

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS PROVENIENTES DE KEFIR

PAOLA VALENTE RODRIGUES¹; MARINA VIEIRA FOUCHY²; HELENA REISSIG
SOARES VITOLA³; KHADIJA BEZERRA MASSAUT⁴; CLÁUDIO EDUARDO DOS
SANTOS CRUXEN⁵; ANGELA MARIA FIORENTINI⁶

¹Universidade Federal de Pelotas- paolarodrigues.sls@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas-marinavieira01@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas- helena_rsv@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas-khadijamassaut@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas-cbrcruxen@hotmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas-angefiore@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O kefir é um leite fermentado considerado um alimento probiótico, pois é produzido por um grupo de microrganismos, predominantemente de bactérias ácido-láticas (BAL) e de leveduras, podendo conter bactérias ácido-acéticas, estando todos suspensos em uma matriz de polissacarídeos e proteína, coexistindo em uma associação simbiótica (BERGMANN, et.al., 2010). Os microrganismos presentes em diferentes fermentações podem diferir uns dos outros, entretanto algumas espécies estão sempre presentes, entre as quais bactérias dos gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcuse Leuconostoc* (FARNWORTH; MAINVILLE, 2008).

Os produtos da fermentação do kefir são, predominantemente derivado das fermentações lácticas por BAL, apresentando alguns fenótipos típicos como, gram-positivos, geralmente não móveis, não esporulados, catalase negativa, anaeróbios aerotolerantes, fastidiosos, ácido-tolerantes e estritamente fermentadores, sendo o ácido láctico, o principal produto final da fermentação de açúcares (LOPITZ-OTSOA et.al., 2006).

Diversos estudos sobre kefir, têm sido realizados e, muitos desses relatam os aspectos benéficos que esta bebida oferece ao organismo humano, que derivam muito da constituição e dos microrganismos presentes nos grãos destacando-se as bactérias ácido-láticas, conhecidas por suas propriedades probióticas e por sua utilização na produção de alimentos.

O isolamento e a seleção de bactérias que se enquadram nesse perfil, tanto quanto o desenvolvimento de processos fermentativos que garantam uma boa produção, são de grande importância para a pesquisa e desenvolvimento de novos produtos (FARNWORTH; MAINVILLE, 2008). Assim, no presente trabalho objetivou-se isolar e caracterizar bactérias ácido-láticas provenientes de kefir.

2. METODOLOGIA

O estudo foi realizado no Laboratório de Processamento de Produtos de Origem Animal (LPOA)/UFPEl, onde obteve-se quatro amostras de grãos de kefir, sendo três destas procedentes da região de Pelotas (KA, KF e KK) e uma proveniente da cidade de Rio Grande (KH). A primeira etapa consistiu em submeter as amostras a fermentação com propósito de obter o kefir de leite utilizando leite UHT (Ultra High Temperature) integral (Santa Clara®) em temperatura ambiente (≈ 23°C), vidros esterilizados (capacidade de 250 mL), cobertos com papel toalha, para que os microrganismos realizem os processos metabólicos, e acondicionados em caixa de isopor por aproximadamente 48h.

Isolamento

Após as fermentações iniciou-se o isolamento, seguindo a metodologia proposta por EDALATI et. al. (2019), com modificações. Assim, pesou-se 25 g do kefir de leite e adicionou-se a 225 mL de água peptonada (AP) (Acumedia) 0,1%. A partir da diluição inicial (10^{-1}) foram feitas diluições decimais seriadas em AP 0,1% até 10^{-6} , com o intuito de obter-se colônias isoladas durante o crescimento em placas. Utilizando ágar MRS (De Man, Rogosa & Sharpe) (Acumedia), plaqueou-se em superfície (duplicata) as diluições a partir de 10^{-3} e, em seguida, as placas foram incubadas a 37 °C por 72h, em anaerobiose. Depois, selecionou-se aleatoriamente, 10 colônias de cada amostra (KA, KF, KK e KH), considerando características morfológicas definidas, (brancas, leitosas, brilhosas, formato arredondado, bordas regulares, sem presença de halos e de tamanho pequeno). Em seguida, essas colônias foram repicadas para placas contendo ágar MRS, pela técnica de estriamento, com a finalidade de purificá-las. O processo de purificação foi repetido por três vezes.

Caracterização dos isolados

Inicialmente, realizou-se análise de catalase e coloração de Gram segundo metodologia proposta por HOLT (1994) objetivando selecionar isolados Gram-positivos e catalase negativa (características de BAL). Após a obtenção dos isolados purificados, foram realizados testes tecnológicos (tolerância a pH 4,5 e 8,0, temperatura de 8 °C e 45 °C, concentração salina de 3% e 9%, produção de exopolissacarídeos e perfil fermentativo), seguindo metodologia proposta por LIMA et. al., (2009). Todos os testes tecnológicos foram realizados a partir dos isolados, previamente, ativados em caldo MRS por 18 h a 37 °C, em anaerobiose.

Testes de segurança

Conforme proposto por KATEETE et al. (2010), foi realizado o teste de DNase, a partir da inoculação dos isolados cultivados anteriormente em caldo MRS por 18h a 37 °C, em anaerobiose, para o ágar DNase (Acumedia) pela técnica de gota. As placas foram incubadas a 37 °C por 48h e para realizar a leitura dos resultados foi utilizada a solução de ácido clorídrico (HCl) na concentração de 1 N. Halos transparentes ao redor dos isolados denotariam resultado positivo para produção da enzima DNase. Para controles positivo e negativo foram utilizadas cepas de *S. aureus* ATCC 25923 e AP 0,1% esterilizada, respectivamente. A atividade da enzima gelatinase foi determinada em meio de cultura preparado com 1% de extrato de levedura, 1,5% de triptona de soja e 12% de gelatina. Os isolados, previamente, ativados em caldo MRS por 18h a 37 °C, em anaerobiose, foram transferidos para o meio pela técnica de semeadura por picada. Os tubos foram incubados a 30 °C por sete dias, e no sétimo dia foram mantidos sob refrigeração (8 °C) por 30 minutos. O resultado observado a partir da mudança do estado físico do meio de cultivo (sólido para líquido) significaria que a enzima apresenta atividade positiva. Como controles positivo e negativo foram utilizadas as cepas de *S. aureus* ATCC 25923 e AP 0,1% esterilizada, respectivamente (PEREIRA et al., 2009).

Para a realização da atividade hemolítica seguiu-se o proposto por EATON; GASSON (2001), onde a presença de hemolisina foi determinada após o cultivo dos isolados em caldo MRS por 18h a 37 °C, em anaerobiose. Os isolados foram transferidos para ágar Trypticase Soy (TSA) (Himedia) previamente suplementado com 7% de sangue equino desfibrinado. Como resultado, após a incubação das placas por 24 h a 37 °C, a atividade hemolítica foi avaliada através do aparecimento

de zonas verdes ao redor dos isolados, caracterizando lise parcial dos glóbulos vermelhos (α -hemólise), bem como a lise total (β -hemólise), se houvesse aparecimento de zonas transparentes ao redor das colônias. Foi utilizada como controle positivo a cepa de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 e negativo, AP 0,1% esterilizada.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 40 isolados submetidos a avaliação fenotípica de catalase e coloração de Gram, apenas 13 prosseguiram para os demais testes. Os resultados da caracterização tecnológica podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1- Testes tecnológicos quanto tolerância a pH, temperatura e concentração de NaCl dos isolados procedentes de kefir

Isolado	pH		Temperatura (°C)		NaCl (%)	
	4,5	8,0	8 °C	45 °C	3%	9%
A10	+	-	-	+	-	-
F1	+	-	-	+	-	-
F7	+	-	-	+	-	-
H1	-	-	-	+	+	-
H3	-	+	+	+	+	-
H7	+	-	-	+	+	-
H9	+	+	-	+	+	+
H10	+	-	-	+	+	-
K1	-	-	-	+	+	+
K2	+	-	-	+	+	-
K4	+	-	-	+	+	-
K5	+	-	+	+	+	+
K8	+	+	+	+	+	-

(+): caldos turvados indicando multiplicação da bactéria; (-): caldo límpido indicando não multiplicação da bactéria

Os testes tecnológicos buscam verificar a viabilidade dos microrganismos de serem aplicados no desenvolvimento de diferentes produtos (FARNWORTH; MAINVILLE, 2008). Com isso, observa-se (Tab.1) que 84,61% dos isolados resistiram e cresceram em pH 4,5 e 23,07% multiplicaram-se em temperatura de 8°C e na totalidade (100%) a 45°C. Dentre os isolados, 92,30% manifestaram resistência a concentração de 3% de NaCl, características inerentes ao produto e/ou no processamento de muitos derivados lácteos e carnes.

Sobre a produção de exopolissacarídeos, somente o isolado H3 apresentou essa capacidade, muito importante na textura de leites fermentados e o mesmo isolado possui perfil heterofermentativo, indesejável para a produção de iogurte e embutidos cárneos devido a produção de CO₂ no produto final, mas característica própria do kefir.

Os isolados A10, F1, F7, H1, H7, H9, H10, K1, K2, K4, K5 e K8 apresentaram perfil homofermentativo, caracterizado pela produção de ácido láctico, como produto final da fermentação de carboidratos e não produção de CO₂, um aspecto desejável para a produção da maioria dos derivados lácteos e embutidos cárneos.

Em relação aos testes de segurança, estes baseiam-se na avaliação de fatores de virulência que indicam se o isolado possui um perfil patogênico sendo indesejáveis na aplicação em alimentos. Dentre os fatores que determinam a virulência de bactérias, estão a resistência à determinados antimicrobianos, a presença de enzimas extracelulares DNase, gelatinase, termonuclease e hemolisina (EATON; GASSON, 2001). Dessa forma, quanto aos testes de segurança, todos os

isolados apresentaram gelatinase negativa, no entanto para DNase e α -hemólise, os isolados H9, K1, K4, K5 e K8, foram positivos. Dessa forma os isolados, A10, F1, F7, H1, H3, H7, H10 e K2 apresentaram características tecnológicas positivas e resultados negativos para os fatores de virulência.

4. CONCLUSÃO

Os isolados de BAL procedentes do kefir possuem características tecnológicas favoráveis, contudo a presença da enzima DNase e de α -hemolisina, indica que alguns destes isolados não devem ser aplicados em novos produtos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERGMANN, R. S. D. O.; PEREIRA, M. A.; VEIGA, S. M. O. M.; SCHNEEDORF, J. M.; OLIVEIRA, N. D. M. S.; FIORINI, J. E. Microbial profile of a kefir sample preparations: grains in natura and lyophilized and fermented suspension. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 30, n. 4, p. 1022-1026, 2010.
- EATON, T. J.; GASSON, M. J. Molecular Screening of *Enterococcus* Virulence Determinants and Potential for Genetic Exchange between Food and Medical Isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, United Kingdom, v. 67, n. 4, p. 1628-1635, 2001.
- EDALATI, E.; SANEEI, B.; ALIZADEH, M.; HOSSEINI, S. S.; BIALVAEI, A. Z.; TAHERI, K. Isolation of probiotic bacteria from raw camel's milk and their antagonistic effects on two bacteria causing food poisoning. **New Microbes and New Infections**, Iran, v. 27, n. 4, p. 64-68, 2019.
- FARNWORTH, E. R.; MAINVILLE, I. Kefir- A Fermented Milk Product. In: FARNWORTH, E. R. (Ed.). **Handbook of Fermented Functional Foods**. Boca Raton, London, New York: CRC Press Taylor & Francis Group, 2008. Cap. 4, p.89-127.
- HOLT, J. G. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. LWW; In: HOLT, J.G. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. Baltimore: Lippincott Williams and Wilkins, 1994, Cap.1, p. 3-14.
- KATEETE, D. P.; KIMANI, C. N.; KATABAZI, F. A.; OKENG, A.; OKEE, M. S.; NANTEZA, A.; JOLOBA, M. L.; NAJJUKA, F. C. Identification of *Staphylococcus aureus*: DNase and Mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, England, v. 9, n.1, p. 23, 2010.
- LIMA, K. G. de C.; KRUGER, M. F.; BEHRENS, J.; DESTRO, M. T.; LANDGRAF, M., GOMBOSSY, B. D. M. de F. Evaluation of culture media for enumeration of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium animalis* in the presence of *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. **LWT - Food Science and Technology**, Switzerland, v. 42, n. 2, p. 491-495, 2009.
- LOPITZ-OTSOA, F.; REMENTERIA, A.; ELGUEZABAL, N.; GARAIZAR, J. Kefir: A symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. **Revista Iberoamericana de Micología**, Spain, v. 23, n. 2, p. 67-74, 2006.
- PEREIRA, V.; LOPES, C.; CASTRO, A.; SILVA, J.; GIBBS, P.; TEIXEIRA, P. Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods. **Food Microbiology**, Portugal, v. 26, n.3, p. 278-282, 2009.