para o processamento e realização do estudo e os outros dez gramas foram congelados a -80°C no meio de cultivo acrescido de 30% de solução de glicerol a 80%.

### **4.3- Isolamento e identificação de bactérias lácticas de grãos de Kefir**

O isolamento dos microorganismos dos grãos de Kefir foi realizada no Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microorganismos, localizado no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Dez gramas de grãos de Kefir provenientes dos diferentes cultivos (leite ou água com açúcar) foram suspensos em 90 mL de solução salina (NaCl 0,9%) e triturados no Triturador de Tecidos Ultra Turrax® T18 Basic por 10 minutos ou até não serem observadas partículas do grão, à velocidade de 5.000 rpm. Para

cada amostra foram feitas diluições seriadas de  $10^{-1}$  a  $10^{-7}$  em salina estéril. Algumas diluições ( $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ) foram plaqueadas em ágar MRS (De Man, Rogosa e Sharpe, Merck) modificado pela adição de soro de leite desnatado ao invés de água destilada (segundo Toba et al., 1988, ajustando-se o pH para 5,5), contendo 200 ppm de cicloheximida, para inibição de leveduras, e incubadas a  $30^{\circ}\text{C}$  em anaerobiose (câmara anaeróbia - Forma Scientific Inc., Marietta, USA - atmosfera de 85%  $\text{N}_2$ , 10%  $\text{H}_2$  e 5%  $\text{CO}_2$ ) à temperatura ambiente.

Após sete dias de incubação, as colônias isoladas foram classificadas em diferentes morfotipos. De cada morfotipo observado, foram selecionadas três colônias e estriadas em meio MRS (De Man, Rogosa and Sharpe, Merck, São Paulo) modificado com soro láctico para obtenção de cultura pura e em seguida foi realizada a identificação morfológica, através de esfregaços em lâminas por coloração de Gram e teste da catalase. Em seguida, os isolados foram congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$  (em MRS modificado com soro láctico suplementado com 30% de glicerol a 80%). Todo este procedimento foi repetido para as demais placas que permaneceram incubadas por 14 dias.

Diluições seriadas ( $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ) também foram plaqueadas em Ágar M-17 (Oxoid, São Paulo), contendo cicloheximida (100mg/L) para inibição de leveduras, e suplementado com solução de lactose (10%), e foram incubadas a  $30^{\circ}\text{C}$  em aerobiose. Após cinco dias de incubação, as colônias isoladas foram classificadas em diferentes morfotipos. Para cada morfotipo observado, foram selecionadas duas colônias que foram estriadas em meio M-17 para obtenção de uma cultura pura e em seguida foi realizada a identificação morfológica, através de esfregaços em lâminas por coloração de Gram e teste da catalase. Em seguida, os isolados foram congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$  (em M-17 suplementado com 30% de glicerol a 80%).

Utilizando o mesmo grão triturado para o isolamento de bactérias, as diluições seriadas ( $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ) foram plaqueadas em ágar YPG (1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 2% de glicose), para isolamento de leveduras, contendo cloranfenicol (100mg/L), para inibição de bactérias, e incubadas a  $30^{\circ}\text{C}$  em aerobiose. Após 2 dias de incubação, as colônias isoladas foram classificadas em diferentes morfotipos. Para cada morfotipo observado, foi selecionado apenas uma colônia que foi estriada em meio YPG para obtenção de uma cultura pura e em seguida foi realizada a identificação morfológica, através de esfregaços em lâminas por coloração de Gram. Em seguida, os isolados foram congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$  (em caldo YPG suplementado com 30% de glicerol a 80%), para

conservação. Estes isolados foram encaminhados ao Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Leveduras da UFMG para identificação molecular.

#### 4.3.1- Extração do DNA dos isolados crescidos em meio MRS modificado e M-17

O DNA foi extraído de culturas puras de 18 h crescidas em 10 mL de meio MRS modificado com soro láctico. Antes da extração do DNA genômico com o Kit Wizard Genomic da Promega, as bactérias foram submetidas a um pré-tratamento, no qual os isolados bacterianos foram centrifugados, lavados com 1 mL de água deionizada e ressuspendidos em 1 mL de LiCl 5M sob agitação por uma hora. Depois disto, foi realizada outra centrifugação, seguida do descarte do sobrenadante, lavagem com 1 mL de água deionizada e o pellet ressuspendido em tampão TES (50mM de Tris-HCl pH 8.0, 10mM de EDTA e 25mM de Sacarose) contendo lisozima (10 mg/mL) e mantido a 37°C durante uma hora. Com o objetivo de visualizar a quantidade de DNA extraído de cada isolado na etapa anterior, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose; 5 µL de cada amostra de DNA extraído foram misturados a 1µL de tampão (glicerol 30% adicionado de azul de bromofenol 1%) e então encaminhados à eletroforese em gel de agarose (1%), adicionado de 10µL de brometo de etídeo (10 µg/mL), utilizando 100V, durante 1 h. Paralelamente, no mesmo gel foi utilizado também o marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen). Ao término da corrida, os géis foram fotografados, em equipamento de fotodocumentação, sob luz ultravioleta (BioAgency Transiluminador EasyDoc 200).

#### 4.3.2- Identificação dos isolados do gênero *Lactobacillus* por ARDRA

A identificação molecular das bactérias lácticas isoladas dos grãos de Kefir foi realizada no Laboratório de Genética Molecular de Protozoários Parasitas (LGMPP), localizado no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Os isolados que apresentaram as características fenotípicas do gênero *Lactobacillus* foram submetidos a uma identificação, em nível de espécie, por Análise de Restrição do DNA Ribossômico Amplificado (ARDRA), das regiões intergênicas 16S-23S dos operons de rRNA (ITS1), conforme descrito por Moreira et al. (2005).

O espaçador interno transcrito 1 (ITS-1) foi amplificado utilizando-se um par de iniciadores que se anelam a regiões conservadas dos genes 16S e 23S do rRNA, 16-1A (5' GAATCGCTAGTAATCG 3') e 23-1B (5' GGGTTCCCCCATTCGGA 3') (Tilsala-Timisjarvi e Alatossava, 1997). O programa utilizado para amplificação foi: 1 ciclo (95°C por 2 minutos),

35 ciclos (95°C por 30 segundo, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto) e o último ciclo (72°C por 5 minutos).

Após a amplificação, de todos isolados que apresentaram 3 bandas, os amplicons foram digeridos utilizando 12 enzimas de restrição (*SphI*, *NcoI*, *NheI*, *SspI*, *SfuI*, *EcoRV*, *DraI*, *VspI*, *HincII*, *EcoRI*, *HindIII* e *AvrII*), sendo em seguida submetidos à eletroforese em gel de agarose (1,4%) e visualizados em transiluminador de UV, após coloração com brometo de etídio (Moreira et al., 2005). O perfil de digestão obtido era comparado com um perfil de digestão teórico de sequências depositadas no GenBank e/ou das geradas no laboratório a partir de espécies-tipo de *Lactobacillus* (Apêndice A).

Os isolados que não apresentaram perfil compatível com o existente no Apêndice A foram encaminhados para sequenciamento no Núcleo de Análise de Genoma e Expressão Gênica (NAGE), localizado no Departamento de Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais. Estes isolados tiveram o gene 16S rRNA sequenciado pelo método de Sanger, utilizando-se um sequenciador automático MegaBACE 1000 (GE HealthCare). Os primers usados foram o 27F (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') e 1492R (5' GGTTACCTTGTTACGACTT 3') (Reysenbach et al., 2000). Para a análise das sequências, utilizou-se o programa BLAST nucleotídeo-nucleotídeo (BLASTn) versão 2.215 do BLAST 2.0 (Basic Locus Alignment Search Tool) disponível no portal NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>), para a comparação com as sequências depositadas no GenBank.

#### 4.3.3 - Identificação Molecular dos isolados – Outras bactérias do ácido lático

Os isolados que apresentaram as características do gênero *Lactococcus* e *Leuconostoc* foram submetidos a um agrupamento molecular por digestão das regiões ITS-1 (ARDRA ITS1) e do gene 16S do rRNA (ARDRA 16S) pelas enzimas de restrição *TaqI* e *Sau3AI* e visualização dos perfis de restrição após eletroforese em gel de agarose (2,0%) em transiluminador de UV, após coloração com brometo de etídio. A partir da digestão destas regiões com estas enzimas são gerados amplicons com tamanhos diferentes e o padrão de restrição obtido permite o agrupamento molecular dos isolados.

Os isolados foram agrupados de acordo com o perfil de digestão obtido após a digestão de cada região por cada uma das enzimas de restrição. Foram selecionados três isolados de cada grupo formado, sendo estes encaminhados para sequenciamento no Núcleo de

Análise de Genoma e Expressão Gênica (NAGE), localizado no Departamento de Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais. Estes isolados tiveram o gene 16S rRNA sequenciado pelo método de Sanger, utilizando-se um sequenciador automático MegaBACE 1000 (GE HealthCare). Os primers usados foram o 27F (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') e 1492R (5' GGTTACCTTGTTACGACTT 3') (Reysenbach et al., 2000).

#### **4.4 - Técnicas independentes de cultivo para caracterização da microbiota dos grãos de Kefir**

##### 4.4.1 - Extração do DNA total

Dez gramas de cada amostra de grãos de Kefir provenientes das diferentes formas de cultivo (leite e açúcar) foram suspensos em 90 mL de solução salina (NaCl 0,9%) e triturados por dez minutos no Triturador Ultra Turrax®T18 Basic, sendo esta etapa realizada para as seguintes amostras de grãos de Kefir: KLSA, KLCU, KASA e KACU. De cada solução de triturado do grão foi retirado 1 mL para o pré- tratamento no qual foram centrifugados, lavados com 5 mL de água deionizada e ressuspensos em 5 mL de LiCl 5M sob agitação por uma hora. Depois disto, foi realizada outra centrifugação, seguida do descarte do sobrenadante, lavagem com 5 mL de água deionizada e ressuspensão do "pellet" em 5mL de solução tampão TES (50mM de Tris-HCl pH 8.0, 10mM de EDTA e 25mM de Sacarose) contendo lisozima (10 mg/mL) o qual foi mantido a 37°C durante uma hora. Após tratamento com estas soluções, foi utilizado 5mL do reagente DNAzol® (Invitrogen), para extração do DNA de cada amostra de grão de Kefir.

Com o objetivo de visualizar a quantidade de DNA total extraído de cada grão na etapa anterior, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose. Cinco µL de cada amostra de DNA extraído foram misturados a 1µL de tampão (glicerol 30% adicionado de azul de bromofenol 1%) e então encaminhados à eletroforese em gel de agarose (1%), adicionado de 10µL de brometo de etídio (10 µg/mL), utilizando 100V, durante 1 hora. Paralelamente, no mesmo gel foi utilizado também o marcador de peso molecular de 1Kb (Invitrogen). Ao término da corrida, os géis foram fotografados, através de equipamento de fotodocumentação com luz ultravioleta.

#### 4.4.2 - Amplificação por PCR do gene 16S rRNA

As amostras de DNA total de cada grão de Kefir foram submetidas à reação de PCR, visando amplificar os fragmentos dos genes de 16S rRNA. As reações foram conduzidas com os iniciadores 27F (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') e 1492R (5' GGTTACCTTGTTACGACTT 3') (Reysenbach et al., 2000). O programa utilizado para amplificação foi: 1 ciclo (95°C por 2 minutos), 35 ciclos (95°C por 30 segundos, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto) e o último ciclo (72°C por 5 minutos). Os amplicons foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,4% e visualizados em transiluminador de UV (BioAgency Transiluminador EasyDoc 200), após coloração com brometo de etídio.

#### 4.4.3 – Purificação e Adenilação dos amplicons

Os amplicons obtidos foram purificados utilizando o Gene Jet™ PCR Purification Kit, de acordo com as especificações do fabricante. O amplicon purificado foi submetido à adenilação utilizando o método descrito no TOPO TA Cloning® Kit (Invitrogen).

#### 4.4.4 - Clonagem do gene 16S rRNA

Os amplicons purificados e adenilados do gene 16S rRNA foram clonados no vetor TOPO 2.1 utilizando TOPO TA Cloning® Kit (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante, e transformados em bactéria *Escherichia coli* DH5α quimiocompetente, também segundo especificações do fabricante, sendo estas semeadas em placas contendo meio ágar LB, suplementado com ampicilina (100 µg/mL) as quais foram incubadas a 37°C por 18 horas.

Após o período de incubação, foram selecionadas 80 colônias, aleatoriamente, e transferidas para uma placa contendo meio ágar LB com ampicilina (100µg/mL), para crescimento isolado, as quais foram incubadas a 37°C por 18 horas. Após este período, as colônias foram tratadas com 30 µL de solução de lise (Triton x100: 1% (p/v); Tris HCl 9pH 8,0): 20mM e EDTA (pH 8,0): 2mM) e colocadas no termociclador utilizando o programa de 1 ciclo a 95°C por 5 minutos, para o rompimento da parede celular.

A análise das colônias transformantes foi realizada por PCR de colônia (Kim, 2005), utilizando todas as 80 colônias juntamente com os iniciadores específicos do vetor TOPO

2.1, o M13 Forward (-20) (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') e M13 Reverse (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'). O programa utilizado para amplificação foi: 1 ciclo (95°C por 3 minutos), 30 ciclos (95°C por 1 minuto, 57°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto) e o último ciclo (72°C por 10 minutos). O amplicon foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1% e as bandas visualizadas em transiluminador de UV (BioAgency Transiluminador EasyDoc 200), após coloração com brometo de etídio.

#### 4.4.5- Perfil de restrição do amplicon do gene 16S rRNA

Os amplicons do gene de 16S rRNA de cinquenta colônias, das 80 colônias selecionadas para a PCR de colônia, que apresentaram sucesso na transformação foram digeridos separadamente com as enzimas de restrição (*TaqI* e *Sau3AI*), sendo incubados a 37°C por 18 h. No total foram selecionadas 200 colônias transformantes, sendo 50 para cada amostra de grão de Kefir. Após o período de incubação, os amplicons digeridos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2,0% e os fragmentos resultantes visualizados em transiluminador de UV, após coloração com brometo de etídio. As colônias transformantes foram congeladas a -80°C (em caldo LB suplementado com ampicilina 50µL e 30% de glicerol a 80%,) para conservação. Os perfis de ARDRA obtidos foram analisados visualmente e em seguida foi realizado o agrupamento dos clones, de cada amostra de grãos de Kefir, de acordo com o perfil de digestão observado.

#### 4.4.6 - Sequenciamento do gene 16S rRNA

De cada grupo de perfil de ARDRA formado, foram selecionados, sempre que possível, três clones representantes, sendo esta etapa realizada para cada amostra de grão de Kefir. O produto obtido da PCR de colônia transformante de cada clone selecionado foi submetido à purificação com etanol 70% e EDTA 125mM. Este produto purificado foi submetido à reação utilizando os primers 27F (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') e 1492R (5' GGTTACCTTGTTACGACTT 3') (Reysenbach et al., 2000), e em seguida encaminhados para sequenciamento no Núcleo de Análise de Genoma e Expressão Gênica (NAGE), localizado no Departamento de Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais. Estes clones tiveram o gene 16S rRNA sequenciado pelo método de Sanger, utilizando-se um sequenciador automático MegaBACETM 1000 (GE HealthCare).

As seqüências obtidas foram verificadas utilizando o programa BLAST nucleotídeo-nucleotídeo (BLASTn) versão 2.215 do BLAST 2.0 (Basic Locus Alignment Serch Tool) disponível no portal NCBI ([http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/)), para a comparação com as seqüências depositadas no GenBank.

## 5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 - Isolamento e caracterização morfofisiológica de bactérias do ácido láctico de Kefir

As oito amostras de Kefir de leite e água com açúcar mascavo foram processadas e os microorganismos constituintes cultivados em três diferentes meios de cultura, MRS para bactérias lácticas especialmente *Lactobacillus*, M-17 para as demais bactérias lácticas, e YPG para leveduras. Após o cultivo à temperatura ambiente por 2, 5, 7 ou 14 dias, das placas de ágar foram selecionadas colônias morfológicamente distintas de cada amostra de grão de Kefir. Diversos autores têm trabalhado com metodologias de isolamento de bactérias e leveduras de grãos de Kefir e da bebida Kefir, sendo que a temperatura de incubação para isolamento de bactérias varia de 25 a 37°C e para isolamento de leveduras são utilizadas temperaturas entre 25 e 30°C (Simova et al., 2002; Witthuhn et al., 2004; Chen et al., 2008; Miguel et al., 2010; Magalhães et al., 2010; Miguel et al., 2011; Magalhães et al., 2011). Esses mesmos autores utilizam tempos de incubação para bactérias entre dois e sete dias e para leveduras, dois a cinco dias. Portanto, os tempos e temperaturas utilizados nesse trabalho estão adequados ao isolamento dos microorganismos comumente encontrados nos grãos de Kefir .

De acordo com o estabelecido para a seleção dos morfotipos, o número total de colônias obtidas a partir do cultivo em MRS modificado com soro láctico foi 133, em ágar M-17 foi 62 e em ágar YPG foi 29, conforme mostrado na tabela 1. Todos os morfotipos selecionados foram submetidos à coloração de Gram e teste de catalase. De 133 colônias crescidas em meio MRS, modificado com soro láctico, 117 microorganismos eram Gram positivo e catalase negativo, a maioria em forma de bacilo ao microscópio óptico (Tabela 1) e 16 microorganismos se apresentaram como Gram positivo e catalase positivo, em forma ovalada, sugestivo de levedura. Das 62 colônias crescidas em meio M-17, 32 se apresentaram como Gram-positivo e catalase negativo, 24 em forma de cocos e 8 em forma de bacilos ao microscópio óptico; as outras 30 eram Gram-positivo e catalase positivo, 11 com forma ovalada e 19 em formato de cocos. Os morfotipos sugestivos de levedura foram encaminhados para identificação e os isolados em forma de cocos não foram identificados.

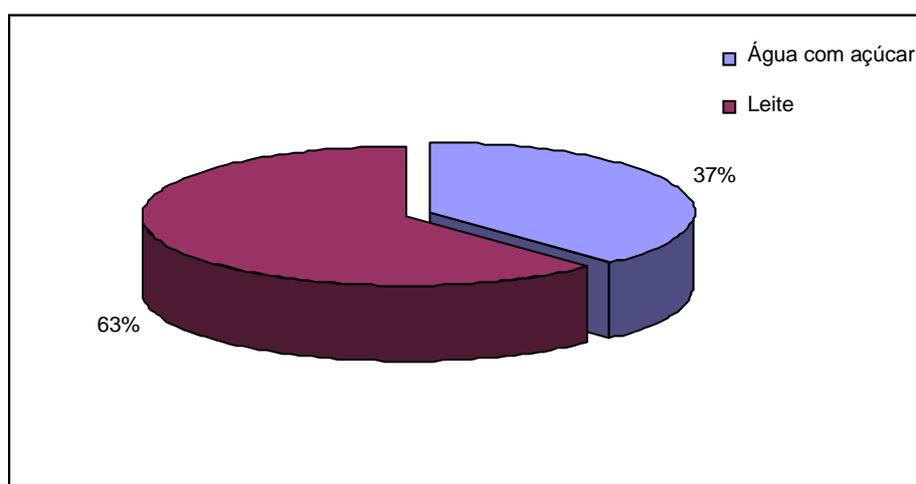
A recuperação de bactérias do ácido láctico foi maior a partir dos grãos de Kefir cultivados em leite quando comparada àquela obtida a partir dos grãos cultivados em água com açúcar mascavo (Figura 4). Esse resultado pode ser explicado pelo fato de que originalmente esses grãos eram cultivados em leite e somente pouco tempo foram

adaptados a outros substratos, o que pode ter comprometido o crescimento e/ou a permanência de certas espécies menos adaptáveis a outras matrizes alimentares.

**Tabela 1.** Número total de colônias selecionadas de cada amostra de grão de Kefir, a partir do cultivo em meio MRS modificado com soro láctico, M-17 e YPG.

Amostra de Kefir/substrato	MRS modificado com soro láctico (*)	M-17(*)	YPG
<b>Leite</b>			
KLSA	18 (89%)	06	05
KLCU	26 (73%)	13	04
KLVI	14 (100%)	02	03
KLDI	25 (100%)	08	03
<b>Água com açúcar</b>			
KASA	21 (91%)	07	02
KACU	11 (91%)	09	02
KAVI	11 (64%)	08	06
KABH	07 (100%)	09	04
<b>Total</b>	<b>133 (88%)</b>	<b>62(51%)</b>	<b>29</b>

\* Percentagem de isolados Gram-positivo e catalase negativo, sugestivo de BAL.



**Figura 4.** Percentagem relativa de bactérias lácticas (BAL) isoladas de grãos de Kefir cultivados em leite e água com açúcar mascavo

## 5.2 - Identificação molecular dos isolados

Há um consenso na comunidade científica de que métodos fenotípicos não são suficientes para permitir uma classificação acurada em nível de espécie das bactérias do ácido láctico (Tannock , et al., 1999; Saarela, 2000; Oliveira et al., 2002).

Portanto, os 117 isolados de bactérias lácticas em potencial, obtidos do cultivo em meio MRS, modificado com soro láctico, e pré-selecionados na caracterização morfofisiológica, foram submetidos à identificação molecular por PCR dos espaçadores 16S-23S do rRNA (ITS1) (Apêndice B). A distinção entre os diferentes gêneros de bactérias lácticas é possível devido às duplicações e inserções de sequências de tRNA presentes no espaçador interno transcrito 1 (ITS 1) da região intergênica 16S-23S (Nour, 1998; Magalhães et al., 2005).

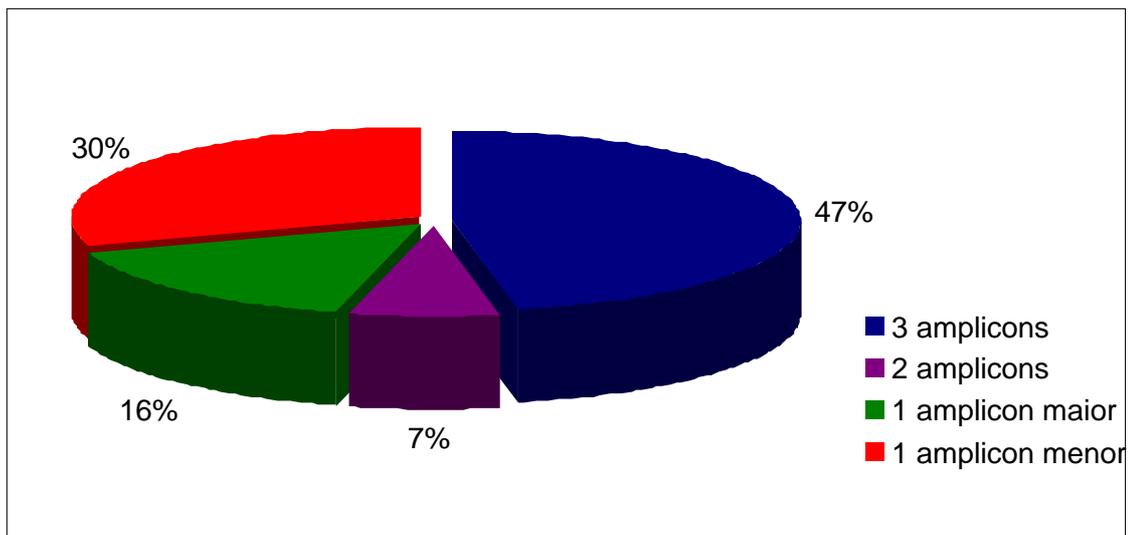
Esta abordagem metodológica permite separar as bactérias lácticas em três grupos: os gêneros *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Streptococcus* apresentam operons de rRNA com ITS1 de mesmo tamanho, dando apenas um amplicon na PCR; *Lactobacillus*, *Weissella*, *Pediococcus* e *Carnobacterium* possuem operons de rRNA com três tamanhos diferentes, obtendo-se um padrão de três amplicons na PCR; e *Enterococcus* e *Oenococcus* possui operons de rRNA com dois tamanhos diferentes, dando duas bandas de amplificação na PCR.

Assim, como mostrado na tabela 2 e figura 5, 55 isolados do total de 117 apresentaram três bandas de amplificação (~500-750 pb); 8 isolados apresentaram 2 bandas (~600-700 pb); 17 isolados apresentaram uma única banda maior (~700 pb); 36 isolados apresentaram uma única banda menor (~600 pb) e 1 isolado não apresentou bandas, provavelmente devido a um baixo rendimento na extração do DNA.

As amostras possivelmente pertencentes ao gênero *Lactobacillus* (Figura 5, três amplicons) tiveram seus amplicons tratados com doze enzimas de restrição e o perfil obtido foi comparado com um perfil de digestão teórico de sequências depositadas no GenBank e/ou das geradas no laboratório a partir de espécies-tipo de *Lactobacillus* (Apêndice A), a fim de identificá-los em nível de espécie (Moreira et al., 2005). A digestão enzimática mostrou três espécies de lactobacilos (identificadas - *L. crispatus*, *L. casei* e possibilidade de ser- *L. kefir* /*L. hilgardii* /*L. ferintoshensis*) e cinco grupos que não apresentaram perfis de restrição compatíveis com nenhum perfil do banco de dados disponível em nosso laboratório, e que foram denominados P1, P2, P3, P4 e P5.

**Tabela 2.** Número total de isolados selecionados de cada amostra de grão de Kefir, a partir do cultivo em meio MRS modificado com soro láctico, separados pelo número de amplicons de ITS-1 (região intergênica 16S e 23S do rRNA).

Amostra de Kefir/substrato	Três amplicons	Dois amplicons	Um amplicon maior	Um amplicon menor
<b>Leite</b>				
KLSA	5	0	0	11
KLCU	13	1	0	5
KLVI	0	1	13	0
KLDI	2	4	4	15
<b>Água com açúcar</b>				
KASA	15	1	0	2
KACU	6	1	0	3
KAVI	7	0	0	0
KABH	7	0	0	0
<b>Total</b>	<b>55</b>	<b>8</b>	<b>17</b>	<b>36</b>



**Figura 5.** Percentagem de isolados sugestivos de bactérias lácticas (BAL) com os respectivos números de amplicons de 16S-23S do rRNA (ITS-1).

Os isolados com os perfis de restrição não identificados por PCR-ARDRA (P1 a P5) e os isolados que apresentaram perfil de *Lactobacillus kefir* idêntico ao perfil de *L. hilgardii* e *L. ferintoshensis*, foram encaminhados para sequenciamento do gene 16S do rRNA, no Núcleo de Análise de Genoma e Expressão Gênica (NAGE/UFMG).

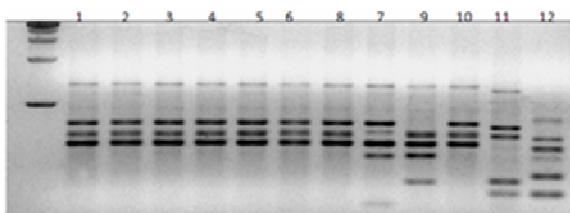
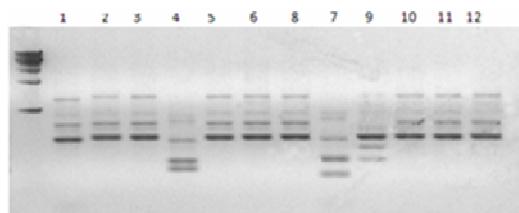
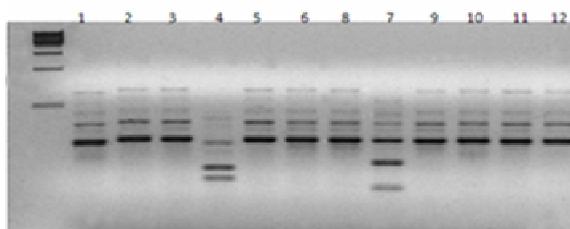
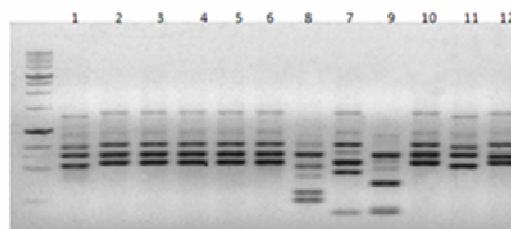
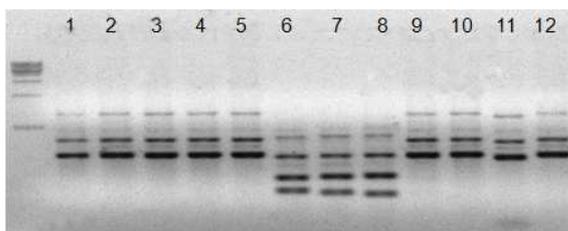
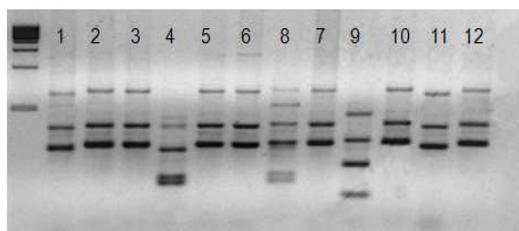
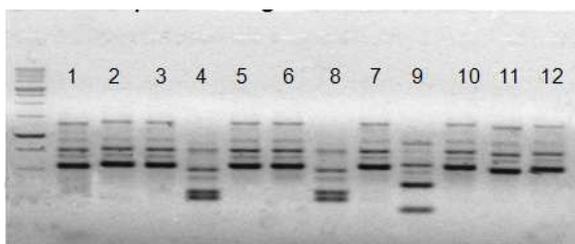
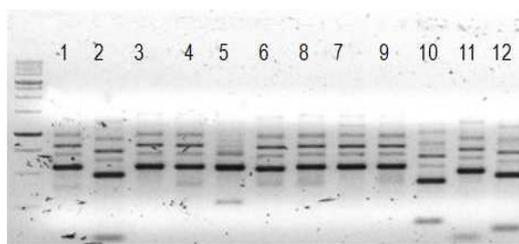
As sequências do gene 16S rRNA obtidas pelo sequenciamento de DNA foram comparadas com sequências depositadas no banco de dados GenBank utilizando o algoritmo BLASTn (Apêndice C). A análise dos isolados com perfil de *Lactobacillus kefir* idêntico ao perfil de *L. hilgardii* e *L. ferintoshensis* demonstrou que os isolados 24P3I, 4P3II, 3P2, 4P3I, 3U2, 4P2I, 7P2 e 3P3 são pertencentes à espécie *Lactobacillus kefir*, e os isolados 12P e 16P são pertencentes à espécie *Lactobacillus parafarraginis*. Após esta análise, observou-se que *Lactobacillus parafarraginis* tem o mesmo perfil de ARDRA da região ITS-1 que as espécies *Lactobacillus kefir*, *L. hilgardii* e *L. ferintoshensis*.

Os isolados do perfil de restrição P1, por apresentarem um padrão de digestão sugestivo de mistura de espécies bacterianas, foram submetidos novamente aos testes morfo-fisiológicos iniciais e constatou-se que eram Gram-positivo, porém catalase positivo, e em forma de cocabacilos. Pelo sequenciamento de DNA foram identificados como *Staphylococcus epidermidis*. Desta forma, estes foram excluídos.

A análise também demonstrou que os isolados descritos como P2 são pertencentes à espécie *Lactobacillus perolens*, os descritos como P3 são *Lactobacillus satsumensis*, os descritos como P4 são *Lactobacillus mali* e o descrito como P5 é *Lactobacillus diolivorans*. A figura 6 ilustra os perfis de restrição dos isolados. A relação dos isolados pertencentes ao gênero *Lactobacillus* e sua respectiva identificação encontra-se na tabela 3.

O substrato de cultivo dos grãos parece influenciar na diversidade das espécies de lactobacilos presentes. Três espécies de *Lactobacillus* (*L. parafarraginis*, *L. perolens* e *L. diolivorans*) foram encontradas somente em grãos cultivados em água. Em contraste, duas espécies (*L. kefir* e *L. crispatus*) foram encontradas somente em grãos cultivados em leite.

As espécies *L. satsumensis*, *L. casei* e *L. mali* foram isoladas de grãos de Kefir cultivados em ambos substratos, água e leite. Das espécies de *Lactobacillus* isolados pelo método dependente de cultivo, três ainda não haviam sido descritas na literatura como sendo isolados de grãos de Kefir sendo eles: *L. parafarraginis*, *L. perolens* e *L. crispatus*.

P2 – *L. perolens*P3 – *L. satsumensis*P4 – *L. mali*P5 – *L. diolivorans**L. casei**L. kefir**L. parafarraginis**L. crispatus*

**Figura 6.** Géis de agarose a 1,4% dos perfis de restrição da região intergênica do 16S e 23S rRNA (ITS-1) dos isolados bacterianos de grãos de Kefir presuntivos do gênero *Lactobacillus* (três amplicons). As enzimas de restrição 1 a 12 correspondem a *SphI*, *NcoI*, *NheI*, *SspI*, *SfuI*, *EcoRV*, *DraI*, *VspI*, *HincII*, *EcoRI*, *HindIII* e *AvrII*. Na esquerda de cada gel esta o marcador de peso molecular.

*L. diolivorans* foi uma espécie de crescimento mais fastidioso cuja colônia foi isolada após 14 dias de incubação. O trabalho de Kesmen e Kacmaz (2011) é o único que descreve o isolamento desta espécie a partir de grãos de Kefir de leite na Turquia. Diferentemente, neste trabalho isolamos a espécie de grãos de Kefir cultivados em água com açúcar. Como descrito por Endo e Okada (2007), o *Lactobacillus parafarraginis* é uma bactéria láctica anaeróbia facultativa, heterofermentativa, que foi isolada de uma bebida destilada de origem japonesa denominada “shochu”. Back (1999) descreve o *Lactobacillus perolens* como uma bactéria láctica, heterofermentativa, que foi isolada de refrigerantes deteriorados e em cervejarias. O nome deste microrganismo se deve ao sabor causado pelas grandes quantidades de diacetil produzidas, tornando esta bebida imprópria para a ingestão. Este microrganismo possui a característica interessante de ser ácido-tolerante, o que torna possível seu crescimento em refrigerantes.

**Tabela 3:** Identificação dos isolados de grão de Kefir, a partir do cultivo em meio MRS modificado com soro láctico, por ARDRA do ITS-1 ou sequenciamento do 16S rRNA.

<b>Amostra de Kefir</b>	<b>Isolado</b>	<b>Identificação</b>
<b>Leite</b> KLSA	22P2	<i>L. casei</i>
	23P	<i>L. mali</i>
	23P3	<i>L. satsumensis</i>
	24P3I	<i>L. kefir</i>
	25P	<i>L. casei</i>
KLCU*	1P	<i>L. crispatus</i>
	1P3	<i>L. crispatus</i>
	2P2	<i>L. crispatus</i>
	2P3	<i>L. satsumensis</i>
	3P2	<i>L. kefir</i>
	3P3	<i>L. kefir</i>
	4P2I	<i>L. kefir</i>
	4P3I	<i>L. kefir</i>
	4P3II	<i>L. kefir</i>
	6P	<i>L. crispatus</i>
	7P2	<i>L. kefir</i>
KLDI	3U2	<i>L. kefir</i> <i>L. crispatus</i>
	8U	

Amostra de Kefir	Isolado	Identificação
Água com açúcar KASA	8P	<i>L. casei</i>
	8P2	<i>L. casei</i>
	8P3	<i>L. casei</i>
	9P2	<i>L. casei</i>
	10P	<i>L. satsumensis</i>
	10P2	<i>L. satsumensis</i>
	11P	<i>L. perolens</i>
	11P2	<i>L. perolens</i>
	11P3	<i>L. perolens</i>
	12P	<i>L. parafarraginis</i>
	13P	<i>L. perolens</i>
	13P2	<i>L. casei</i>
	13P3	<i>L. casei</i>
	14P	<i>L. casei</i>
14P2	<i>L. perolens</i>	
KACU	16P	<i>L. parafarraginis</i>
	16P3	<i>L. perolens</i>
	17P	<i>L. casei</i>
	17P2	<i>L. perolens</i>
	18P	<i>L. satsumensis</i>
	19P	<i>L. perolens</i>
KAVI	19U	<i>L. mali</i>
	20U	<i>L. casei</i>
	20U1	<i>L. casei</i>
	20U2	<i>L. casei</i>
	21U1	<i>L. mali</i>
	21U2	<i>L. mali</i>
	22U	<i>L. mali</i>
KABH	1Z	<i>L. diolivorans</i>
	15U	<i>L. casei</i>
	15U1	<i>L. casei</i>
	15U2	<i>L. casei</i>
	16U	<i>L. casei</i>
	17U	<i>L. casei</i>
	18U	<i>L. casei</i>

\*Isolados 1P2 e 4P da amostra KLCU foram excluídos por serem *Staphylococcus epidermidis*

Em trabalhos prévios, as espécies *L. kefir*, *L. satsumensis*, *L. mali* e *L. casei* já foram isoladas de grãos de Kefir cultivados em água com açúcar, como descrito por Magalhães et al. (2011). A espécie *L. satsumensis* foi isolada de grãos de Kefir de Goiás, Bahia e Distrito Federal; já *L. kefir* foi isolada de grãos de Kefir de Minas Gerais, Rio de Janeiro, Distrito Federal, Alagoas e São Paulo; e *L. casei* foi isolada de grãos de Kefir do Rio de Janeiro, Distrito Federal, Alagoas, São Paulo e Bahia. Segundo Hsieh et al. (2012), a espécie *L. mali* foi isolada de grãos de Kefir cultivados em água com açúcar originados de Taiwan, China,. Este era o único trabalho com grãos de Kefir que descrevia o isolamento deste microrganismo pelo método dependente de cultivo.

As espécies *L. kefir*, *L. satsumensis* e *L. casei* também já foram isoladas de grãos de Kefir cultivados em leite, como no trabalho de Miguel et al. (2010), onde *L. kefir* foi isolada de grãos de Kefir de Alagoas, Minas Gerais, Espírito Santo, Santa Catarina e São Paulo. *L. kefir* também já foi isolada de grãos de Kefir de leite em Taiwan (Chen et al., 2008). *L. satsumensis* foi isolada de grãos de Kefir dos Estados Unidos da América, sendo este o primeiro trabalho a descrever o isolamento da espécie em Kefir. *L. casei* foi isolada de grãos de Kefir de leite do noroeste da Espanha (Angulo et. al., 1993) e de Minas Gerais (Magalhães et. al., 2011).

As amostras pertencentes a outros gêneros de bactérias do ácido láctico foram submetidos a um agrupamento molecular por digestão das regiões ITS-1 e 16S do rRNA pelas enzimas de restrição *TaqI* e *Sau3AI*. Conforme mostrado na tabela 4, um total de 18 grupos foi formado de acordo com o perfil de digestão composto pelas duas enzimas. De cada grupo foram selecionados, no mínimo, três isolados de amostras de grãos de Kefir diferentes, que foram encaminhados para sequenciamento do gene 16S do rRNA no NAGE.

As sequências de DNA obtidas foram comparadas com sequências depositadas no banco de dados do GenBank utilizando o algoritmo BLASTn (Apêndice D). A análise demonstrou que os isolados com perfil de restrição dos grupos 1 a 7 são pertencentes à espécie *Lactococcus lactis*, os isolados com perfil de restrição dos grupos 8 a 11 são pertencentes à espécie *Leuconostoc mesenteroides* e o isolado com perfil de restrição do grupo 12 é pertencente à espécie *Oenococcus oeni*. Os isolados dos grupos 13 a 18 não obtiveram sequências satisfatórias, mesmo após repetição, provavelmente por estarem misturados. O número de isolados identificados pelo sequenciamento encontra-se na tabela 5 e a relação dos isolados pertencentes aos grupos e sua respectiva identificação encontra-se no Apêndice E.

**Tabela 4.** Agrupamento molecular dos isolados bacterianos sugestivos de BAL com um e dois amplicons do ITS-1 do rRNA, obtidos do meio MRS modificado com soro láctico.

<b>Perfil de Digestão (bandas - pb): Região/ Enzima</b>					
<b>Grupo</b>	<b>16S/TaqI</b>	<b>16S/Sau3AI</b>	<b>ITS/TaqI</b>	<b>ITS/Sau3AI</b>	<b>No. De isolados</b>
1	~200, ~380, ~720	~150,~250,~900	~270,~350,~600	~300, ~200	28*
5	~200, ~380, ~720	~150,~250,~900	~270,~350,~600	~300,~250, ~200	1
4	~200, ~380, ~720	~150,~250,~900	~270,~350,~600	~250, ~200	1
6	~200,~350, ~550,~750,~800	~150,~250,~900	~270,~350,~600	~250, ~200	1
7	~200,~350, ~550,~750,~800	~150,~250,~900	~270,~350,~600	~300,~250, ~200	1
2	~200, ~380, ~720	~200,~320,~550,~800	~270,~350,~600	~300, ~200	3
3	~200, ~380, ~720	~200,~320,~550,~800	~270,~350,~600	~250, ~200	3
12	~200, ~380, ~720	~150,~250,~900	~300,~400,~650	~300,~250, ~200	1
9	~200, ~380, ~720	~150,~250,~900	~300,~400,~650	<100, ~100,~150, ~250	1
10	~200, ~380, ~720	~150,~250,~900	~300,~400,~650	~300, ~200	3
8	~200, ~380, ~720	~200,~320,~550,~800	~300,~400,~650	~300, ~200	11*
13	~200,~350, ~550,~750,~800	~150, ~300,~580,~620	~300,~400,~650	~300,~250, ~200	1
11	~200,~350, ~550,~750,~800	~150,~250,~900	~270, ~300, ~350,~400, ~600, ~650	~300,~250, ~200	1
14	~200,~350, ~550,~750,~800	~150,~250,~900	~270, ~300,~350, ~400,~600,~650	~250, ~200	1
18	~200, ~380, ~720	Não digeriu	~300,~350,~550,~ 650	~300,~250, ~200	1
15	~200,~350, ~550,~750,~800	Não digeriu	~550	~300,~250, ~200	1
16	~200,~350, ~550,~750,~800	~150,~250,~900	~500,~600,~650	~300,~250, ~200	1
17	~200, ~380, ~720	Não digeriu	~300, ~350,~400, ~600,~650	~300,~250, ~200	1

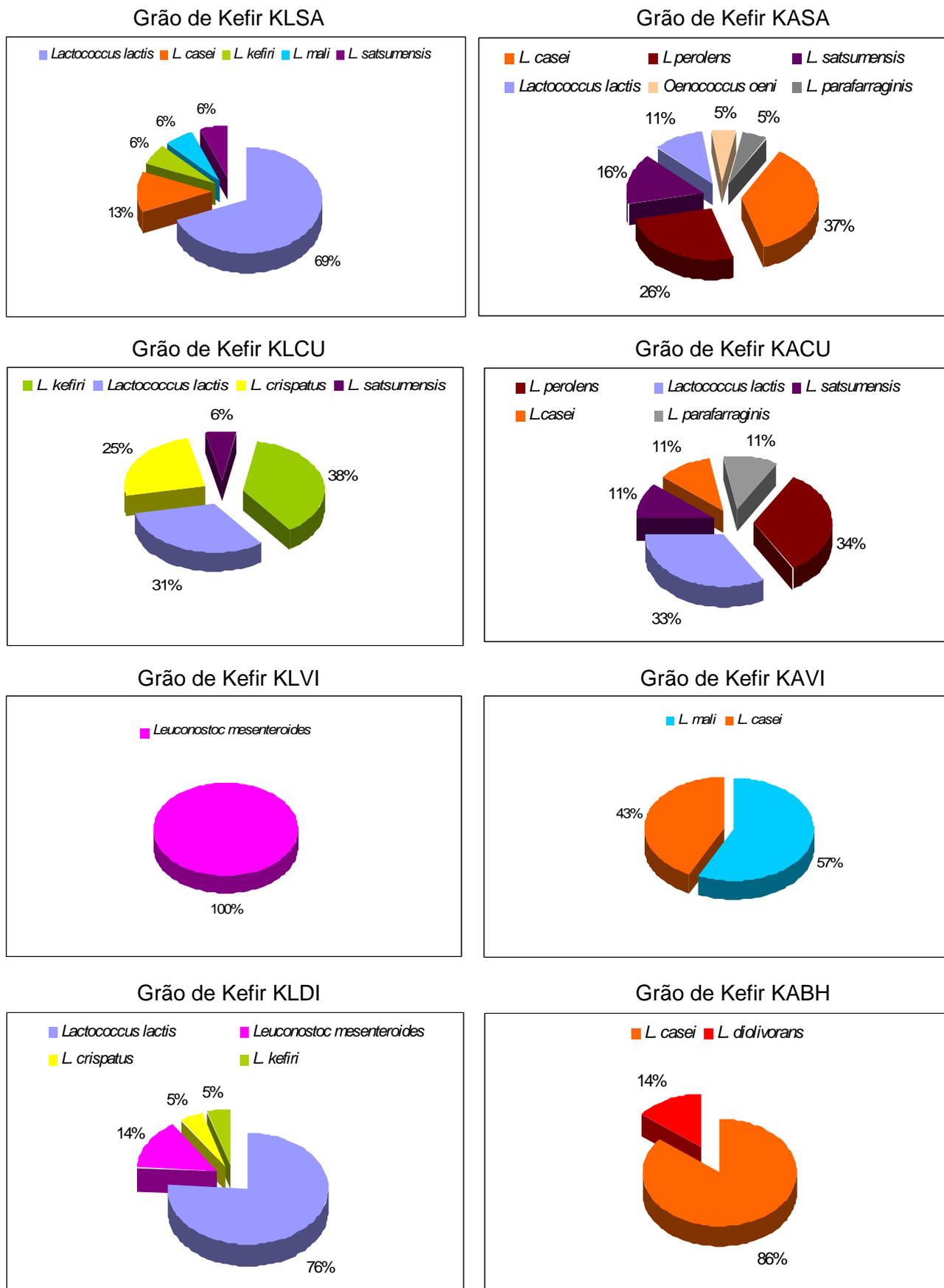
\* Três isolados selecionados para o sequenciamento do gene 16S do rRNA.

**Tabela 5.** Sequenciamento do gene 16S do rRNA dos isolados bacterianos sugestivos de BAL com um e dois amplicons de ITS-1, obtidos do meio MRS modificado com soro láctico.

<b>Grão de Kefir</b>	<b>Espécie</b>	<b>Nº. de isolados</b>
<b>Leite</b>		
KLSA	<i>Lactococcus lactis</i>	11
KLCU	<i>Lactococcus lactis</i>	5
KLVI	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	13
KLDI	<i>Lactococcus lactis</i>	17
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	3
<b>Água com açúcar</b>		
KASA	<i>Lactococcus lactis</i>	2
	<i>Oenococcus oeni</i>	1
KACU	<i>Lactococcus lactis</i>	3

A diversidade de espécies de bactérias lácticas isoladas de cada amostra de grão de Kefir está mostrada na figura 7 e a diversidade total de espécies de BAL obtidas do cultivo nos dois diferentes substratos é mostrada na figura 8.

Das espécies de bactérias lácticas isoladas por método dependente de cultivo, *Oenococcus oeni* ainda não havia sido descrito na literatura como sendo isolado de grãos de Kefir. O isolado aqui identificado foi de crescimento fastidioso, pois necessitou de 14 dias de incubação para a colônia ser discriminada no ágar MRS.



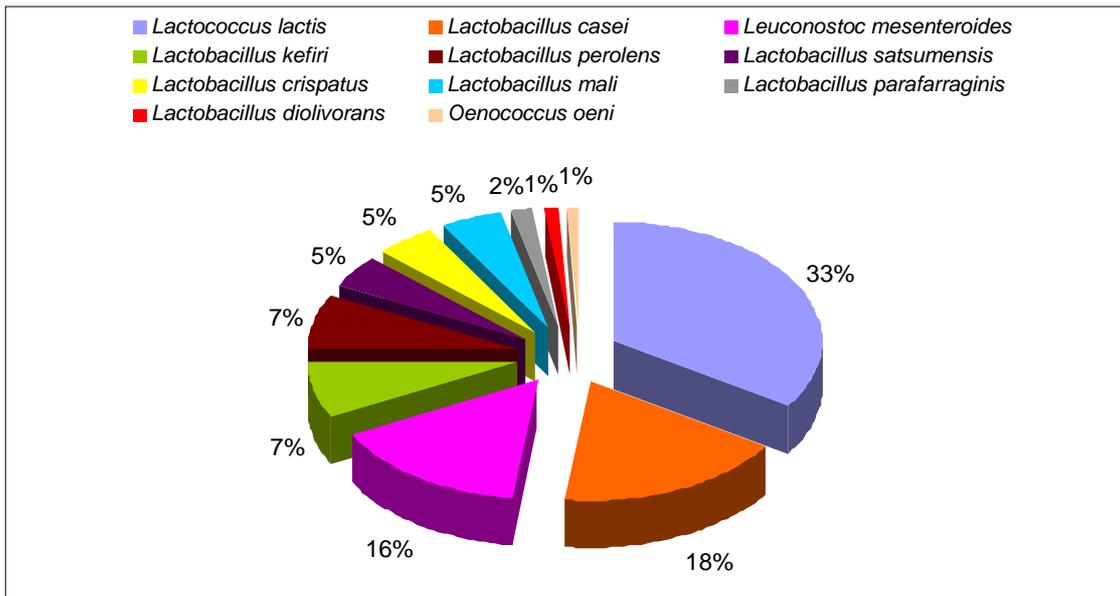
**Figura 7.** Percentagem de isolados de BAL de amostras de grão de Kefir cultivados em leite (gráficos à esquerda) ou água com açúcar mascavo (gráficos à direita).

Vários autores isolaram *Lactococcus lactis* e *Leuconostoc mesenteroides* de grãos de Kefir de leite do Tibet, China (Yu et al., 2009), África do Sul (Witthuhn et al., 2004; Witthuhn et al., 2005); Taiwan (Chen et al., 2008; Hsieh et al., 2012) e Argentina (Garrote et al., 2001). A espécie *Lactococcus lactis*, segundo Simova et al. (2002) foi isolada de grão de Kefir de leite da Bulgária e a espécie *Leuconostoc mesenteroides*, segundo Lin et al. (1999) foi isolada de grão de Kefir de leite de Taiwan.

O agrupamento molecular utilizando a técnica de ARDRA pode identificar espécies de BAL, entretanto os isolados de um mesmo grupo apresentaram diferentes linhagens de uma mesma espécie, ou seja, o perfil de digestão de isolados de uma mesma espécie foi igual, mesmo sendo de linhagens diferentes.

A espécie mais frequente de bactérias lácticas obtidas do meio MRS modificado com soro láctico, das diferentes amostras de grãos de Kefir, foi *Lactococcus lactis* com 33% de abundância, seguida por *Lactobacillus casei* com 18% e *Leuconostoc mesenteroides* com 16% (Figura 8). Em relação às amostras de grãos de Kefir, observou-se uma maior porcentagem de BAL isoladas de grãos cultivados em leite em relação aos cultivados em água.

Neste trabalho, os *Lactobacillus* estão presentes em sete amostras de grãos de Kefir, não sendo isolados apenas na amostra de Kefir de leite de Viçosa (KLVI), indicando a importância deste grupo bacteriano para a produção da bebida Kefir. Estudos anteriores mostraram o isolamento e identificação de *Lactobacillus* e outras bactérias do láticas em grãos de Kefir. Chen et al. (2008) descreveram que o *L. kefir* foi a espécie com maior frequência identificada em grãos de Kefir de leite de Taiwan, seguido pela espécie *L. kefiranofaciens*, e com menor frequência foram identificados *Leuconostoc mesenteroides* e *Lactococcus lactis*.



**Figura 8.** Percentagem total de espécies de BAL obtidas das amostras de grãos de Kefir cultivados em leite ou água com açúcar mascavo.

Hsieh et al. (2012) identificaram três espécies de BAL, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus mali* e *Lactobacillus hordei*, em grãos de Kefir cultivados em água com açúcar, e as espécies *Leuconostoc mesenteroides* e *Lactococcus lactis* em grãos de Kefir de leite. Já no trabalho de Magalhães et al. (2011), sete espécies de *Lactobacillus* foram identificadas em grãos de Kefir de água com açúcar de diferentes estados do Brasil, sendo *L. casei*, *L. sunkii*, *L. helveticus*, *L. buchneri*, *L. paracasei*, *L. satsumensis* e *L. kefiri*. As espécies *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* e *L. kefiri* foram identificadas com maior frequência em grãos de Kefir de leite da Turquia, segundo Kesmen e Kacmaz. (2011).

Analisando os dados da literatura em relação às espécies identificadas em grãos de Kefir correlacionada com o substrato utilizado no cultivo, foi possível observar que em amostras de grãos de Kefir crescidas em leite, as espécies mais encontradas foram *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *L. kefiri* e *L. kefiranofaciens*, enquanto em amostras de grãos de Kefir crescidas em água com açúcar, as espécies mais encontradas foram *Leuconostoc mesenteroides*, *L. mali*, *L. hordei*, *L. casei*, *L. sunkii*, *L. helveticus*, *L. buchneri*, *L. paracasei*, *L. satsumensis* e *L. kefiri*.

Nas quatro amostras de grãos de Kefir de leite e em três amostras de grãos de Kefir de água com açúcar (KASA, KABH e KAVI) deste estudo, a espécie predominante em cada

uma está dentre as já descritas na literatura e somente na amostra KACU foi observada a predominância da espécie *L. perolens*, ainda não descrita como sendo isolada de grão de Kefir.

Cada espécie isolada de grão de Kefir é importante para a construção de uma cultura iniciadora para a produção industrial de Kefir. Algumas características de espécies isoladas de grãos de Kefir têm sido descritas na literatura. Toba et al. (1991) concluíram que a viscosidade da bebida fermentada é diretamente proporcional a quantidade de polissacarídeo kefirano produzido pelos microrganismos produtores deste polissacarídeo.

A espécie *Lactococcus lactis* é capaz de degradar a lactose em ácido láctico e participa da degradação do ácido cítrico com produtos finais do metabolismo sendo o ácido acético, diacetil e dióxido de carbono, que contribuem para o sabor final desenvolvido em produtos fermentados (Samarzija et al., 2001, Beshkova et al., 2003). A espécie *Leuconostoc mesenteroides* degrada a lactose em ácido láctico, ácido acético, etanol e dióxido de carbono e o ácido cítrico a diacetil, por isso sendo utilizada por indústrias de laticínios para melhorar o aroma e sabor do leite fermentado (Zhou et al., 2009; Hsieh, et al. 2012). O sabor do Kefir é devido à produção de metabólitos secundários, principalmente acetaldeído e diacetil, produzidos pelas bactérias lácticas (Farnworth e Mainville, 2003; Beshkova et al., 2003). Pouco se sabe sobre a importância do *Lactobacillus diolivorans* para a manutenção dos grãos de Kefir e produção da bebida Kefir. Esta é uma espécie heterofermentativa, com crescimento em pH 4,7 e em presença de 1,2-propanodiol, produzindo propanol e ácido propiônico (Krooneman. et al., 2002). Sabe-se que a produção de propanol influencia no aroma do Kefir (Farnworth & Mainville, 2003)

Estudos utilizando as bactérias isoladas de grãos de Kefir devem ser realizados para avaliar a importância de cada espécie na elaboração de uma cultura iniciadora para produção industrial de Kefir. Na literatura ainda não foram descritos estudos para as espécies *L. satsumensis*, *L. perolens*, *L. diolivorans*, *Oenococcus oeni*, *L. crispatus*, *L. mali*, *L. parafarraginis*, *L. casei* e *L. kefiri*.

O potencial probiótico das espécies por nós isoladas pode ser inferido comparando às características e funções descritas na literatura para algumas destas espécies. O *L. kefiri* foi descrito na literatura como carreador de proteínas de superfície (proteína S) que podem desempenhar um papel na adesão a células intestinais (Garrote et al., 2004). Castagliuolo et al. (2005) evidenciou o efeito protetor de *L. crispatus* durante a inflamação intestinal, por

indução de colite em camundongos, pela atividade de co-agregação desta espécie. Kekkonen et al. (2008) demonstraram, em estudo *in vitro*, que *Leuconostoc mesenteroides* é indutora das citocinas da resposta imune tipo Th1. Bravo et al. (2009) demonstraram a habilidade de *Lactococcus lactis* de inibir patógenos pela produção de bacteriocinas. Folligné et al. (2010) evidenciou o potencial anti-inflamatório de *Oenococcus oeni*, por indução de colite em camundongos. *L. casei* tem potencial probiótico como mostrado por Sabir et al. (2010) em testes *in vitro* como a produção de peróxido de hidrogênio, produção de ácido láctico, resistência a sais biliares e suco gástrico, quantificação de exopolissacarídeo e resistência a antibióticos. Sobre *L. mali* sabe-se que são produtores de EPS, mas são necessários estudos futuros para avaliação dos efeitos probióticos desta espécie (Hsieh et al., 2012).

### 5.3 - Identificação molecular da microbiota dos grãos de Kefir pelo método independente de cultivo

Técnicas moleculares têm sido aplicadas com sucesso para análise filogenética, estudo de ecologia microbiana de ecossistemas e identificação de microrganismos dos diversos gêneros de BAL (Floresta, 2003). Os grãos de Kefir contêm, além de BAL cultiváveis, microrganismos que não podem ser cultivados e que são viáveis somente no complexo ambiente do grão (Witthuhn et al., 2005). Por estas razões, é importante que o estudo da composição dos mesmos seja realizado por técnicas que avaliam a microbiota total em associação com as técnicas de isolamento microbiano (Kesmen e Kacmaz, 2011).

Quatro amostras de grãos de Kefir foram submetidas ao método independente de cultivo (KLSA, KASA, KLCU, KACU). Cinquenta clones transformantes de cada amostra foram agrupados de acordo com o perfil de restrição do gene de 16S rRNA com as enzimas *TaqI* e *Sau3AI*. Foram obtidos 51 perfis de ARDRA das quatro amostras de grãos de Kefir, sendo 24 perfis do KASA, 6 perfis do KLSA, 16 perfis do KACU e 5 perfis do KLCU. Um perfil de restrição foi o idêntico entre as amostra KLSA e KLCU (cultivo em leite) e dois perfis de restrição foram idênticos entre as amostras KASA e KACU (cultivo em água). Observou-se um número maior de perfis de ARDRA nas amostras cultivadas em água com açúcar que em leite.

De acordo com os grupos de perfis foram selecionados os clones para o sequenciamento do gene 16S rRNA, sendo 38 clones para a amostra KASA, 28 clones para KACU, 10 clones para KLSA e 10 clones para KLCU. O resultado da análise do sequenciamento do gene 16S rRNA dos clones selecionados de cada amostra dos diferentes padrões de ARDRA está descrito na tabela 6. Após análise das sequências de DNA dos clones, por alinhamento com as sequências do 16S rRNA contidas no Genbank, foi possível estabelecer a diversidade de microrganismos presentes nas amostras de grão de Kefir a partir da utilização do método independente de cultivo (Figura 9).

Estudos de caracterização da microbiota utilizando o método independente de cultivo relatam a diversidade de microrganismos presentes nos grãos de Kefir. O trabalho de Zhou et al. (2009) demonstrou a presença de *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus kefiri* e *Lactobacillus casei* em grãos de Kefir de leite do Tibet. O trabalho de Magalhães et al. (2010) demonstrou a presença de *L. kefiri*, *L. paracasei*, *L. parabuchneri*, *L. casei* e *Leuconostoc citreum* em grãos de Kefir de água com açúcar de Minas Gerais. O trabalho

de Miguel et al. (2010), utilizando grãos de Kefir de leite dos Estados Unidos, do Canadá e de estados do Brasil, demonstrou a presença de Uncultured bacterium FJ 838427.1, Uncultured bacterium AM 921620.1, Uncultured bacterium EF 014703.1, *Lactobacillus satsumensis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus uvarum* e *Lactobacillus paracasei*.

**Tabela 6.** Descrição das espécies obtidas após análise do sequenciamento do gene 16S do rRNA dos clones das amostras de grãos de Kefir

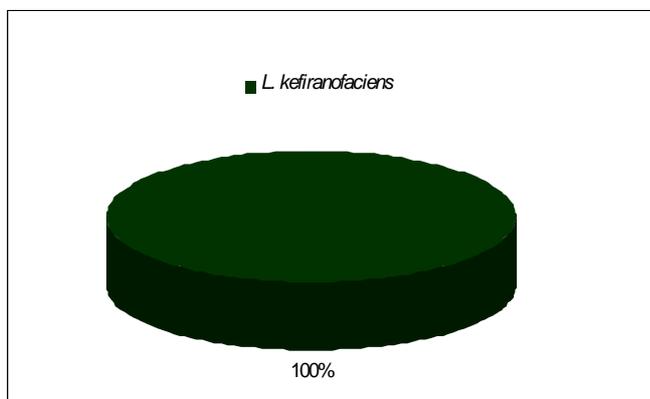
<b>Amostra de Kefir</b>	<b>Perfil de ARDRA</b>	<b>Espécie</b>	<b>Nº clones / Total de clones</b>
<b>KLSA</b>	P1*	<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i>	24/50
	P2*		22/50
	P3		1/50
	P4		1/50
	P5		1/50
	P6		1/50
<b>KLCU</b>	P7*	<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i>	24/50
	P8*	<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i>	22/50
	P9	<i>Lactobacillus kefir</i>	2/50
	P10	<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i>	1/50
	P11	<i>Oenococcus oeni</i>	1/50
<b>KASA</b>	P12*	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	9/50
	P13*	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	8/50
	P14*	<i>Lactobacillus casei</i>	3/50
	P15*	<i>Lactobacillus paracasei</i>	3/50
	P16	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	2/50
	P17	<i>Lactobacillus casei</i>	2/50
	P18	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	2/50
	P19	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	2/50
	P20	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	2/50
	P21	<i>Lactobacillus nagelii</i>	2/50
	P22	<i>Lactobacillus casei</i>	1/50
	P23	<i>Lactobacillus casei</i>	1/50
	P24	<i>Lactobacillus casei</i>	1/50

	P25	<i>Lactobacillus casei</i>	1/50
	P26	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	1/50
	P27	<i>Lactobacillus paracasei</i>	1/50
	P28	<i>Oenococcus oeni</i>	1/50
	P29	<i>Oenococcus oeni</i>	1/50
	P30	<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i>	1/50
	P31	Uncultured <i>Lactobacillus</i>	1/50
	P32	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	1/50
	P33	<i>Lactobacillus casei</i>	1/50
	P34	<i>Lactobacillus casei</i>	1/50
	P35	<i>Lactobacillus casei</i>	1/50
<b>KACU</b>	P36*	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	10/50
	P37*	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	9/50
	P38*	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	7/50
	P39*	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	6/50
	P40*	<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i>	5/50
	P41	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2/50
	P42	<i>Lactobacillus mali</i>	2/50
	P43	<i>Lactobacillus mali</i>	1/50
	P44	<i>Oenococcus kitaharae</i>	1/50
	P45	Uncultured bacterium clone y- OTU2	1/50
	P46	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	1/50
	P47	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	1/50
	P48	<i>Lactobacillus satsumensis</i>	1/50
	P49	<i>Enterobacter ludwigii</i>	1/50
	P50	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1/50
	P51	<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i>	1/50

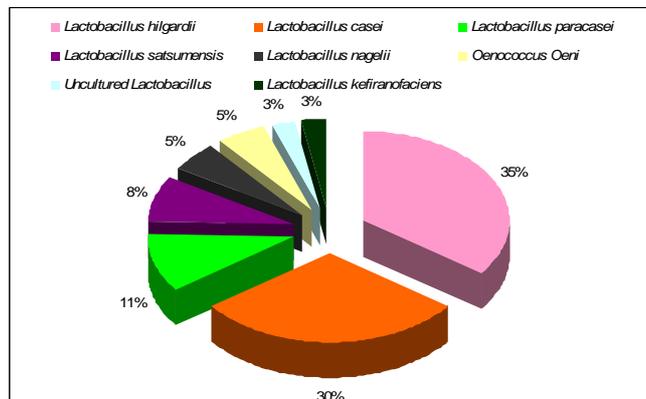
\* Três clones selecionados ao acaso para o sequenciamento do gene 16S do rRNA.

Kesmen e Kacnaz (2011) demonstraram a presença de *Lactobacillus kefiranofaciens* em três amostras de grãos de Kefir de leite da Turquia. O mais recente trabalho de caracterização da microbiota por método independente de cultivo, de Hsieh et al. (2012) utilizando grãos de Kefir de origem de Taiwan, demonstrou a presença de *Leuconoctoc mesenteroides* e *L. hordei* em grãos de Kefir de açúcar e *Leuconostoc mesenteroides* e *L. mali* em grão de Kefir de leite.

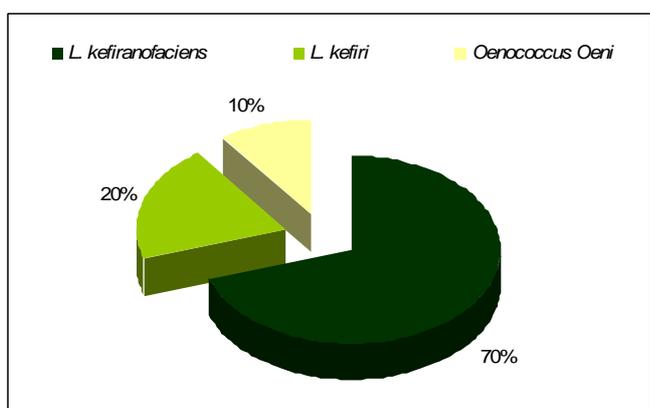
Grão de Kefir KLSA



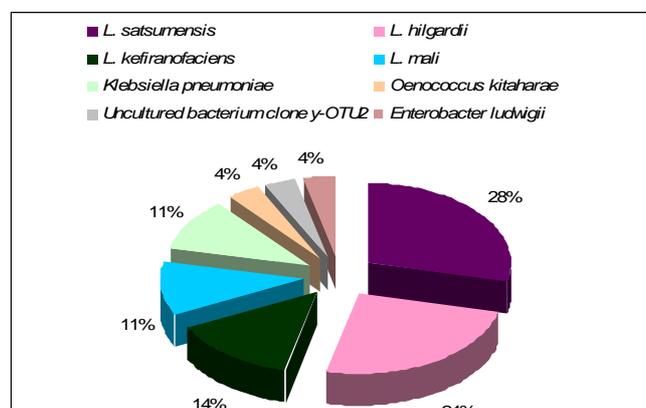
Grão de Kefir KASA



Grão de Kefir KLCU



Grão de Kefir KACU



**Figura 9.** Diversidade de espécies bacterianas nas amostras de grãos de Kefir, identificadas por método independente de cultivo.

A diversidade de microorganismos identificados, pelo método independente de cultivo, foi maior nas amostras KACU e KASA, sendo 8 espécies em cada uma. Nos trabalhos descritos na literatura, a maior diversidade de microorganismos foi descrita em grãos de Kefir cultivados em leite, diferindo do observado neste estudo. Este fato pode ser explicado devido a presença de um maior número de trabalhos utilizando grãos de Kefir cultivados em leite pois só a pouco tempo estes grãos são cultivados em outros substratos tendo um número reduzido de estudos na literatura utilizando água com açúcar com substrato de cultivo dos grãos.

Pelo método independente de cultivo foi possível identificar na amostra KLCU três espécies de BAL e, em comparação ao método dependente de cultivo, foi possível identificar duas espécies que não foram isoladas no método dependente de cultivo, *Lactobacillus kefiranofaciens* e o *Oenococcus oeni*.

*Oenococcus* foi identificado primeiramente por Kowalczyk et al. (2011) pelo método independente de cultivo, em grãos de Kefir de leite da Polônia. A espécie *Leuconostoc oenos* foi mudada a um novo gênero por Dicks et al. (1995) recebendo o nome de *Oenococcus oeni*. Esta mudança ocorreu pois dentre as espécies pertencentes ao gênero *Leuconostoc*, esta é a única acidófila, de ocorrência natural em viniculturas, apresentando crescimento inicial em pH 4,8 em meios contendo 10% de etanol. O *Oenococcus oeni* é uma espécie de interesse comercial, pois apresenta destaque na produção de vinhos por atuar na segunda etapa da fermentação, denominada fermentação malolática, convertendo o ácido málico em ácido láctico, promovendo uma diminuição na acidez total do vinho (Nielsen & Richelieu, 1999). O estudo recente de Foligné et al. (2010) evidenciou o potencial anti-inflamatório de uma cepa de *Oenococcus oeni*, sugerindo uma possível utilização deste como probiótico.

Na amostra KLSA foi identificada apenas uma espécie de BAL dominante, *Lactobacillus kefiranofaciens*, diferindo de todas as espécies isoladas no método dependente de cultivo. Apesar disto, aparentemente haviam cinco linhagens diferentes de *L. kefiranofaciens* nos grãos devido aos diferentes padrões de ARDRA observados. Sabendo que esta amostra possui em sua microbiota dominante o *Lactobacillus kefiranofaciens*, é de interesse que seja realizado uma nova tentativa de obtenção deste microrganismo isolado, tendo em vista sua capacidade de produzir o kefirano, um exopolissacarídeo que constitui de 24 a 25% do grão de Kefir e de interesse por suas propriedades funcionais descritas na literatura, antiolesterolêmico e antihipertensivo, e também atividade imunomodulatória, com mecanismo ainda pouco conhecido (Fujisawa et al, 1988; Furuno e Nakanishi, 2012; Chen et al., 2012).

O kefirano é produzido no interior do grão de Kefir por *Lactobacillus kefiranofaciens* sob condições anaeróbicas e em presença do etanol produzido por leveduras e do ácido láctico produzido por lactobacilos (Badel et al., 2011). Toba et al. (1991) avaliaram a produção de leite fermentado utilizando *Lactobacillus kefiranofaciens* isolado de grãos de Kefir e concluíram que devido ao kefirano produzido por esta espécie, havia um aumento na viscosidade do leite fermentado.

O kefirano também pode ser usado como aditivo alimentar para produtos fermentados a fim de realçar as propriedades reológicas de leites fermentados, aumentando sua viscosidade aparente e a estabilidade desses durante o armazenamento (Wang et. al., 2008). Abraham & Rimada (2006) demonstraram que as propriedades de viscosidade e viscoelasticidade dos géis ácidos foram melhoradas pela adição de kefirano, sugerindo uma possível aplicação deste polissacarídeo natural como um agente viscosante para produtos lácteos.

Kesmen e Kacnaz (2011) identificaram pelo método independente de cultivo PCR-DGGE, *Lactobacillus kefiranofaciens* em três amostras de grãos de Kefir de leite da Turquia, sendo esta espécie dominante nos três grãos, e também não obtiveram esta espécie por isolamento pelo método dependente de cultivo. A explicação para este fato é que os ingredientes necessários para o crescimento desta espécie não foram suficientes no meio de cultura utilizado para isolamento (Kesmen e Kacnaz, 2011).

A constatação da presença de *Lactobacillus kefiranofaciens* pelo método independente de cultivo demonstra a necessidade de adequações à técnica de cultivo empregada para se obter sucesso no isolamento deste microrganismo, devido o seu interesse como probiótico. O meio de cultivo empregado para o isolamento e as condições de pH foram descritas por Toba et al. (1988) obtendo-se este microrganismo isolado. Novas tentativas de isolamento podem ser realizadas empregando uma porcentagem maior de leite desnatado ao soro de ácido láctico e aumentando o teor alcoólico do meio de cultivo.

A diversidade de microrganismos identificados pelo método independente de cultivo foi maior nas amostras KACU e KASA, cultivadas em água com açúcar mascavo, apresentando oito espécies de bactérias em cada uma.

Comparando com as espécies isoladas da amostra KACU, apenas o *Lactobacillus satsumensis* foi identificado pelas duas técnicas, sendo possível identificar sete espécies dominantes na comunidade não encontradas pela metodologia dependente de cultivo. Ainda nesta amostra foi observada a presença de uma OTU correspondente a bactéria não cultivável e de duas OTUs correspondentes a bactérias potencialmente patogênicas, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter ludwigii*, coliformes pertencentes a família Enterobacteriaceae, possivelmente introduzidas na amostra por práticas de manuseio e asseio precárias da fonte fornecedora.

O *Enterobacter ludwigii* foi isolado da urina de um paciente internado em um hospital da Alemanha, com infecção urinária. Esta espécie possui as características gerais do gênero *Enterobacter* de ser causadora de infecções hospitalares, devido sua capacidade de resistência à antimicrobianos, acometendo o trato respiratório e urinário de pacientes imunocomprometidos e infectando feridas (Hoffmann et al., 2005). Espécies do gênero *Klebsiella* são mais comumente responsáveis por infecções hospitalares (Sanders, Jr e Sanders, 1997). Há relato na literatura da identificação de *Enterobacter sakazakii* pelo método independente de cultivo PCR-DGGE, de grão de Kefir de leite de Taiwan (Hsieh et al., 2012).

No estudo de Miguel et. al. (2010) observou-se a presença de três bactérias não cultiváveis, utilizando o método independente de cultivo PCR-DGGE, sendo elas Uncultured bacterium FJ 838427.1 (grão de Kefir de leite de Santa Catarina), Uncultured bacterium AM 921620.1 (grão de Kefir de leite de Alagoas) e Uncultured bacterium EF 014703.1 (grão de Kefir de leite de São Paulo). Magalhães et. al, (2011) também relata a presença de bactéria não cultivável em amostras de grãos de Kefir de leite de São Paulo e Goiás, Uncultured bacterium EF014703.1, utilizando o método PCR-DGGE.

Na amostra KACU também foram identificados *L. hilgardii*, *L. satsumensis* e *L. mali*. Miguel et al. (2010) foram os primeiros a relatar a presença de *L. satsumensis* em grãos de Kefir de leite, utilizando um método independente de cultivo, o PCR- DGGE.

O *Lactobacillus hilgardii* parece desempenhar um importante papel na formação dos grãos de Kefir de água. No trabalho de Waldherr et. al. (2010), a glicosiltransferase (GTF) responsável pela produção do dextrano a partir da quebra de sacarose em glicose e frutose foi purificada de uma linhagem de *Lactobacillus hilgardii*. Na literatura não há relatos de identificação em grãos de Kefir de *L. mali*, sendo este trabalho o primeiro a identificar por método independente de cultivo esta espécie em grão de Kefir de água.

Na amostra KASA foi possível identificar, pelo método independente de cultivo, sete espécies de BAL e uma bactéria não cultivável do gênero *Lactobacillus*. Em comparação ao método dependente de cultivo, quatro espécies que não foram isoladas, o *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus nagelii*. Miguel et. al. (2010) identificou *Lactobacillus paracasei* em duas amostras de grãos de Kefir de leite originadas de Minas Gerais e do Paraná por PCR-DGGE. Gulitz et al. (2011) isolaram *Lactobacillus nagelii* em grãos de Kefir de água.

## 6. CONCLUSÃO

Neste estudo a composição da microbiota de quatro das oito amostras de grãos de Kefir, obtidas de diferentes estados do Brasil, foi analisada utilizando métodos dependente e independente de cultivo.

Os resultados obtidos neste estudo permitiram o isolamento e identificação de 55 isolados sugestivos de pertencerem ao gênero *Lactobacillus* das diferentes amostras de grãos de Kefir, sendo identificadas ao final do processo o total de 11 espécies de bactérias do ácido láctico (*Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., *Leuconostoc* spp e *Oenococcus* spp.). Com o resultado da análise pelo método independente de cultivo, realizado com quatro amostras, 14 diferentes espécies foram identificadas.

Para a caracterização da microbiota de grãos de Kefir, é importante a associação de métodos dependentes de independentes de cultivo. Com a técnica tradicional, dependente de cultivo, foram obtidos diferentes isolados que serão mantidos no laboratório para estudos posteriores de possíveis características probióticas. Além disso, esses isolados poderão ser utilizados na composição de culturas iniciadoras para produção de Kefir em escala industrial. A utilização da técnica molecular, independente de cultivo, nos permitiu identificar microorganismos não detectados pela outra técnica, permitindo comparar a diversidade de microorganismos presentes nos diferentes grãos de Kefir, cultivados em substratos variados, e ainda identificar bactérias não cultiváveis e bactérias potencialmente patogênicas.

Isso demonstra que o isolamento de um espécime microbiano é dependente de diversos fatores e, portanto, o uso da metodologia padrão pode não ser suficiente para garantir o crescimento de todas as células presentes numa amostra. Por outro lado, a constatação da presença de um dado espécime por técnicas independentes de cultivo demonstra que devem ser feitas adequações à técnica de cultivo empregada para se obter sucesso no isolamento daquele microorganismo, caso ele seja de interesse.

## REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, A. G. & RIMADA, P. S. Kefiran improves rheological properties of glucono- $\delta$ -lactone induced skim milk gels. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 33-39, 2006.
- ANGULO, L.; LOPEZ, E.; LEMA, C. Microflora present in kefir grains of the Galician region (North-West of Spain). **Journal of Dairy Research**, v. 60, p. 263–267, 1993.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 389, de 30/04/99 da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde.
- BACK, W.; BOHAK, I.; EHRMANN, M.; LUDWIG, W.; POT, B.; KERSTERS, K.; SCHLEIFER, K. H. *Lactobacillus perolens* sp. nov., a Soft Drink Spoilage Bacterium **Systematic and Applied Microbiology**, v. 22, p. 354-359, 1999.
- BADEL, S.; BERNARDI, T.; MICHAUD, P. New perspectives for Lactobacilli exopolysaccharides. **Biotechnology Advances**, v. 29, p.54–66, 2011.
- BERNARDEAU, M.; VERNOUX J. P.; HENRI-DUBERNET, S.; GUÉGUEN, M. Safety assessment of dairy microorganisms: The Lactobacillus genus. **Journal of Food Microbiology**, v. 126, p. 278 - 285, 2008.
- BESHKOVA, D. M.; SIMOVA, E. D.; FRENGOVA, G. I.; SIMOV, Z. I.; DIMITROV, ZH. P. Production of volatile aroma compounds by kefir starter cultures. **International Dairy Journal** v. 13, p. 529–535, 2003.
- BRAVO D.; RODRIGUEZ E.; MEDINA M. Nisin and lacticin 481 coproduction by *Lactococcus lactis* strains isolated from raw ewes' milk. **Journal of Dairy Science**. v.92, p. 4805–481, 2009.
- CASALTA, E. & MONTEL, M. C. Safety assessment of dairy microorganisms: The Lactococcus genus. **International Journal of Food Microbiology**, v. 126, p. 271–273, 2008.
- CASTAGLIUOLO, I.; GALEAZZI, F.; FERRARI, S.; ELLI, M.; BRUN, P.; CAVAGGIONI, A.; TORMEN, D.; STURNIOLO, G. C.; MORELLI, L.; PALÙ, G. Beneficial effect of auto-

aggregating *Lactobacillus crispatus* on experimentally induced colitis in mice. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 43, n. 2, p.197-204, 2005.

CENESIZ, S.; DEVRIM, A. K.; KAMBER, U. AND SOZMEN, M. 2008. The effect of Kefir on glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA) and nitric oxide (NO) levels in mice with colonic abnormal crypt formation (ACF) induced by azoxymethane (AOM). In: GUZEL-SEYDIM, Z. B.; KOK-TAS, T.; GREENE, A. K.; SEYDIM, A. C. Review: functional properties of kefir. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, n. 3, p. 248-260, 2011.

CHEN, H. C.; WANG, S. Y. & CHEN, M. J. Microbiological study of lactic acid bacteria in kefir grains by culture-dependent and culture-independent methods. **Food Microbiology**, v. 25, p. 492–501, 2008.

CHEN, Y. P.; HSIAO, P. J; HONG, W. S.; DAI, T. Y.; CHEN, J. M. *Lactobacillus kefiranofaciens* M1 isolated from milk kefir grains ameliorates experimental colitis in vitro and in vivo. **Journal of Dairy Science**. v. 95, p. 63-74, 2012.

CROSS, M. L. Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. **Immunology and Medical Microbiology**, n. 34, p. 245 - 253, 2002.

DE VRESE, M.; KELLER, B. AND BARTH, C. A. Enhancement of intestinal hydrolysis of lactose by microbial  $\beta$ -galactosidase (EC 3.2.1.23) of kefir. **British Journal of Nutrition**, v. 67, p. 67–75, 1992.

DICKS, L. M. T.; DELLAGLIO, F.; COLLINS, M. D. Proposal To Reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni* [corrig.] gen. nov., comb. nov. **Internation Journal of Systematic Bacteriology**, v. 45, n. 2, p. 395-397, 1995.

DRIESSEN, F. M. & DE BOER, R. Fermented milks with selected intestinal bacteria: a healthy trend in new products. **Netherlands Milk Dairy Journal**, v. 43, p. 367-382, 1989.

ENDO, A. & OKADA, S. *Lactobacillus farraginis* sp. nov. and *Lactobacillus parafarraginis* sp. nov., heterofermentative lactobacilli isolated from a compost of distilled shochu residue. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.57, p. 708–712, 2007.

EUZÉBY, J. P. List of Prokaryotic names with standing in nomenclature. Genus *Lactobacillus* (2012). Disponível em <<http://www.bacterio.cict.fr/l/lactobacillus.html>>. Acesso em 15/06/2012<sup>a</sup>

EUZÉBY, J. P. List of Prokaryotic names with standing in nomenclature. Classification of genera (2012). Disponível em <<http://www.bacterio.cict.fr/classificationdl.html>>. Acesso em 18/06/2012<sup>b</sup>

EUZÉBY, J. P. List of Prokaryotic names with standing in nomenclature. Genus *Lactococcus* (2012). Disponível em <<http://www.bacterio.cict.fr/l/lactococcus.html>>. Acesso em 18/06/2012<sup>c</sup>

EUZÉBY, J. P. List of Prokaryotic names with standing in nomenclature. Genus *Leuconostoc* (2012). Disponível em <<http://www.bacterio.cict.fr/l/leuconostoc.html>>. Acesso em 19/06/2012<sup>d</sup>

FAO/WHO, Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report ,1-11, 2002.

FARNWORTH, E. & MAINVILLE, I. Handbook of Fermented Functional Foods 78-103, 2003

FELIS, G. E. & DELLAGLIO, F. Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria. **Current Issues in Intestinal Microbiology**, v. 8, p 44 - 61, 2007.

FLORESTA, F. A. Análise de região codificadora de rRNA de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2B20: filogenia e presença de sequência de inserção putativa. 54 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, 2003.

FOLIGNE, B.; DEWULF, J.; BRETON, J.; CLAISSE, O.; LONVAUD-FUNEL, A.; POT, B. Probiotic properties of non-conventional lactic acid bacteria: Immunomodulation by *Oenococcus oeni*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 140, p. 136–145, 2010.

FUJISAWA, T.; ADACHL, I. S.; TOBA, T.; ARIHARA, K.; MITSUOKA, T. *Lactobacillus kefiranofaciens* sp. nov. Isolated from Kefir Grains. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 38, n. 1, p.12-14, 1988.

FUKUSHIMA, M. & NAKANO, M. 1996. Effects of a mixture of organisms, *Lactobacillus acidophilus* or *Streptococcus faecalis* on cholesterol metabolism in rats fed on a fat- and cholesterol-enriched diet. In: DICKS, L.M.T.& BOTES, M. Probiotic lactic acid bacteria in the gastro-intestinal tract: health benefits, safety and mode of action. **Beneficial Microbes**, v. 1, nº 1, p. 11-29, 2010.

FURUNO, T. & NAKANISHI, M. Kefiran Suppresses Antigen-Induced Mast Cell Activation **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 35, n. 2, p. 178—183, 2012.

GARROTE, G.; ABRAHAM, A.; DE ANTONI, G. L. Preservation of kefir grain a comparative study. **Lebensmittel – Wissenschaft Technologie**, v. 3, p. 77–84, 1997.

GARROTE, G.; ABRAHAM, A.; DE ANTONI, G. L. Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. **Journal of Dairy Research**, v. 6, p. 639–652, 2001.

GARROTE, G. L.; DELFEDERICO, L.; BIBILONI, R.; ABRAHAM, A. G.; P´EREZ, P. F.; SEMORILE, L.; DE ANTONI, G. L. Lactobacilli isolated from kefir grains: evidence of the presence of S layer proteins. **Journal of Dairy Research**, v. 71, p. 222–230, 2004.

GILLILAND, S. E. Factors to consider when selecting a culture of *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct to produce a hypocholesterolemic effect in humans. **Journal of Dairy Science**, v. 73, p. 905-911, 1990.

GIRAFFA, G. Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 28, p. 251–260, 2004.

GOMES, A. M. P. & MALCATA, F. X. Agentes probióticos em alimentos: aspectos fisiológicos e terapêuticos, e aplicações tecnológicas. **Boletim de Biotecnologia de Alimentos**, n. 64, p. 12-22, 1999.

GORSEK, A. & TRAMSEK, M. Kefir grains production: An approach for volume optimization of two-stage bioreactor system. **Biochemical Engineering Journal**, v. 42, p. 153–158, 2008.

GRUNEWALD, K.K., 1982. Serum cholesterol levels in rats fed skim milk fermented by *Lactobacillus acidophilus*. In: DICKS, L.M.T.& BOTES, M. Probiotic lactic acid bacteria in the

gastro-intestinal tract: health benefits, safety and mode of action. **Beneficial Microbes**, v. 1, n° 1, p. 11-29, 2010.

GULITZ, A.; STADIE, J.; ENNING, M.; EHRMANN, M. A.; VOGEL, R. F. The microbial diversity of water kefir. **International Journal of Food Microbiology**, v.151, p. 284–288, 2011.

GUVEN, A. & GULMEZ, M. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 50, p. 412, 2003.

GUZEL-SEYDIM, Z.; SEYDIM, A. C.; GREENE, A. K. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 275, 2000.

GUZEL-SEYDIM, Z. B.; KOK-TAS, T.; GREENE, A. K.; SEYDIM, A. C. Review: functional properties of kefir. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, n. 3, p. 248-260, 2011.

HAMMES, W. P.; HERTEL, C. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: DWORKIN, M. et al. **The Prokaryotes**. 3 ed, v. 1, p. 320 - 403. 2006.

HANDELSMAN J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 68, p. 669-685, 2004.

HASTINGS, J. W.; STILES, M. E.; HOLY, A. Bacteriocins of *Leuconostocs* isolated from meat. **International Journal of Food Microbiology**. v. 24, p. 75-81, 1994.

HEAD, I. M.; SAUNDERS, J. R.; PICKUP, R. W. Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. **Microbial Ecology**, v. 35, p. 1–21, 1998.

HERTZLER, S. R. AND CLANCY, S. M. Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 103, p. 582–587, 2003.

HOFFMANNA, H.; STINDLB, S.; STUMPF, A.; MEHLENB, A.; MONGETD, D.; HEESEMANN, J.; SCHLEIFERB, K. H.; ROGGENKAMP, A. Description of *Enterobacter ludwigii* sp. nov., a novel *Enterobacter* species of clinical relevance. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 28, p. 206–212, 2005.

HUGENHOLTZ, P.; GOEBBEL, B. M.; PACE, N. R. Impact of culture independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. **Journal of Bacteriology**, v. 180, 4765–4774, 1998.

HSIEH, H. H.; ET AL., Effects of cow's and goat's milk as fermentation media on the microbial ecology of sugary kefir grains, **International Journal of Food Microbiology**, (2012), doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.04.014

INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 46, DE 23 DE OUTUBRO DE 2007. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

JUNIOR, F. B. R.; TEIXEIRA, K. R. S.; REIS, V. M. Análise de restrição do DNA ribossomal amplificado (ARDRA) em estudos de diversidade intra-específica de *Azospirillum amazonense* isolado de diferentes espécies de *Brachiaria*. **Documentos: EMBRAPA Cerrados**, v. 117, p. 1 - 41, 2004.

KEKKONEN, R. A.; KAJASTO, E.; MIETTINEN, M.; VECKMAN, V.; KORPELA, R.; JULKUNEN, I. Probiotic *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* and *Streptococcus thermophilus* induce IL-12 and IFN- $\gamma$  production. **World Journal of Gastroenterology**, v. 14, n. 8, p.1192-1203, 2008.

KESMEN, Z. & KACMAZ, N. Determination of Lactic Microflora of Kefir Grains and Kefir Beverage by Using Culture-Dependent and Culture-Independent Methods. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 5, p. 276-283, 2011.

KIM, M.; CHUN, J.T. Bacterial community structure in kimchi, a Korean fermented vegetable food, as revealed by 16S rRNA gene analysis. **International Journal of Food Microbiology** v. 103, p. 91– 96, 2005.

KOWALCZYK, M.; KOLAKOWSKI, P.; RADZIWIŁL-BIENKOWSKA, J. M.; SZMYTKOWSKA, A.; BARDOWSKI, J. Cascade cell lyses and DNA extraction for identification of genes and microorganisms in kefir grains. **Journal of Dairy Research**, p.1-7, 2011.

KROONEMAN, J.; FABER, F.; ALDERKAMP, A. C.; OUDE ELFERINK, S. J. H. W.; DRIEHUIS, F.; CLEENWERCK, I.; SWINGS, J.; GOTTSCHAL, J. C. AND VANCANNEYT, M. *Lactobacillus diolivorans* sp. nov., a 1,2-propanediol-degrading bacterium isolated from

aerobically stable maize silage. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p. 639–646, 2002

LEBEER, S.; VANDERLEYDEN, J.; DE KEERSMAECKER, S. C. J. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 72, n. 4, p. 728 - 764, 2008.

LEROI, F. & PIDOUX, M. Characterization of interactions between *Lactobacillus hilgardii* and *Saccharomyces florentinus* isolated from sugary kefir grains. **Journal of Applied Microbiology**, v. 74, p. 54–60. 1993.

LI, J.; ZHANG, W.; WANG, C.; YU, Q.; DAI, R.; PEI X. *Lactococcus lactis* expressing food-grade  $\beta$ -galactosidase alleviates lactose intolerance symptoms in post-weaning Balb/c mice. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Mar 8, 2012.

LIU, J.; WANG S.; LIN, Y. AND LIN, C. Antitumor activity of milk kefir and soy milk kefir in tumor-bearing mice. **Nutrition and Cancer**, v.44, p.183–187, 2002.

LIU, J. R; WANG, S. Y.; CHEN, M. J.; CHEN, H. L.; YUEH, P. Y., AND LIN, C. W. Hypocholesterolaemic effects of milk-kefir vs soya milk-kefir in cholesterol fed hamsters. **British Journal of Nutrition**, v. 95, p. 939–946, 2006.

LIN, C. W.; CHEN, H. L.; LIU, J. R. Identification and characterization of lactic acid bacteria and yeasts isolated from kefir grains in Taiwan. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 54, p. 14–18, 1999.

MAGALHÃES, J. T.; FLORESTA, F.; MORAES, C. A. Partial characterization of ribosomal operons of *Lactobacillus delbrueckii*UFV H2B20. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 177 - 183, 2005.

MAGALHÃES, K. T.; PEREIRA, G. V. M.; DIAS, D. R. & SCHWAN, R. F. Microbial communities and chemical changes during fermentation of sugary Brazilian kefir. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 7, p. 1241- 1250, 2010.

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

MAINVILLE, I.; ROBERT, N.; LEE, B. & FARNWORTH, E. R. Polyphasic characterization of the lactic acid bacteria in kefir. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, p. 59–68, 2006.

MALIN, M.; SUOMALAINEN, H.; SAXELIN, M. AND ISOLAURI, E. Promotion of IgA immune response in patients with Crohn's disease by oral bacteriotherapy with *Lactobacillus* GG. **Annals in Nutrition Methods**, v. 40, p. 137-145, 1996.

MARSHALL, V.M. Starter cultures for milk fermentation and their characteristics. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v. 46, p. 49–56, 1993.

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

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

MIGUEL, M. G. C. P.; CARDOSO, L. A.; SCHWAN, R. F. Profile of microbial communities present in tibico (sugary kefir) grains from different Brazilian States. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 1875–1884, 2011.

MOREIRA, J. S.; MOTA, R. M.; HORTA, M. F.; TEIXEIRA, S. M. R.; NEUMANN, E.; NICOLI, J. R. AND NUNES, A. C. Identification to the species level of *Lactobacillus* isolated in probiotic prospecting studies by 16S-23S rRNA restriction profiling. **BMC Microbiology**, v. 5, p.15, 2005.

MORENO DE LEBLANC, A.; MATAR, C.; FARNWORTH, E.; PERDIGO, G. Study of Immune Cells Involved in the Antitumor Effect of Kefir in a Murine Breast Cancer Model. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p.1920–1928, 2007.

NIELSEN, J. C. AND RICHELIEU, M. Control of Flavor Development in Wine during and after Malolactic Fermentation by *Oenococcus oeni*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 2, p. 740–745, 1999.

NOUR, M. 16S-23S and 23S-5S intergenic spacer regions of lactobacilli: nucleotide sequence, secondary structure and comparative analysis. **Research in Microbiology**, v. 149, p. 433 - 448, 1998.

OGIER, J. C.; CASALTA, E.; FARROKH, C.; SAÏHI, A. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Leuconostoc* genus. **International Journal of Food Microbiology**, v.126, p. 286–290, 2008.

OLIVEIRA, M. N.; SIVIERI, K.; ALEGRO, J. H. A.; SAAD, S. M. I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.38, n.1, p. 1-21, 2002.

OLSEN G.J.; LANE D.J.; GIOVANNONI S.J. & PACE N.R. Microbial Ecology and Evolution: A Ribosomal RNA Approach. **Annual Review of Microbiology**, v.40, p. 337- 365, 1986.

PARENTE, E.; MOLES, M.; RICCIARDI, A. Leucocin F 10, a bacteriocin from *Leuconostoc carnosum*. **International Journal of Food Microbiology**, v.33, p. 231-243, 1996.

PONTES, D. S.; BITTENCOURT, C. I.; CHARTONE, E. S.; NASCIMENTO, A. M. A. Molecular approaches: advantages and artifacts in assessing bacterial diversity. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v. 34, p. 463-473, 2007

REYSENBACH, A. L.; LONGNECKER, K.; KIRSHTEIN, J. Novel bacterial and archaeal lineages from an in situ growth chamber deployed at a mid-atlantic ridge hydrothermal vent. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 9, p. 3798 - 3806, 2000.

SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; MÄTTÖ, J.; MATTILA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, v. 84, p. 197 - 215, 2000.

SABIR, F.; BEYATLI, Y.; COKMUS, C.; DARILMAZ, D. O. Assessment of Potential Probiotic Properties of *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., and *Pediococcus* spp. Strains Isolated from Kefir. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 9, p. 568- 573, 2010.

SAMAR, L.; HADDA, O.; NICOLAS, A.; ZIAD, F.; PASCAL, M.; ABDELLATIF, B.; FRANÇOIS, S.; MARC, S. J. Lacticin LC14, a new bacteriocin produced by *Lactococcus*

*lactis* BMG6.14: isolation, purification and partial characterization. **Infectious Disorders - Drug Targets**, Jun 14, 2012.

SAMARŽIJA, D.; ANTUNAC, N.; LUKA\_ HAVRANEK, J. Taxonomy, physiology and growth of *Lactococcus lactis*: a review. **Mljekarstvo**, v. 51, p. 35-48, 2001.

SANDERS, JR., W. E. & SANDERS, C. C. *Enterobacter* spp.: Pathogens Poised To Flourish at the Turn of the Century. **Clinical Microbiology Reviews**, v, 10, n°2, p. 220–241, 1997.

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

SHAPIRO, J. A & DWORKIN M. Bacteria as Multicelular Organisms. Oxford University Press, First Edition, New York, USA, 1997.

SHIOMI, M., SASAKI, K., MUROFUSHI, M., AND AIBARA, K. (1982). Antitumor activity in mice orally administered polysaccharide from kefir grain. In: GUZEL-SEYDIM, Z. B.; KOKTAS, T.; GREENE, A. K.; SEYDIM, A. C. Review: functional properties of kefir. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, n. 3, p. 248-260, 2011.

SIMOVA E.; BESHKOVA D.; ANGELOV A.; HRISTOZOVA T.; FRENGOVA G.; SPASOV Z. Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, 281–6, 2002.

SOZMEN, M.; ERGINSOY, S.D.; CENESIZ, S. AND DEVRIM, A. K. The protective effect of kefir and vitamin C on azoxymethane induced toxicity and induction of metallothionein in mice. **Scandinavian Journal of Laboratory Animal**, v. 32, p. 211–220, 2005.

TAKIZAWA, S.; KOJIMA, S.; TAMURA, S.; FUJINAGA, S.; BENNO, Y.; NAKASE, T. The composition of the *Lactobacillus* flora in kefir grains. **Systematic and Applied Microbiology**, v.21, p. 121–127, 1998.

TANNOCK, G. W.; TILSALA-TIMISJARVI, A.; RODTONG, S.; NG, J.; MUNRO, K.; ALATOSSAVA, T. Identification of *Lactobacillus* isolates from the gastrointestinal tract, silage, and yoghurt by 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region sequence comparisons. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 9, p. 4264 - 4267, 1999.

TARANTO, M. P.; MEDICI, M.; PERDIGON, G.; RUIZ HOLGADO, A. P. AND VALDEZ, G. F. Effect of *Lactobacillus reuteri* on the prevention of hypercholesterolemia in mice. **Journal of Dairy Science** v. 83, p. 401-403, 2000.

TEMMERMAN, R.; SCHEIRLINCK, I.; HUYS, G. SWINGS, J. Electrophoresis Products by Denaturing Gradient Gel Culture-Independent Analysis of Probiotic. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, nº1, p. 220, 2004.

TILSALA-TIMISJÄRVI A.; ALATOSSAVA T. Development of oligonucleotide primers from the 16S-23S rRNA intergenic sequences for identifying different dairy and probiotic lactic acid bacteria by PCR. **Journal of Food Microbiology**, v. 35, n. 1, p. 49 - 56, 1997.

TOBA T; ABE S; ARIHARA K; ADACHI S. A medium for the isolation of capsular bacteria from kefir grains. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 50, n. 10, p. 2673-2674, 1988.

TOBA, T.; UEMURA, H.; MUKAI, T.; FUJII, T.; ITOH, T. AND ADACHI, S. A new fermented milk using capsular polysaccharide-producing *Lactobacillus kefiranofaciens* isolated from kefir grains. **Journal of Dairy Research**, v.58, p.497–502, 1991.

TORTUERO, F.; FERNÁNDEZ, E.; RUPÉREZ, R. AND MORENO, M. 1997. Raffinose and lactic acid bacteria influence caecal fermentation and serum cholesterol in rats. In: DICKS, L.M.T.& BOTES, M. Probiotic lactic acid bacteria in the gastro-intestinal tract: health benefits, safety and mode of action. **Beneficial Microbes**, v. 1, nº 1, p. 11-29, 2010.

TOUROVA T.P. Copy Number of Ribosomal Operons in Prokaryotes and Its Effect on Phylogenetic Analyses. **Microbiology**, v. 72, p. 389–402, 2003.

VIEGAS, R. P. *Leites fermentados probióticos produzidos a partir de bactérias ácido-lácticas e adicionados de concentrado protéico de soro lácteo: características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais*. 2008. 70 f. Dissertação (Mestrado em ciência animal). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

VINDEROLA, G.; DUARTE, J.; THANGAVEL, D.; PERDIGÓN, G.; FARNWORTH, E.; MATAR, C. Immunomodulating capacity of kefir. *Journal of Dairy Research*, v. 72, n. 2, p. 195-202, 2005.

VINDEROLA, G.; PERDIGÓN, G.; DUARTE, J.; FARNWORTH, E.; MATAR, C. Effects of the oral administration of the products derived from milk fermentation by kefir microflora on immune stimulation. **Journal of Dairy Research** ,v. 73, n. 4, p. 472-479, 2006.

WALDHERR, F. W.; DOLL, V.; MEIßNER, D.; VOGEL, R. F. Identification and characterization of a glucan-producing enzyme from *Lactobacillus hilgardii* TMW 1.828 involved in granule formation of water kefir. **Food Microbiology**. v. 27, p. 672-678, 2010.

WANG, Y.; AHMED, Z.; FENG, W.; LI, C.; SONG, S. Physicochemical properties of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefirifaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 43, p. 283-288, 2008.

WITTHUHN, R.C.; SCHOEMAN, T.; BRITZ, T. J. Isolation and characterization of the microbial population of different South African kefir grains. **International Journal of Dairy Technology**, v. 57, p. 33–37, 2004.

WITTHUHN, R.C.; SCHOEMAN, T.; BRITZ, T. J. Characterisation of the microbial population at different stages of Kefir production and Kefir grain mass cultivation. **International Dairy Journal**, v.15, p. 383–389, 2005.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiological Reviews**, v. 51, p. 221–271, 1987

YU, J.; SUN, Z.; LIU, W.; ZHANG, J.; SUN, T.; BAO, Q.; ZHANG, H. Rapid identification of lactic acid bacteria isolated from home-made fermented milk in Tibet. **Jornal of General and Applied Microbiology**, v. 55, nº3, p. 181-90, 2009.

ZACCONI, C., BOTTAZZI, V., REBECCHI, A., BOSI, E., SARRA, P.G.; TAGLIAFERRI, L., 1992. Serum cholesterol levels in axenic mice colonized with *Enterococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*. In: DICKS, L.M.T.& BOTES, M. Probiotic lactic acid bacteria in the gastro-intestinal tract: health benefits, safety and mode of action. **Beneficial Microbes**, v. 1, nº 1, p. 11-29, 2010.

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

## APÊNDICE

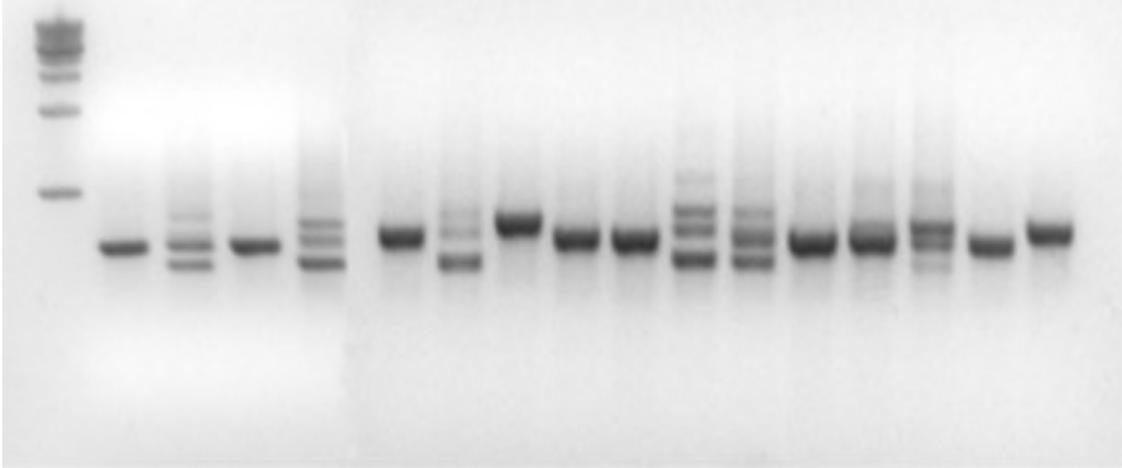
**Apêndice A:** Perfis de digestão esperado para a determinação das espécies de *Lactobacillus*

<i>SphI</i>	<i>NcoI</i>	<i>NheI</i>	<i>SspI</i>	<i>SfuI</i>	<i>EcoRV</i>	<i>DraI</i>	<i>VspI</i>	<i>HincII</i>	<i>EcoRI</i>	<i>HindIII</i>	<i>AvrII</i>	IDENTIFICAÇÃO
---	+++	---	---	+	---	---	---	---	+++	+++	+++	<i>L. acidophilus</i>
+++	---	+++	+++	---	---	---	+++	---	---	---	---	<i>L. agilis</i>
+++	---	---	---	---	---	+++	+++	+-	---	+++	---	<i>L. alimentarius</i>
+++	---	---	---	---	---	+++	+++	++	---	+++	---	<i>L. animalis</i>
+++	---	---	---	---	---	---	+++	---	---	+++	---	<i>L. brevis</i>
+++	---	---	---	+-	+++	+++	---	---	---	+++	---	<i>L. camelliae</i>
---	---	---	---	---	+++	+++	+++	---	---	+++	---	<i>L. casei</i>
+++	+++	---	+++	---	---	---	+++	---	---	---	---	<i>L. coleohominis</i>
---	+++	---	---	+-	+++	---	---	---	+++	+++	+++	<i>L. crispatus</i>
---	+++	---	---	+++	---	---	---	---	---	---	---	<i>L. delbrueckii</i>
+++	+-	---	---	---	---	+++	+++	+-	---	+++	---	<i>L. farciminis</i>
+++	---	---	+++	---	---	---	+++	+++	---	+++	---	<i>L. ferintoshensis</i>
+++	---	+-	---	---	---	---	+++	---	---	---	---	<i>L. fermentum</i>
+++	---	---	+++	---	---	+++	+++	+-	---	+++	---	<i>L. fructivorans</i>
+++	+++	---	---	---	---	---	+++	+-	---	---	---	<i>L. frumenti</i>
---	---	---	---	---	+++	---	---	---	---	+-	+++	<i>L. gasseri</i>
+++	---	---	+++	---	---	---	+++	+++	---	+++	---	<i>L. hilgardii A</i>
+++	---	---	+++	---	---	---	+++	---	---	+++	---	<i>L. hilgardii B</i>
---	---	---	---	---	+++	---	---	---	---	---	---	<i>L. jensenii</i>
---	---	---	---	---	+++	---	---	---	---	+-	---	<i>L. johnsonii</i>
+++	---	---	+++	---	---	---	+++	---	---	---	---	<i>L. mucosae</i>
---	---	---	---	---	---	+++	---	+-	---	+++	---	<i>L. murinus</i>
+++	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	<i>L. nagelli</i>
+++	+++	---	---	---	---	---	+++	---	---	---	---	<i>L. panis</i>
+++	+-	+++	---	+++	+++	+++	---	---	+++	---	---	<i>L. pantheris</i>
+++	---	---	---	---	---	+++	+++	+-	---	+++	---	<i>L. paralimentarius</i>
+++	---	---	+++	---	---	---	+++	+++	---	---	---	<i>L. paraplantarum</i>
+++	---	---	+++	---	---	---	+++	+++	---	---	---	<i>L. pentosus</i>
---	---	---	---	---	+++	---	---	+-	---	+++	---	<i>L. perolens</i>
+++	---	---	+++	+-	---	---	+++	+++	---	---	---	<i>L. plantarum A</i>
+++	---	---	+++	---	---	---	+++	+++	---	---	---	<i>L. plantarum B</i>
+++	+++	---	---	---	---	---	+++	---	---	---	---	<i>L. pontis</i>
+++	+++	---	---	---	---	---	+++	+-	---	---	---	<i>L. reuteri A</i>
+++	+++	---	---	---	---	---	+++	---	---	---	---	<i>L. reuteri B</i>
---	---	---	---	---	+++	+++	---	+-	---	+++	---	<i>L. rhamnosus</i>
---	---	---	+++	+++	---	+++	---	+-	---	---	---	<i>L. ruminis</i>
---	---	---	---	---	---	+++	---	---	---	+++	---	<i>L. sakei</i>
---	---	---	+++	---	---	+++	---	---	---	---	---	<i>L. salivarius</i>
+++	---	+++	---	---	---	+++	+++	---	---	+++	---	<i>L. sanfranciscensis</i>
+++	+++	---	---	---	---	---	+++	+-	---	++	---	<i>L. vaginalis A</i>
+++	+++	---	---	---	---	---	+++	---	---	++	---	<i>L vaginalis B</i>

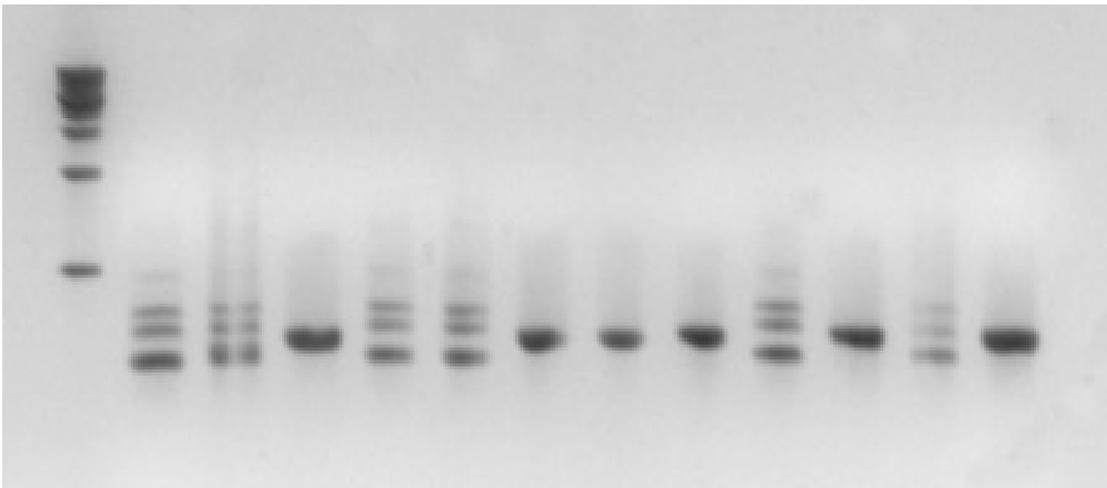
(+) digestões positivas da região ITS-1 do gene 16-23S do rRNA para os espaçadores maiores, intermediários e menores encontrados em *Lactobacillus*.

**Apêndice B:** Gel de agarose a 1% da identificação molecular por PCR dos espaçadores 16S-23S do rRNA (ITS1) dos 117 isolados de bactérias lácticas em potencial

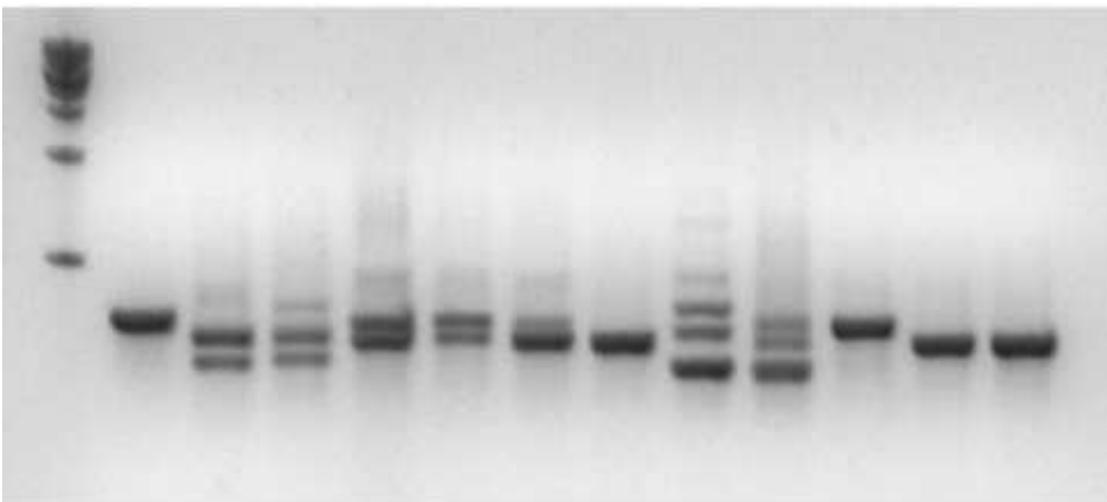
3P 2Z 20P2 17P 17P3 2P2 13U 4R1 24P3 4P2I 1Z 1U 3R 4Z 5PI 10U2



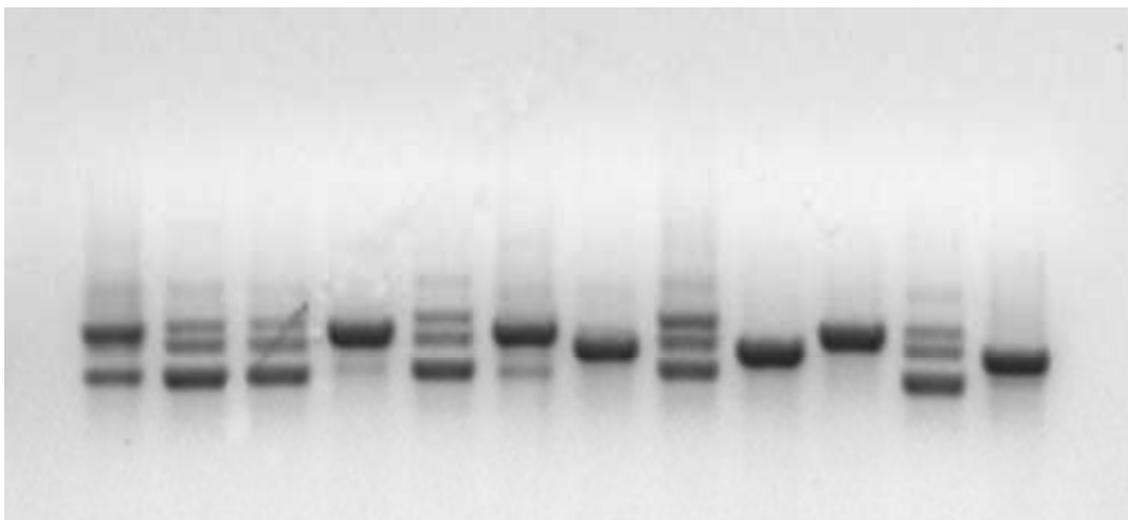
12P 4P 5U 24P3I 22P2 1U1 2U 22P 4P3II 3U 19P 3U1



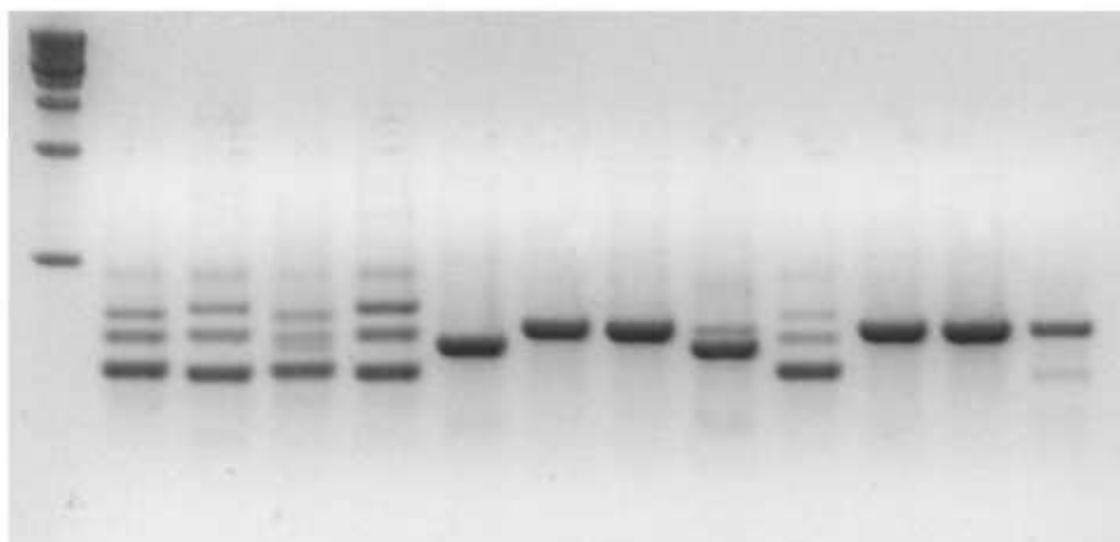
13U2 3Z 7P1 4R2 2R 1R 4U2 1P 13P3 13U1 6U 5Z



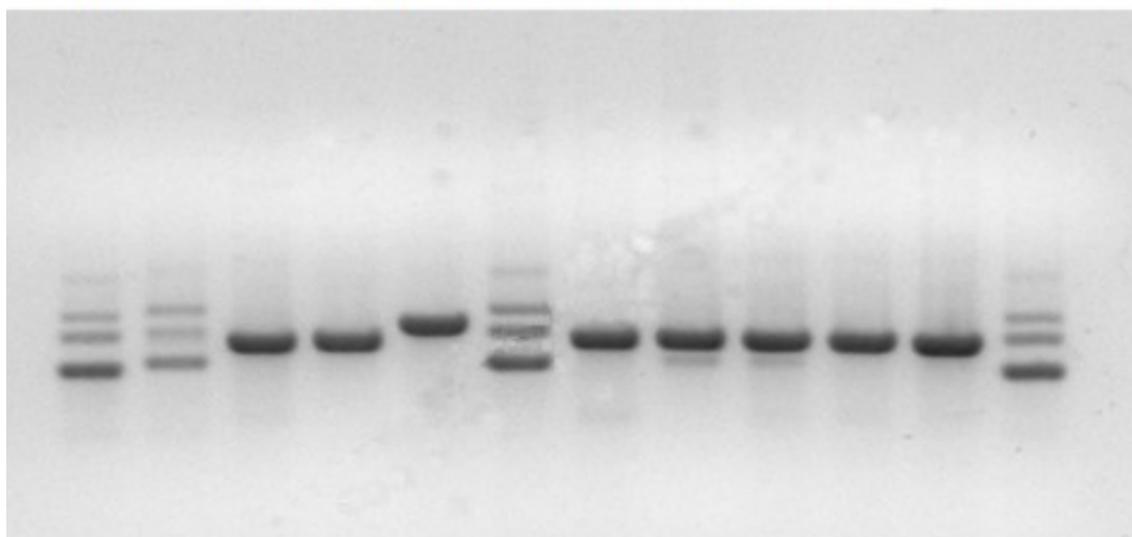
9U1 21U2 18P 11U2 3P2 11U1 5PII 13P 4U1 9U 10P 7P3



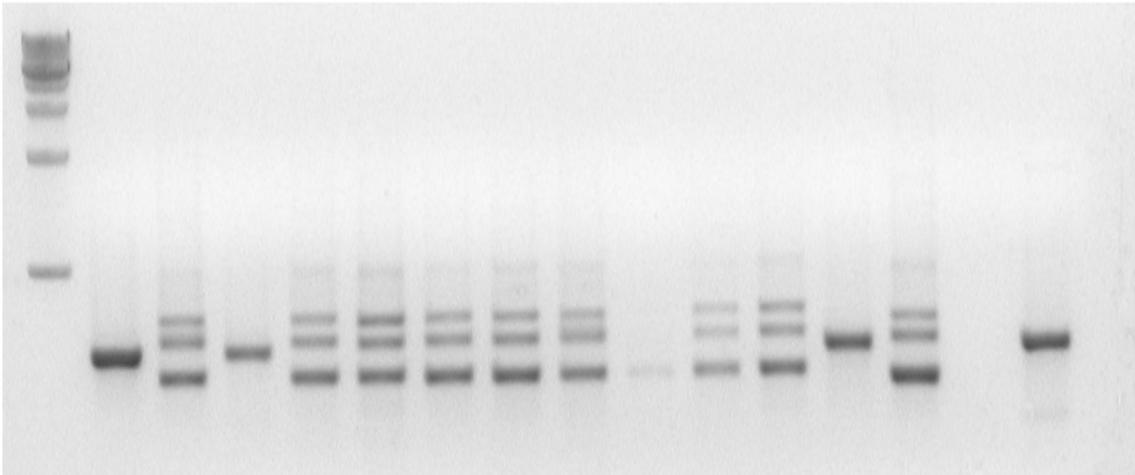
3P3 8U 16P3 6P 22P3 11U 12U1 5U1 16P 10U1 10U 10P3



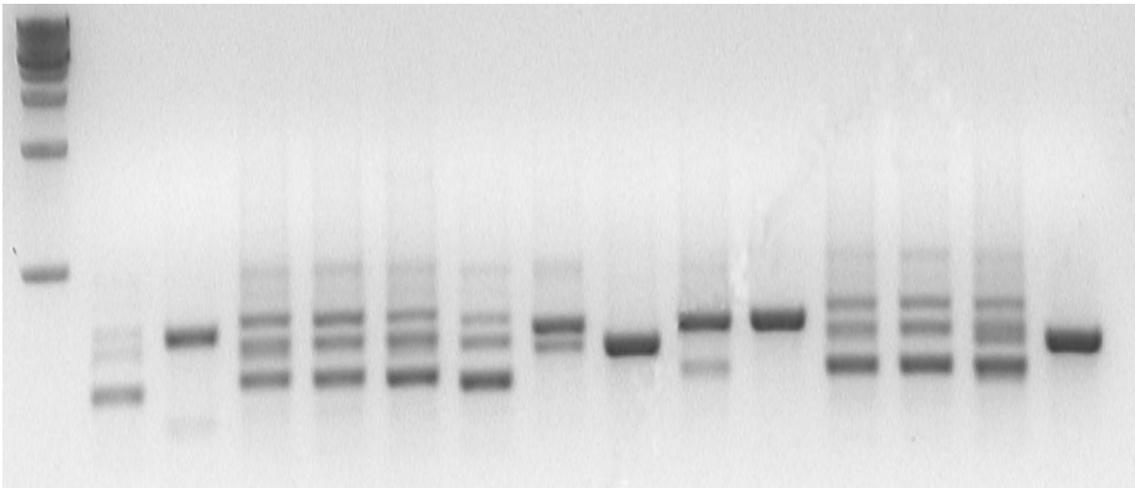
21U1 9P2 4U 20P 12U 8P2 4P2II 24P 16P2 21P 25P2 10P2



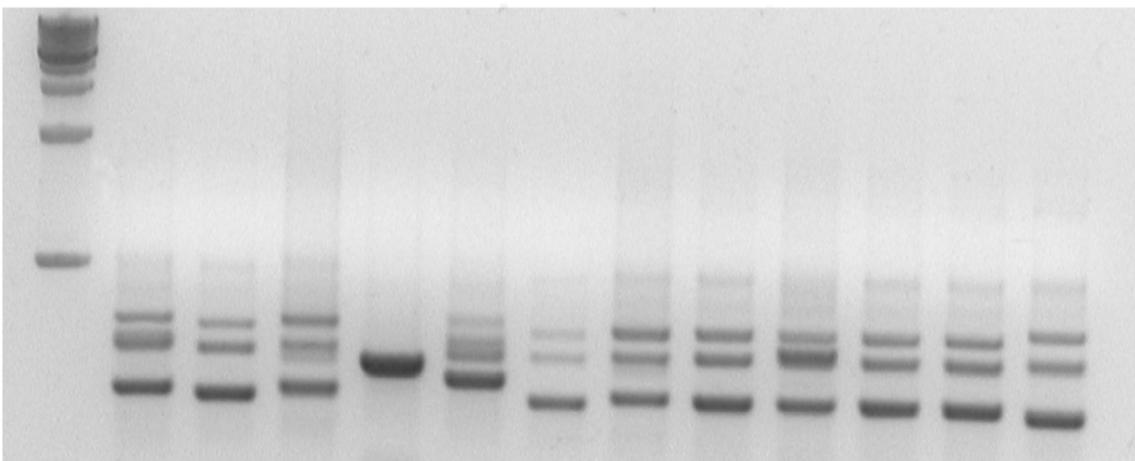
13 T 16U 12T 20U2 11P 20U1 20U 17U 7P2 4P3I 3U2 25P3 19U 1U2 2U1



22U 9U2 11P2 11P3 15U1 23P 7U 23P2 14U 12U2 13P2 25P 14P 24P2



18U 23P3 17P2 2U2 1P2 2P31 4P2 15U 15U2 8P3 8P 1P3







```

Query 845   TCCGAAGAAAAGCTTTCATTACAAAAGCGATCATTGGTATGTCAAGACCTGGTAAGGTTT 904
          |||
Sbjct 1031  TCCGAAGAAAAGCTTTCATTACAAAAGCGATCATTGGTATGTCAAGACCTGGTAAGGTTT 972

Query 905   TTTCCGCTATCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGTCCCGTCAAATT 964
          ||
Sbjct 971   TT-CGCGTATCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGTCCCGTCAA-TT 914

Query 965   CCTTTAAAGTTTTAGCCTTGCGGCCGTACTCCTCAGGCGGGTGCTTAATGCGTTTGCTA 1024
          |||
Sbjct 913   CCTTTAA-GTTTTAGCCTTGCGGCCGTACTCCTCAGGCGGGTGCTTAATGCGTTTGCTA 855

Query 1025  CGTCACTAGGAGGCGAAACCTCTTAACAAC TAGCACCCATCGTTTACGGGTATGGACTA 1084
          |||
Sbjct 854   CGTCACTAGGAGGCGAAACCTCTTAACAAC TAGCACCCATCGTTTACGG-TATGGACTA 796

Query 1085  CCGGGGTATCTAATCCCGTTTGCTACCCATA 1115
          |||
Sbjct 795   CCGGGGTATCTAATCCCGTTTGCTACCCATA 765

```

**>C01 (amostra 2P3 Forward) C01 Placa\_33\_Seq\_170212 Run01 Cimarron  
3.12 591**

```

CNGTTACCGAGGAAACTGAGTGGCGAACGGGTGAGTAAGCAGCGTGGGTAACCTGCCAAAAGAGTG
GGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATAACCGCATAACAACAAAACCGCCTGGTTTTTTGTTTAAAA
GATGGTTTTCGGCTATCACTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTAAGGTAATGGCTTA
CCAAGGCAGTGATACGTAGCCGAACCTGAGAGGTTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCG
TGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACGTGTGTGAGAGTAACTGT
TCATGCAGTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGGCTGACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG
TAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAACAGGGAACGCACGGCGGTCTTTTAAGTCTGA
TGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGAAGTCGGTGCACCTTGAAACTGGGAGACTTGA

```

[dbj|AB289300.1](#) **Lactobacillus satsumensis** gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: JCM 12392  
Length=652

Score = 1014 bits (549), Expect = 0.0  
Identities = 575/586 (98%), Gaps = 8/586 (1%)  
Strand=Plus/Plus

```

Query 6     ACCGAGGAAACTGAGTGGCGAACGGGTGAGTAAGCAGCGTGGGTAACCTGCCAAAAGAG 65
          |||
Sbjct 39     ACCGAAGAAACTGAGTGGCGAACGGGTGAGTAA-CA-CGTGGGTAACCTGCCAAAAGAG 96

Query 66     TGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATAACCGCATAACAACAAAACCGCCTGGTTTT 125
          |||
Sbjct 97     -GGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATAACCGCATAACAACAAAACCGCCTGGTTTT 155

Query 126    TGTTTTAAAAGATGGTTTTCGGCTATCACTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTG 185
          |||
Sbjct 156    TGTTTTAAAAGATGGTTTTCGGCTATCACTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTG 215

Query 186    GTAAGGTAATGGCTTACCAAGGCAGTGATACGTAGCCGAACCTGAGAGGTTGATCGGCCAC 245
          |||
Sbjct 216    GTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAGTGATACGTAGCCGAACCTGAGAGGTTGATCGGCCAC 275

Query 246    ATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAA 305
          |||
Sbjct 276    ATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAA 335

Query 306    TGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAC 365
          |||
Sbjct 336    TGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAC 395

```

```

Query 366 TCTGTTGTTAGAGAAGAACGTGTGTGAGAGTAACTGTTTCATGCAGTGACGGTATCTAACC 425
          |||
Sbjct 396 TCTGTTGTTAGAGAAGAACGTGTGTGAGAGTAACTGTTTCATGCAGTGACGGTATCTAACC 455

Query 426 AGAAAGCCACGGGCTGACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTG 485
          |||
Sbjct 456 AGAAAGCCACGG-CTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTG 514

Query 486 TCCGGATTTATTGGGCGTAAACAGGGAACGCACGGCGGTCTTTTAAGTCTGATGTGAAAGC 545
          |||
Sbjct 515 TCCGGATTTATTGGGCGTAA-AGGGAACGCA-GCGGTCTTTTAAGTCTGATGTGAAAGC 572

Query 546 CTTCCGGCTTAACCGAAGTCGGTGCACCTGGAAACTGGGAGACTTGA 591
          |||
Sbjct 573 CTTCCGGCTTAACCGAAGTCG-TGCA-TTGGAAACTGGGAGACTTGA 616

```

**C02 (amostra 2P3 Reverse) C02 Placa\_33\_Seq\_170212 Run01 Cimarron  
3.12 440**

```

CCCAGGTTTCANTAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTTGTCACCGGCAG
TCTCACTAGAGTGCCCAACTAAATGCTGGCAACTAGTAATAAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTA
ACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCATTTTGTCCCGAAGGGAA
CGCCTGATCTCTCAGGTTAGCAAAGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCCAATTA
AACCACATGCTCCACCGGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTTCCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTCTG
AACTCCCCAGGCGGAATGCTTAATGGCGTTAAACTGCAGCACTTGAAAGGGCNGAAAACCTCCAACA
CTTAGCATTTCATCGTTTACAGGCGTGGACTACCAGGGG

```

[dbj|AB289300.1](#) **Lactobacillus satsumensis** gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: JCM 12392  
Length=652

Score = 824 bits (446), Expect = 0.0  
Identities = 463/470 (99%), Gaps = 5/470 (1%)  
Strand=Plus/Plus

```

Query 1 TTTTTGTTTAAAAGATGGTTTCGGCTATCACTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTA 60
          |||
Sbjct 152 TTTTTGTTTAAAAGATGGTTTCGGCTATCACTTTTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTA 211

Query 61 GTTGGTAAGGTAATGGCTTACCAAGGCAGTGATACGTAGCCGAAGTGAAGGTTGATCGG 120
          |||
Sbjct 212 GTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAGTGATACGTAGCCGAAGTGAAGGTTGATCGG 271

Query 121 CCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCC 180
          |||
Sbjct 272 CCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCC 331

Query 181 ACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTA 240
          |||
Sbjct 332 ACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTA 391

Query 241 AAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAACGTGTGTGAGAGTAACTGTTTCATGCAGTGACGGTATCT 300
          |||
Sbjct 392 AAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAACGTGTGTGAGAGTAACTGTTTCATGCAGTGACGGTATCT 451

Query 301 AACCAGAAAGCCACGGGCTGACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGC 360
          |||
Sbjct 452 AACCAGAAAGCCACGG-CTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGC 510

Query 361 GTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAACAGGGAACGCACGGCGGTCTTTTAAGTCTGATGTGA 420
          |||
Sbjct 511 GTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAA-AGGGAACGCA-GCGGTCTTTTAAGTCTGATGTGA 568

```

```

Query 421 AAGCCTTCGGCTTAACCGAAGTCGGTGCACCTTGAAACTGGGAGACTTGA 470
          |||
Sbjct 569 AAGCCTTCGGCTTAACCGAAGTCG-TGCA-TTGAAACTGGGAGACTTGA 616

```

**C04 (isolado 1Z Reverse) Placa\_011\_Seq\_121211 Run01 Cimarron 3.12**  
**654**

```

GTTACCTCATCCGGCTTTGGGTGNTTNACAAACTCTCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCC
GGGAACGTATTCACCGTGGCATGCTGATCCACGATTACTAGCGATTCCAAC TTCATGTAGGCGAGTT
GCAGCCTACAATCCGAAC TGAGAACGGCTTTAAGAGATTAGCTTGACCTCGCGGTTTCGCGACTCGT
TGTACCGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCC
ACCTTCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTTGCTAGAGTGCCCAACTAAATGCTGGCAACTAACAATA
AGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACATTAACCCAAGCATTCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCA
CCACCTGTCATTCTGTCCCCGAAGGGAACGCCTAATCTCTTAGGTTGGCAGAAGATGTCAAGACCTG
GTAAGGTTCTTCGCGTAGCATCGAATTAACCNACATGCTCCACCGCTTGTTGCAGGGCGCCCCGT
TTCAATTCCAATTTGAGTTTCATACTCTTGCGGTACGTACTGCCCCAGGCGGAGTTGCTTAATGTCC
GTTAGCCTGCAGCACTGAAGGGCGGAAACCTCCCAACACTTAGCACTCAT

```

[gb|HM218814.1](#) **Lactobacillus diolivorans** strain NM197-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Length=1412  
Score = 1059 bits (573), Expect = 0.0  
Identities = 631/654 (96%), Gaps = 23/654 (4%)  
Strand=Plus/Minus

```

Query 1 GTTACCTCATCCGGCTTTGGGTGNTTNACAAACTCTCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTAC 60
          |||
Sbjct 1411 GTTACCTCA-CCGGCTTTGGGTG-TT-ACAAACTCTCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTAC 1355

Query 61 AAGGCCCGGGAACGTATTCACCGTGGCATGCTGATCCACGATTACTAGCGATTCCAAC TT 120
          |||
Sbjct 1354 AAGGCCCGGGAACGTATTCACCGTGGCATGCTGATCCACGATTACTAGCGATTCCAAC TT 1295

Query 121 CATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAAC TGAGAACGGCTTTAAGAGATTAGCTTGA 180
          |||
Sbjct 1294 CATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAAC TGAGAACGGCTTTAAGAGATTAGCTTGA 1235

Query 181 CCTCGCGGTTTCGCGACTCGTTGTACCGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATA 240
          |||
Sbjct 1234 CCTCGCGGTTTCGCGACTCGTTGTACCGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATA 1175

Query 241 AGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTTGC 300
          |||
Sbjct 1174 AGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTTGC 1115

Query 301 TAGAGTGCCCAACTAAATGCTGGCAACTAACAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACATT 360
          |||
Sbjct 1114 TAGAGTGCCCAACTAAATGCTGGCAACTAACAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGAC-TT 1056

Query 361 AACCCAAGCATTCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCATTCTGTCC 420
          |||
Sbjct 1055 AACCCAA-CAT-CTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCATTCTGTCC 998

Query 421 CCGAAGGGAACGCCTAATCTCTTAGGTTGGCAGAAGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTT 480
          |||
Sbjct 997 CCGAAGGGAACGCCTAATCTCTTAGGTTGGCAGAAGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTT 938

Query 481 CGCGTAGCATCGAATTAACCNACATGCTCCACCGCTTGTTGCAGGGCGCCCCGTTTCA 540
          |||
Sbjct 937 CGCGTAGCATCGAATTAACCC--ACATGCTCCACCGCTTGT-GC-GGGC-CCCCGT--CA 885

```



```

Query 419  ATTCTGTCCCCGAAGGGAACACCTAATCTCTTAGGCTGTCAGAAGATGTCAAGACCTGGT 478
          |||
Sbjct 1004  ATTCTGTCCCCGAAGGGAACACCTAATCTCTTAGGCTGTCAGAAGATGTCAAGACCTGGT 945

Query 479  AAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACACATGCTCCACCG-TTGTGCGGGCCCCCGT 537
          |||
Sbjct 944  AAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGT 885

Query 538  CAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCAGTACTCCCCAGGCGGAATGCTTAATGCGTTA 597
          |||
Sbjct 884  CAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCAGTACTCCCCAGGCGGAATGCTTAATGCGTTA 825

Query 598  GCTGCAGCACCGAAGG-CGAAACCCTCCAACACTTAGCCATTCATCGTTTACGGTGTGG 656
          |||
Sbjct 824  GCTGCAGCACCGAAGGGCGAAACCCTCCAACACTTAGC-ATTCATCGTTTACGGTGTGG 766

Query 657  ACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTACCCACACTTTTCGGAACCTCAGCGTC-GTTA 715
          |||
Sbjct 765  ACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTACCCACACTTT-CG-AACCTCAGCGTCAGTTA 708

Query 716  CAGACCAGAGAAGCGG-TTCCGCCACTGGTTGTTCTTTCC-TATATTCTTTCGCATTTT 773
          |||
Sbjct 707  CAGACCAGAGA-GCCGCTTTC-GCCACTGGT-GTTCCTT-CCATATAT-CTA-CGCATTT- 655

Query 774  CACCGGTACACATGGGAGGTCCCACTCCTTCCTCATTCTGGCGCTCAAGTCTTT 827
          |||
Sbjct 654  CACCGGTACACATGG-AGTTC-ACTC-T-CCTC-TTCTG-CACTCAAGTCTTT 607

```

**E04 (isolado 12P Reverse)Placa\_011\_Seq\_121211 Run01 Cimarron 3.12  
639**

```

CGAAAGGTTACCTCACCGGCTTTGGGTGTTACAAACTCTCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAG
CCCGGGAACGTATTCACCGTGGCATGCTGATCCACGATTACTAGCGATTCCAACCTCATGTAGGCGA
GTTGCAGCCTACAATCCGAACCTGAGAACGGCTTTAAGAGATTAGCTTGACCTCGCGGTTTCGCGACT
CGTTGTACCGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATC
CCCACCTTCCTCCGTTTGTACCGGCAGTCTCGCCAGAGTGCCCAACTAAATGCTGGCAACTGACA
ATAAGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCA
CCACCTGTCAATCCCGTCCCCGAAGGGAACGCCTAATCTCTTAGGTTAGCAGAAGATGTCNAGACCTG
GTAAGGTTCTTCGCGTAGCATCGAATTAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATT
CCTTTGAGTTTCAACCTTGCAGTACTCCCCAGGCGGANTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTG
AAGGGCGGAAAAACCCTCCCAAACACTTAGCAACT

```

[\[NR\\_041468.1\]](#) *Lactobacillus parafarraginis* strain NRIC 0677 16S ribosomal RNA, partial sequence

Length=1556

Score = 1118 bits (605), Expect = 0.0

Identities = 624/633 (99%), Gaps = 5/633 (1%)

Strand=Plus/Minus

```

Query 4  AAGGTTACCTCACCGGCTTTGGGTGTTACAAACTCTCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTAC 63
          |||
Sbjct 1467  AAGGTTACCTCACCGGCTTTGGGTGTTACAAACTCTCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTAC 1408

Query 64  AAGGCCCGGGAACGTATTCACCGTGGCATGCTGATCCACGATTACTAGCGATTCCAACCT 123
          |||
Sbjct 1407  AAGGCCCGGGAACGTATTCACCGTGGCATGCTGATCCACGATTACTAGCGATTCCAACCT 1348

Query 124  CATGTAGCGGAGTTGCAGCCTACAATCCGAACCTGAGAACGGCTTTAAGAGATTAGCTTGA 183
          |||
Sbjct 1347  CATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAACCTGAGAACGGCTTTAAGAGATTAGCTTGA 1288

```









**Apêndice E:** Isolados bacterianos com um e dois amplicons do ITS-1 do rRNA, obtidos do meio MRS modificado com soro láctico, pertencentes aos grupos de 1 a 18. \*Isolados selecionados para o sequenciamento do gene 16S do rRNA. (NI – Não Identificado)

Grupos	Isolados	Identificação
1	12T, 13T, 3P*, 4P2II, 5PI, 5PII, 7P3, 10P3, 16P2, 17P3*, 20P, 20P2, 21P, 22P3, 23P2, 24P, 24P3, 25P2, 25P3, 1U, 3U1, 4U, 4U1, 4U2, 6U, 5Z, 3R, 4R1*	<i>Lactococcus lactis</i>
2	22P*, 2U*, 3U*	<i>Lactococcus lactis</i>
3	1U1*, 5U*, 24P2*	<i>Lactococcus lactis</i>
4	2U1*	<i>Lactococcus lactis</i>
5	5U1*	<i>Lactococcus lactis</i>
6	2U2*	<i>Lactococcus lactis</i>
7	1R*	<i>Lactococcus lactis</i>
8	9U*, 9U2, 10U1*, 10U2, 11U*, 11U1, 11U2, 12U, 12U1, 13U1, 13U2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
9	10U*	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
10	12U2*, 13U*, 14U*	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
11	7U*	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
12	4R2*	<i>Oenococcus oeni</i>
13	2R*	NI
14	9U1*	NI
15	2Z*	NI
16	4Z*	NI
17	7P1*	NI
18	3Z*	NI