

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

FERNANDA MINCEV ANTONIASSI

**IDENTIFICAÇÃO PRESUNTIVA DE LEVEDURAS DE
INTERESSE BIOTECNOLÓGICO EM GRÃOS DE
KEFIR**

BAURU
2016

FERNANDA MINCEV ANTONIASSI

**IDENTIFICAÇÃO PRESUNTIVA DE LEVEDURAS DE
INTERESSE BIOTECNOLÓGICO EM GRÃOS DE
KEFIR**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Centro de Ciências da
Saúde como parte dos requisitos para
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina, sob orientação da Prof^ª. Dra.
Geisiany Maria de Queiroz-Fernandes.

BAURU
2016

A6352i

Antoniassi, Fernanda Mincev

Identificação presuntiva de leveduras de interesse biotecnológico em grãos de Kefir / Fernanda Mincev Antoniassi. -- 2016.

47f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Geisiany Maria de Queiroz-Fernandes.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Universidade do Sagrado Coração - Bauru - SP

1. Kefir. 2. Leveduras. 3. Biotecnologia. I. Queiroz-Fernandes, Geisiany Maria de. II. Título.

FERNANDA MINCEV ANTONIASSI

**IDENTIFICAÇÃO PRESUNTIVA DE LEVEDURAS DE INTERESSE
BIOTECNOLÓGICO EM GRÃOS DE KEFIR**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina, sob orientação da Prof^a. Dra. Geisiany Maria de Queiroz-Fernandes.

Banca examinadora:

Prof^a. Dra. Eliane Maria Ravasi Stefano Simionato
Universidade do Sagrado Coração

Prof^a. Dra. Geisiany Maria de Queiroz-Fernandes
Universidade do Sagrado Coração

Bauru, 24 de outubro de 2016.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais e amigos que sempre me apoiaram para que eu pudesse alcançar meus objetivos, e principalmente a Deus que iluminou meu caminho e me deu forças para lutar e chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus que me deu força e coragem durante todos os anos de graduação e durante a minha vida para que eu chegasse até aqui.

À Prof^a. Dra. Geisiany Maria de Queiroz-Fernandes que, com paciência, empenho e confiança, me orientou compartilhando conhecimentos e acompanhando cada passo para eu chegar onde cheguei, e também por ser uma excelente profissional na qual me espelho.

Agradeço a todos os professores que ao longo de todo o curso não mediram esforços para ensinar e transmitir conhecimentos, contribuindo para a minha formação pessoal e profissional.

À minha família, pois sem eles, não conseguiria enfrentar as dificuldades que sempre estiveram presentes. À minha mãe, Elisangela, que me deu forças e bons conselhos fortalecendo minha vontade de seguir em frente. À meu pai, Robson, que acreditou em mim mostrando que eu não estaria sozinha nessa jornada. Ao meu irmão, Matheus, que me ajudou a ter paciência nas situações mais difíceis. Ao meu namorado Fellipe e todos os amigos presentes em minha vida que dividiram comigo todos os sentimentos bons e ruins me incentivando a nunca desistir.

Agradeço à Universidade do Sagrado Coração juntamente com os coordenares, corpo docente e administração, que me deram a oportunidade e me ajudaram a realizar um dos meus sonhos de completar um curso de nível superior.

Às funcionárias Fabiane e Lígia do Laboratório de Biociências pelo apoio, sempre oferecendo ajuda sem pedir nada em troca.

Enfim, agradeço a todos aqueles que contribuíram de forma direta ou indiretamente para a minha formação.

“Jamais desista das pessoas que ama. Jamais desista de ser feliz. Lute sempre pelos seus sonhos. Seja profundamente apaixonado pela vida. Pois a vida é um espetáculo imperdível.”

(Augusto Cury)

RESUMO

Kefir é uma bebida resultante da fermentação de açúcares na presença dos grãos de kefir ricos em micro-organismos que vivem em simbiose em uma matriz de polissacarídeos, tornando a bebida probiótica, capaz de trazer benefícios à saúde do consumidor. A vasta população microbiana presente nos grãos, incluindo leveduras e bactérias, oferece diversas características únicas à bebida. Além disso, estudos apontam que o Kefir possui efeitos antitumorais, anti-inflamatórios, antimicrobiano, modulatório do sistema imune, anticolesterolêmico, dentre outros. Diante disso, o objetivo deste estudo foi isolar e identificar, presuntivamente, leveduras dos grãos de Kefir. Para tanto, se utilizou grãos obtidos na região de Bauru, mantidos em fermentação na água com açúcar mascavo e leite. Após este período, os grãos foram triturados e semeados em o ágar Sabouraud com cloranfenicol. Os isolados com características macroscópicas leveduriformes e de crescimento rápido a 25-30°C foram analisados por exame direto, realizando-se ainda a prova do tubo germinativo, zimograma e prova da ureia. Os dados obtidos foram comparados com atlas micológicos e chaves de identificação. No total foram isoladas 6 colônias diferentes e notou-se a presença de espécies do gênero *Candida* sp. e *Sacharomyces* sp. Essas leveduras são de grande relevância para os processos biotecnológicos.

Palavras- chave: Kefir, leveduras, biotecnologia

ABSTRACT

Kefir is a beverage resulting from fermentation of sugars in the presence of kefir grains rich in microorganisms that live in symbiosis in a polysaccharide matrix making probiotic drink, able to bring benefits to consumer health. The vast microbial population present in grains, including yeasts and bacteria, offers several unique features to drink. Moreover, studies indicate that the kefir has antitumor effects, anti-inflammatory, antimicrobial, modulatory immune system, anticholesterolemic, among other. Thus, the aim of this study was to isolate and identify, presumptively, yeast from kefir grains. For that it was used grains obtained in Bauru, held fermenting in water with brown sugar and milk. After this period, the grains were crushed and plated on Sabouraud agar with chloramphenicol. Isolated with macroscopic characteristics yeast and rapid growth at 25-30°C were analyzed by direct examination, carrying out further proof of the germ tube, zymogram and proof of ureia. The data were compared with mycological atlas and identification keys. A total of 6 different colonies isolated and noted the presence of species of the genus *Candida* sp. and *Saccharomyces* sp. These yeasts are of great relevance to biotechnological processes.

Keywords: Kefir, yeasts, biotechnology

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura macroscópica dos grãos de Kefir.....	16
Figura 2: Microscopia eletrônica dos grãos de Kefir. Em A : bactérias longas e curtas. Em B : Kefiran (1) e leveduras (2). Em C e D : bactérias.....	18
Figura 3: Microscopia eletrônica dos grãos de Kefir. Em A : proteína coagulada (1) e diferentes espécies de leveduras (2). Em B : bactérias na porção externa do grão. Em C : bactérias e leveduras no porção externa do grão. Em D : bactérias na porção interna do grão.	19
Figura 4: Aspecto macroscópico dos grãos de Kefir cultivados em leite integral UHT e açúcar mascavo, respectivamente.	25
Figura 5: Ágar Sabouraud com cloranfenicol sendo dissolvido em agitador magnético sob aquecimento	25
Figura 6: Grãos de Kefir sendo macerados.....	26
Figura 7: Colônias produtoras de gás	27
Figura 8: Filtração da solução de maltose.....	28
Figura 9: Colônia 1 – Leveduras isoladas dos grãos cultivados em água com açúcar mascavo	30
Figura 10: Colônia 2 – Leveduras isoladas dos grãos cultivados em água com açúcar mascavo	30
Figura 11: Colônia 3 – Leveduras isoladas dos grãos cultivados em água com açúcar mascavo	31
Figura 12: Colônia 4 – Leveduras isoladas dos grãos cultivados em leite	31
Figura 13: Colônia 5 – Leveduras isoladas dos grãos cultivados em leite	32
Figura 14: Colônia 6 – Leveduras isoladas dos grãos cultivados em leite	32
Figura 15: Identificação presuntiva de <i>Candida glabrata</i> - A : exame direto da colônia 1 (água com açúcar mascavo) no aumento de 40x; B : atlas microumftgm.....	Erro!
Indicador não definido.	
Figura 16: Identificação presuntiva de <i>Sacharomyces cerevisiae</i> - A : exame direto da colônia 2 (água com açúcar mascavo) no aumento de 40x; B : atlas eureka brewing.wordpress	33
Figura 17: Identificação presuntiva de <i>S. cerevisiae</i> - A : exame direto da colônia 3 (água com açúcar mascavo) no aumento de 40x; B : atlas eureka brewing.wordpress	33

Figura 18: Identificação presuntiva de <i>S. cerevisiae</i> - A : exame direto da colônia 4 (leite) no aumento de 40x; B : atlas eureka brewing.wordpress.....	34
Figura 19: Identificação de <i>S. cerevisiae</i> - A : exame direto da colônia 5 (leite) no aumento de 40x; B : atlas The Virtual Edge (uwo.edu)	34
Figura 20: Identificação presuntiva de <i>Candida krusei</i> - A : exame direto da colônia 6 (leite) no aumento de 40x; B : atlas microumftgm.....	34
Figura 21: Quadro, modificado, de identificação das principais leveduras de interesse clínico. (Gli: glicose; Sac: sacarose; Lac: lactose; Gal: galactose; Tre: trealose; Mal: maltose; Cap: cápsula; Tg: tubo germinativo; U: ureia).....	36
Figura 22: Prova do tubo germinativo no aumento de 40x - 1 : colônia 1; 2 : colônia 2; 3 : colônia 3; 4 : colônia 4; 5 : colônia 5; 6 : colônia 6	37

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Fungos de interesse biotecnológico	14
Tabela 2: Resultados do zimograma, prova da ureia e tubo germinativo e interpretação das possíveis espécies de leveduras	35
Tabela 3: Exemplos de proteínas heterólogas secretadas por <i>S. cerevisiae</i>	40

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 FUNGOS DE INTERESSE BIOTECNOLÓGICO	13
2.2 BEBIDA KEFIR.....	15
2.4 COMPOSIÇÃO MICROBIOLÓGICA	17
2.5 BENEFÍCIOS DO KEFIR	19
2.5.1 Atividade antimicrobiana	19
2.5.2 Efeitos antitumorais	20
2.5.3 Estimulação do sistema imunológico	20
2.5.4 Efeito hipotensivo e hipercolesterolêmico	21
2.5.5 Intolerância a lactose	21
2.5.6 Impacto no trato gastrointestinal	22
3 OBJETIVOS	23
3.1 OBJETIVO GERAL.....	23
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
4 MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 MATERIAIS	24
4.2 METODOLOGIA.....	24
4.2.1 Cultivo dos grãos de Kefir	24
4.2.2 Preparação do material para isolamento das leveduras dos grãos de Kefir	25
4.2.3 Isolamento das leveduras dos grãos de Kefir.....	26
4.2.5 Identificação presuntiva das leveduras	27
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
6 CONCLUSÃO	41
REFERÊNCIAS	42

1 INTRODUÇÃO

Kefir, originada da palavra turca *keyif*, é uma bebida resultante da fermentação do leite com grãos de Kefir ricos em micro-organismos que vivem em simbiose em uma matriz de polissacarídeos conhecida como “kefiran” que se forma durante o crescimento celular sob condições aeróbicas. Devido a essa simbiose e aos componentes bioativos resultantes do metabolismo microbiológico, a bebida torna-se probiótica, trazendo benefícios à saúde do consumidor (GUZEL-SEYDIM et al., 2011; WESCHENFELDER et al., 2011; LEITE et al., 2013; NIELSEN et al., 2014; PRADO et al., 2015).

Os grãos de Kefir são irregulares, podendo ser brancos ou amarelados. Sua população microbiológica varia de acordo com a região, as técnicas de manipulação utilizadas e o substrato empregado. O tempo de uso também tem influência, já que o mesmo grão pode ser reutilizado infinitas vezes para novas fermentações. Devido a essa característica, os grãos não são comercializados e sim doados de pessoa para pessoa. A fermentação utilizando esses grãos pode ser feita com água, açúcar mascavo e vários tipos de leite como o de vaca, ovelha, coco e soja, sendo o primeiro o mais comum (MAGALHÃES et al., 2011; LEITE et al., 2013).

A vasta população microbiana presente nos grãos, incluindo leveduras do gênero *Kluyveromyces*, *Candida*, *Saccharomyces* e bactérias do gênero *Lactobacillus*, oferece à bebida gosto ácido, baixo teor alcoólico, consistência cremosa e um efeito efervescente na boca, características únicas do Kefir. Além disso, são os responsáveis pela produção de ácido lático, etanol, gás carbônico, diacetil, acetaldeído, etil e aminoácidos, que contribuem na constituição do sabor típico da bebida. Com a presença de vitaminas, minerais e aminoácidos essenciais, o Kefir torna-se um alimento importante na manutenção das funções vitais do organismo, bem como na digestão completa de proteínas. Além desses benefícios, estudos mostram que a bebida possui efeitos antitumorais, anti-inflamatórios, antimicrobiano, modulação do sistema imune intestinal, reduz os níveis de colesterol e melhora a digestão da lactose (MAGALHÃES et al., 2011; AHMED et al., 2015).

Na área biotecnológica, os grãos de Kefir são pesquisados com o objetivo de emprega-los na produção de pães e queijos em larga escala e na produção de ácido lático utilizando outros tipos de substratos como o soro de queijo, por exemplo, um dos maiores subprodutos das indústrias de laticínios (PLESSAS et al., 2011).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FUNGOS DE INTERESSE BIOTECNOLÓGICO

Biotecnologia é um conjunto de ciências como a Bioquímica, Biofísica, Fisiologia, Genética, Microbiologia, Virologia, Parasitologia, Imunologia, Engenharias, entre outras, trabalhando junto com a tecnologia para a produção de produtos úteis ou para a resolução de problemas. De modo geral, a biotecnologia utiliza seres vivos ou partes funcionais dos mesmos como catalisadores e/ou reagentes em uma produção industrial. Segundo a European Federation of Biotechnology, 1988 (EFB), biotecnologia é o “uso integrado da bioquímica, da microbiologia e da engenharia para conseguir aplicar as capacidades de micro-organismos, células cultivadas animais ou vegetais ou parte dos mesmos na indústria, na saúde e nos processos relativos ao meio ambiente”. Segundo a Biotechnology Industry Organization, 2003 (BIO), a biotecnologia, em sentido amplo, é “‘Bio’ + ‘tecnologia’, isto é, o uso de processos biológicos para resolver problemas ou gerar produtos úteis” (CARVALHO, 1993; MALAJOVICH, 2012).

Esse conjunto de ciências aliadas a tecnologia tem como principal objetivo criar produtos que melhorem a qualidade de vida da população, desenvolvendo por exemplo, plantas resistentes a doenças, plásticos biodegradáveis, detergentes mais eficientes, biocombustíveis, novos fármacos, dentre muitos outros. Por isso, a biotecnologia é de suma importância para a sociedade na investigação e inovação tecnológica (MALAJOVICH, 2012).

Leveduras são fungos unicelulares e foram os primeiros micro-organismos utilizados em processos alimentares pelo homem, marcando o primeiro passo da biotecnologia. Atualmente são conhecidas cerca de 1500 espécies de leveduras, sendo que as de maior interesse biotecnológico são *Saccharomyces*, *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*, *Yarrowia lipolytica*, *Pichia stipitis* e *Kluyveromyces marxianus* (MATTANOVICH et al., 2014).

Saccharomyces cerevisiae é uma das principais leveduras já estudadas e utilizadas em larga escala para a produção de insulina humana, na fermentação alcoólica, na produção do bioetanol e na expressão de proteínas recombinantes. No ano de 2009, muitos produtos biofarmacêuticos aprovados na Europa e Estados Unidos da América (USA) foram produzidos na *S. cerevisiae*. Além dessa levedura, muitos outros fungos filamentosos são interessantes e importantes devido a

facilidade de cultivo e a alta produção de enzimas extracelulares potenciais para a indústria, cuja aplicabilidade está presente em diversos segmentos industriais como mostra a Tabela 1 (GUIMARÃES et al., 2006; MATTANOVICH et al., 2014; KAVSCEK et al., 2015).

Tabela 1: Fungos de interesse biotecnológico

Fungos	Produto Principal	Aplicação
<i>Aspergillus niger</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Cryptococcus ssp</i> , <i>Mrakia blollopis</i>	Amilase	Melhorador de massas; produção de xaropes; produção de bebida alcoólica; indústrias farmacêutica e química
<i>Aspergillus niger</i> , <i>Trichoderma reesei</i> , <i>Cryptococcus laurentii</i> , <i>Cryptococcus nemorosus</i>	Celulase	Preparação de concentrados líquidos de café; clarificação de sucos; produção de combustível; indústrias de materiais de limpeza
<i>Aspergillus niger</i>	Glicose oxidase	Eliminação de glicose dos sólidos do ovo
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Invertase	Mel artificial
<i>Saccharomyces fragilis</i>	Lactase	Hidrólise da lactose
<i>Aspergillus niger</i> , <i>Rhizopus ssp</i> , <i>Mucor ssp</i> , <i>Mrakia blollopis</i> , <i>Cryptococcus ssp</i> , <i>Trichosporon pullulans</i>	Lipase	Sabor ao queijo; aditivo em detergentes.
<i>Aspergillus niger</i> , <i>Rhizopus ssp</i> , <i>Penicillium</i>	Pectinase	Clarificação de vinho e de sucos de fruta
<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>Pichia pastoris</i>	Protease	Clarificação de cerveja; amaciamento de carne; indústrias de medicamentos
<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	Astaxantina	Pigmento antioxidante usado na hidrocultura; cosméticos

Fonte: MONTEIRO E SILVA (2009), modificado; CONTRERAS et al. (2015); ALCAÍNO et al. (2015)

2.2 BEBIDA KEFIR

Segundo a Organização Mundial da Saúde e a Organização das Nações Unidas, probiótico é “um suplemento alimentar microbiano vivo que afeta benéficamente o hospedeiro além de corrigir as deficiências nutricionais, melhorando o equilíbrio intestinal”, ou ainda, “micro-organismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo”, de acordo com a RDC n. 02/2002 da ANVISA. Datada de mais mil anos, a bebida Kefir tem origem nas montanhas de Cáucaso na Ásia central e em virtude dos inúmeros benefícios à saúde que esta apresenta, é considerada um alimento probiótico com componentes bioativos capazes de assegurar a manutenção do organismo. Devido a isso a bebida vem sendo consumida diariamente nos hospitais da Rússia ajudando na recuperação de pacientes com doenças digestivas (FAO/WHO 2001; ANVISA 2002; BERGMANN et al., 2010; LEITE et al., 2013; NIELSEN et al., 2014; MIGUEL et al., 2012; AHMED et al., 2015).

Através de vários estudos feitos sobre a bebida, pode-se dizer que o Kefir possui muitas propriedades probióticas, por isso vem sendo utilizado e consumido cada vez mais (SANTOS et al., 2012; NIELSEN et al., 2014).

A bebida pode ser preparada utilizando água, açúcar mascavo e vários tipos de leite como o de vaca, ovelha, coco e soja. A fermentação a partir dos grãos de Kefir ocorre por aproximadamente 24 horas à temperatura de 25°C (MAGALHÃES et al., 2011; WESCHENFELDER et al., 2011; NIELSEN et al., 2014).

Os grãos de Kefir são irregulares, de aspecto visual semelhante à couve-flor, coral, queijo cottage, arroz cozido ou pipoca e podem ser brancos ou amarelados (Figura 1). Além disso, são elásticos, viscosos e de textura firme. Sua população microbiológica varia de acordo com a região, as técnicas de manipulação utilizadas e o substrato empregado, podendo ser reutilizados em novas fermentações. Com uma impressionante entidade biológica envolta por uma matriz de polissacarídeo, os grãos de Kefir podem medir de 0,3 a 3,5 cm de diâmetro e são compostos também por água, lipídeos, proteínas, açúcar e cinzas. (BERGMANN et al., 2010; GUZELSEYDIM et al., 2011; MAGALHÃES et al., 2011; WESCHENFELDEN et al., 2011; LEITE et al., 2013; AHMED et al., 2015; PRADO et al., 2015).



Figura 1: Estrutura macroscópica dos grãos de Kefir

Fonte: Leite et al. (2013)

Esses grãos tem sido muito utilizados na fabricação de pão tipo Sourdough e na produção de queijo tipo Feta, melhorando as características sensoriais desses produtos assim como as propriedades gerais e a vida útil na prateleira. Plessas et al. (2012) demonstraram que o Kefir imobilizado em grãos de milho funciona como um biocatalizador potente na fermentação do soro de queijo para obtenção do ácido lático e na fabricação de pão Sourdough, revelando características biotecnológicas importantes para aplicações na indústria de alimentos. Essa capacidade em produzir ácido lático a partir de um dos principais resíduos orgânicos das indústrias de laticínios (soro de queijo), mostra a habilidade do Kefir em alcançar benefícios ambientais para gerar um produto de valor agregado (PLESSAS et al., 2011; PLESSAS et al., 2012; MANTZOURANI et al., 2014).

Dimitrellou et al. (2015) revelaram que o Kefir aprisionado em caseína e proteínas do soro do leite pode ser empregado como culturas iniciantes para a produção do queijo tipo Feta, um dos produtos lácteos mais populares na região da Grécia. Além disso, foram realizadas análises microbiológicas mostrando a redução significativa na contagem de Enterobactérias (coliformes) e *Staphilococcus* ssp. devido a cultura do Kefir, aumentando assim a vida útil do produto e reduzindo o aparecimento de deteriorização por micro-organismos indesejáveis em um curto

período de tempo, revelando claramente as vantagens de utilizar os grãos de Kefir na produção de pão e queijo (PLESSAS et al., 2011; DIMITRELLOU et al., 2015).

2.4 COMPOSIÇÃO MICROBIOLÓGICA

Kefir é rico em micro-organismos predominantemente constituído por leveduras e bactérias em quantidades variadas. Foram identificados 359 espécies de micro-organismos na bebida Kefir no Brasil na região de Lavras, Minas Gerais. Cerca de 250g de grãos foram lavados com água destilada e inoculados em leite pasteurizado, sendo posteriormente incubados e fermentados por quatro vezes. Dentre as espécies encontradas, 60.5% eram bactérias ácido lácticas, 30.6 % leveduras e 8.9% bactérias acéticas, no entanto as condições de fermentação podem afetar esse padrão (MAGALHÃES et al., 2011; AHMED et al., 2015).

Conforme descrito anteriormente, espécies de bactérias lácticas como *Lactobacillus paracasei*, *L. parabuchneri*, *L. casei*, *L. kefir*, *L. lactis*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. kefirifaciens*, *L. parakefir* e *L. fermentum* foram encontradas em prevalência no Kefir. Essas bactérias são as responsáveis por converter a lactose do leite em ácido láctico. Além disso, observou-se que quando o *L. kefirifaciens* cresce junto a levedura *S. cerevisiae*, a produção da matriz de polissacarídeo conhecida como Kefiran é estimulada (Figura 2) (MAGALHÃES et al., 2011; LEITE et al., 2013; PRADO et al., 2015).

Estudos mostraram que muitas das bactérias isoladas do Kefir possuem resistência a bile e as baixas condições de pH, assim como a capacidade de aderirem ao epitélio intestinal devido a interação simbiótica com as leveduras. Essas características tornam a bebida probiótica e repleta de propriedades que favorecem à saúde, como atividade antimicrobiana, efeitos antitumorais e hipocolesterolêmicos, estimulando o sistema imunológico, beneficiando o trato gastrointestinal e indivíduos com intolerância a lactose (NIELSEN et al., 2014).

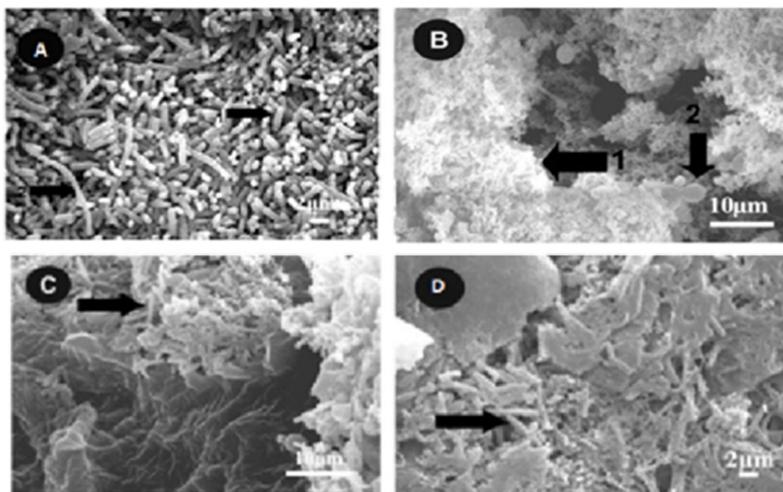


Figura 2: Microscopia eletrônica dos grãos de Kefir. Em **A**: bactérias longas e curtas. Em **B**: Kefiran (1) e leveduras (2). Em **C** e **D**: bactérias
 Fonte: Magalhães et al. (2011)

Dentre as leveduras encontradas no Kefir segundo a literatura, estão *Zygosaccgaromyces sp.*, *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces lactis*, *Torulaspota delbrueckii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces unisporus*, *Candida kefir*, *Pichia fermentans*, *Kazachstania aerobia*, *Kazachstania unispora*, *Lachanceae meyersii*, *Yarrowia lipolytica*, *Issatchenkia occidentalis*, entre muitas outras (Figura 3) (MAGALHÃES et al., 2011, DIOSMA et al., 2013, LEITE et al., 2013, NIELSEN et al., 2014, AHMED et al., 2015, DALLAS et al., 2015, PRADO et al., 2015).

Muitas dessas leveduras, como por exemplo a *S. cerevisiae*, estão sendo abundantemente utilizadas como leveduras probióticas e como agentes terapêuticos no tratamento de muitas doenças intestinais. Carasi et al. (2014), demonstrou que a administração do *Lactobacillus kefir* em camundongos aumentou a resposta anti-inflamatória no intestino, mostrando ser uma ótima alternativa para a homeostasia intestinal. Além disso, outros estudos mostram que *K. marxianus* e *S. cerevisiae*, encontrados no Kefir, são capazes de sobreviver a passagem pelo trato gastrointestinal e de aderirem a células epiteliais intestinais onde se disseminam ao longo de todo o trato (DIOSMA et al., 2013; CARASI et al., 2014).

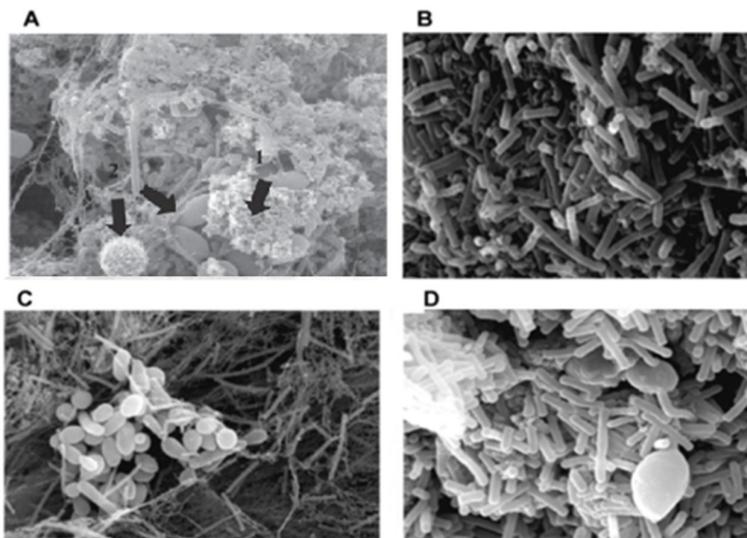


Figura 3: Microscopia eletrônica dos grãos de Kefir. Em **A**: proteína coagulada (1) e diferentes espécies de leveduras (2). Em **B**: bactérias na porção externa do grão. Em **C**: bactérias e leveduras no porção externa do grão. Em **D**: bactérias na porção interna do grão.
Fonte: Leite et al. (2013)

2.5 BENEFÍCIOS DO KEFIR

2.5.1 Atividade antimicrobiana

A bebida Kefir tem mostrado atividade antimicrobiana contra muitos organismos patogênicos devido a produção de ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, acetaldeído, gás carbônico, dentre outros. Essas substâncias estão diretamente relacionadas com a redução de micro-organismos indesejáveis transmitidos pelos alimentos e na preservação de produtos alimentares (GUZEL-SEYDIM et al., 2011; AHMED et al., 2015).

Alguns estudos mostraram efeito inibitório do *Lactococcus lactis* isolado do Kefir contra a citotoxicidade do *Clostridium difficile* em células eucarióticas. Outro estudo empregou *Lact. plantarum* na proteção de células contra a toxina shiga da *E. coli*. Além disso, foi relatado que o leite fermentado com grãos de kefir em geral possui atividade antimicrobiana contra *S. aureus*, *E. coli*, *E. fecalis* e *C. albicans*. Outro estudo revelou que 75% dos lactobacilos presentes no Kefir inibe o crescimento de *E. coli* e *Y. enterocolitica*, 64% de *Shigella flexineri*, 50% de *Listeria monocytogenes*, 40% de *Salmonella enteritidis* e 19% mostrou atividade

antimicrobiana contra *Salmonella typhi* (GUZEL-SEYDIM et al., 2011; LEITE et al., 2013; NIELSEN et al., 2014; AHMED et al., 2015).

2.5.2 Efeitos antitumorais

Carcinomas e sarcomas são tumores que podem ter origem em vários tecidos do corpo incluindo o epitelial, ósseo, gorduroso e cartilaginoso. Grãos de Kefir e frações destes, apresentaram capacidade de reduzir o desenvolvimento de tumores *in vivo* e eficiência em destruir células cancerígenas *in vitro*. Maalouf et al. (2011) obtiveram resultados significativos de frações dos grãos de Kefir que indicaram redução na proliferação e indução de apoptose de células leucêmicas sem apresentar efeitos adversos em células normais (GUZEL-SEYDIM et al., 2011; MAALOUF et al., 2011; NIELSEN et al., 2014).

Alguns micro-organismos isolados do grão de Kefir tem a capacidade de se ligarem a células mutagênicas diminuindo o crescimento de um possível tumor. Além disso, componentes bioativos presentes na bebida previnem o início de câncer por dificultarem a ação de certas enzimas responsáveis pela conversão de células pró-carcinogênicas em células cancerígenas. Estudos mostram que o Kefir inibe a proliferação de células de câncer gástrico, de carcinoma de Lewis no pulmão, de câncer de mama, de células de adenocarcinoma do cólon, de sarcoma em ratos e reduz o stress oxidativo. Em outro experimento feito em camundongos que receberam uma dieta com o Kefir por 27 dias, revelou um aumento significativo de IgA ao mesmo tempo que houve inibição do crescimento de tumores (LEITE et al., 2013; AHMED et al., 2015; PRADO et al., 2015).

2.5.3 Estimulação do sistema imunológico

Além de antitumoral, o Kefir também tem a capacidade de estimular o sistema imunológico. O consumo regular da bebida estimula células do sistema imunológico inato do intestino promovendo respostas mediadas por células contra tumores e infecções e aumenta a atividade de fagocitose dos macrófagos alveolares. Além disso, os micro-organismos presentes no Kefir estimulam a produção de IL-10 e aumentam a quantidade de IgA nos intestinos grosso e delgado, mantendo assim a homeostase intestinal. Em estudo feito por Carasi et al. (2014) observou-se o

aumento significativo de interleucinas na mucosa intestinal de camundongos com a administração de *L. kefir* promovendo a imunomodulação na proteção contra infecções (GUZEL-SEYDIM et al., 2011; LEITE et al., 2013; CARASI et al., 2014; NIELSEN et al., 2014; AHMED et al., 2015).

Franco et al. (2013) demonstraram que o consumo diário do Kefir ativa vários mecanismos diferentes de imunidade humoral e celular que são desregulados por patógenos e reduz a infecção intestinal por *Gardinerella intestinalis*. Essa propriedade de imunomodulação faz do Kefir uma bebida não só importante contra infecções, mas também crucial em repostas alérgicas a alimentos (FRANCO et al., 2013; NIELSEN et al., 2014).

2.5.4 Efeito hipotensivo e hipercolesterolêmico

A enzima conversora de angiotensina (ECA) influencia diretamente na pressão arterial. Ela converte a angiotensina I em angiotensina II, um vasoconstritor, além de estimular a retenção de líquido, aumentando assim a pressão arterial. Estudos feitos com animais revelaram uma diminuição significativa da pressão arterial e do colesterol sérico quando o Kefir é introduzido na alimentação. Dentre os 16 peptídeos encontrados na bebida, dois deles são capazes de inibir a ECA. Alguns estudos demonstram atividade hipocolesterolêmica em ratos devido a substâncias como α -manana e β -glucano presentes na parede celular de *Kluyveromyces marxianus* isolados do Kefir. Além disso, pesquisas mostraram que o efeito hipocolesterolêmico também vem da desconjugação de sais biliares por enzimas hidrolases que são produzidas pelas bactérias e leveduras presentes nos grãos de Kefir (LIU et al., 2006; GUZEL-SEYDIM et al., 2011; ANGELIS-PEREIRA et al., 2013; NIELSEN et al., 2014; AHMED et al., 2015).

2.5.5 Intolerância a lactose

A lactose é o principal açúcar presente no leite de mamíferos e sua intolerância é uma das principais desordens que atinge uma grande porcentagem da população mundial. A principal causa é a atividade inadequada ou ausência da enzima β -galactosidase, responsável por degradar a lactose em glucose e galactose no intestino delgado. Essa enzima está naturalmente presente nos grãos de kefir,

promovendo a hidrólise da lactose durante o processo de fermentação do leite, reduzindo assim o teor desse carboidrato e tornando a bebida um produto adequado para pessoas intolerantes a lactose (GUZEL-SEYDIM et al., 2011; AHMED et al., 2015).

Análises feitas em animais mostram que o consumo da bebida Kefir melhora em 30% o pico da glicose pós-prandial revelando ser eficaz na digestão da lactose. Além disso, a bebida Kefir demonstrou ser capaz de permitir a sobrevivência da enzima β -galactosidase durante a passagem pelo suco gástrico do estômago. Ostadrahimi et al. (2015) observaram a ação do Kefir em pacientes diabéticos onde os níveis de glicemia em jejum e hemoglobina glicada (HbA1C) diminuíram em comparação com o leite fermentado convencional (GUZEL-SEYDIM et al., 2011; NIELSEN et al., 2014; OSTADRAHIMI et al., 2015).

2.5.6 Impacto no trato gastrointestinal

Kefir tem mostrado ser um ótimo pró-digestivo no trato gastrointestinal auxiliando a re-estabelecer a microbiota intestinal e na proteção contra microorganismos indesejáveis. Essa nova microbiota ajuda a reduzir o índice glicêmico e a diminuir a colonização por *Campylobacter jejuni* que afeta a resposta imune e a mucosa intestinal. Além disso, Kefir pode inibir *Helicobacter pylori*, uma bactéria de grande interesse pelos pesquisadores por ter relação com gastrites crônicas, úlceras e câncer gástrico. A bebida vem sendo amplamente utilizada na Rússia no tratamento de pacientes com úlceras no estômago e no duodeno (LEITE et al., 2013; NIELSEN et al., 2014; AHMED et al., 2015).

Tratamentos terapêuticos com radiação são os principais responsáveis por complicações gastrointestinais. Cerca de 80% dos pacientes submetidos aos tratamentos radioterápicos apresentam problemas no trato gastrointestinal sendo o intestino delgado o órgão mais afetado. Estudo realizado por Teruya et al. (2013) mostrou que o Kefir tem efeito protetor contra a destruição celular associada a radiação terapêutica no intestino delgado e também nos órgãos reprodutivos masculinos (TERUYA et al., 2013).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar presuntivamente leveduras de interesse biotecnológico nos grãos de Kefir.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter e manter os grãos de Kefir nas condições ideais até obtenção de quantidade suficiente;
- Triturar os grãos de Kefir e isolar as leveduras destes;
- Realizar exame direto das colônias de crescimento rápido;
- Empregar provas bioquímicas de identificação presuntiva de leveduras.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

Os grãos de Kefir foram adquiridos na região de Bauru.

Os solventes, reagentes e meios de cultura utilizados foram: ágar Sabouraud dextrose com Cloranfenicol (KASVI); água destilada; açúcar mascavo (NATU'S); azul de bromotimol (NUCLEAR); escala Mc Farland 2 (PROBAC); etanol 95% (DINÂMICA); extrato de levedura (MERCK); glicose (NUCLEAR); lactose (PURIFARMA); leite Integral (DIA %); maltose (MERSE); salina (CROMOLINE); peptona (ACUMEDIA); sacarose (DINÂMICA); triptona(OXOID).

Os equipamento e vidrarias usados foram: agitador magnético(FISATOM); autoclave vertical (PHOENIX); balança analítica (MARTE); estufa micológica (FANEM); fluxo laminar (VECO); kit de filtração (MILLEX);microscópio (NIKON E 200); bico de Bunsen; espátulas e colheres; agulha de platina; alça de Drigalski; alça bacteriológica; lâminas e lamínulas; seringas; almofariz e pistilo; béquer; erlenmeyer; frascos de vidro estéreis; pipetas de volume variável; placas de Petri; provetas graduadas; tubos de Durham; tubos de ensaio.

4.2 METODOLOGIA

4.2.1 Cultivo dos grãos de Kefir

Os grãos de Kefir foram cultivados em água com açúcar mascavo e em leite integral UHT, mantidos em potes de vidro em temperatura ambiente, conforme a Figura 4. Esses meios de cultivo foram renovados a cada 24 horas, todos os dias, lavando-se os grãos em água corrente.

O Kefir em água com açúcar foi cultivado por 32 dias e o Kefir em leite por 8 dias antes da utilização do mesmo para o isolamento e identificação das leveduras.



Figura 4: Aspecto macroscópico dos grãos de Kefir cultivados em leite integral UHT e açúcar mascavo, respectivamente.

Fonte: elaborada pelo autor

4.2.2 Preparação do material para isolamento das leveduras dos grãos de Kefir

4.2.2.1 Ágar Sabouraud com cloranfenicol

O ágar Sabouraud com cloranfenicol (SDA + CLO) foi preparado conforme orientação do fabricante. Em um Erlenmeyer, a solução de Sabouraud foi submetida ao agitador magnético com aquecimento para ser dissolvido, conforme a Figura 5. Em seguida, foram pipetados 4 mL da solução nos tubos de ensaio para serem autoclavados, após foram inclinados.



Figura 5: Ágar Sabouraud com cloranfenicol sendo dissolvido em agitador magnético sob aquecimento

Fonte: elaborada pelo autor

4.2.2.2 Triptona em água 0,1%

A triptona em água 0,1% foi preparada pesando-se 0,05 g e dissolvendo-se em 50 mL de água destilada. Essa solução foi dividida em 2 frascos, sendo 25 mL em cada e foram autoclavados.

4.2.2.3 Autoclave

Todos os materiais utilizados foram previamente autoclavados a 121°C durante 15 minutos para esterilização dos mesmos. Após a autoclavagem, os ágar Sabouraud com cloranfenicol foram mantidos, bem fechados, em geladeira até a utilização.

4.2.3 Isolamento das leveduras dos grãos de Kefir

Pesou-se 40,8 g dos grãos cultivados no açúcar e no leite e macerou-se em almofariz com auxílio de pistilo (Figura 6), em seguida o macerado foi ressuspensionado em solução de triptona a 0,1% e mantidos durante 1 hora (DIOSMA et al.,2014).



Figura 6: Grãos de Kefir sendo macerados

Fonte: elaborado pelo autor

Após este período, os grãos foram semeados nas placas de Petri com ágar SDA + CLO por 3 técnicas diferentes: esgotamento, estria e distensão. As placas foram então mantidas em estufa a 37°C.

4.2.4 Isolamento das diferentes colônias

As diferentes colônias crescidas nas placas de Petri foram isoladas com auxílio de agulha bacteriológica e semeadas individualmente em tubos de ensaio inclinados. Como se observou que algumas destas colônias produziram gás (Figura 7), estas foram isoladas e preservadas em placas de Petri com ágar SDA + CLO em geladeira, após o crescimento a 37°C.



Figura 7: Colônias produtoras de gás
Fonte: elaborado pelo autor

4.2.5 Identificação presuntiva das leveduras

4.2.5.1 Exame direto

Com auxílio da alça bacteriológica, uma pequena porção de cada colônia foi coletada e ressuspensa em salina entre lâmina e lamínula. Em seguida, realizou-se a análise das estruturas no microscópio óptico nos aumentos de 10x e 40x (ANVISA, 2004).

4.2.5.2 Prova do tubo germinativo

Cada colônia foi ressuspensa em 500 μ L de soro humano e incubadas na estufa a 37°C por 3 horas. Após, foram coletados 50 μ L e colocada entre lâmina e lamínula para análise microscópica. O tubo germinativo se caracteriza pela presença de um filamento fino originado de um blastoconídio de levedura, onde não se observa nenhuma zona de constrição. A presença dessa estrutura indica a existência de espécies de *Candida albicans* (ANVISA, 2004).

4.2.5.3 Zimograma

Pesou-se 0,9 g dos açúcares: lactose, maltose, sacarose e glicose e dissolveu-se em cada um,15 mL de água destilada. Em seguida, com o auxílio de filtros de 0,22 μ m de porosidade, cada solução de açúcar foi esterilizada por filtração em tubos de vidro estéreis, conforme Figura 8, uma vez que estes açúcares são sensíveis ao processo de autoclavagem. Após a filtração, foram pipetados 1,5 mL de cada solução de açúcar e distribuídos nos meios basais, constituídos de azul de bromotimol – 0,03 g, extrato de levedura – 2,7 g, peptona – 4,5 g, água destilada – 600 mL, e etanol 95% - 1,8 mL (3 mL) para a prova da fermentação de carboidratos. Posteriormente, cada micro-organismo foi dissolvido em solução salina até atingir a turbidez 2 da escala de McFarland, e transferido para os tubos do zimograma que foram mantidos na estufa a 37°C durante 4 dias para a leitura (OPLUSTIL et al., 2000; KONEMAN et al., 2001; ANVISA, 2004; MURRAY et al., 2010).



Figura 8: Filtração da solução de maltose
Fonte: elaborado pelo autor

4.2.5.4 Prova da ureia

A prova da ureia é uma prova bioquímica que foi preparada de acordo com as orientações do fabricante e autoclavada. Após esfriar, adicionou-se 1,2 mL de solução de ureia 40%. Em seguida, a solução foi distribuída em tubos de ensaio com auxílio de pipeta estéril. Inoculou-se as leveduras isoladas na superfície inclinada do ágar e incubou-se a 37°C por 48 horas. A coloração rosa no meio indica reação positiva para a enzima urease, que degrada a ureia em amônia alterando o pH do meio para alcalino e invertendo o indicador de pH observada através da mudança de cor (ANVISA, 2004).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O crescimento de leveduras nas placas de Petri foi observado 24 horas após a incubação. Pode-se observar que houve o crescimento de 6 tipos de colônias diferentes com as seguintes características macroscópicas:

- Colônia 1: pequenas, cremosas, lisas, com bordos lisos e bege (Figura 9);



Figura 9: Colônia 1 – Leveduras isoladas dos grãos cultivados em água com açúcar mascavo
Fonte: elaborado pelo autor

- Colônia 2: grandes e secas, rugosas, com bordos crenados, brancas opacas com o centro branco (Figura 10);



Figura 10: Colônia 2 – Leveduras isoladas dos grãos cultivados em água com açúcar mascavo
Fonte: elaborado pelo autor

- Colônia 3: grandes e secas, rugosas, com bordos crenados na cor branca, incolores com centro esbranquiçado (Figura 11);



Figura 11: Colônia 3 – Leveduras isoladas dos grãos cultivados em água com açúcar mascavo
Fonte: elaborado pelo autor

- Colônia 4: grandes e secas, rugosas, com bordos crenados, brancas opacas (Figura 12);



Figura 12: Colônia 4 – Leveduras isoladas dos grãos cultivados em leite
Fonte: elaborado pelo autor

- Colônia 5: pequenas, cremosas, lisas, com bordos lisos e brancas (Figura 13);



Figura 13: Colônia 5 – Leveduras isoladas dos grãos cultivados em leite

Fonte: elaborado pelo autor

- Colônia 6: grandes, cremosas, lisas, com bordos lisos e brancas (Figura 14).



Figura 14: Colônia 6 – Leveduras isoladas dos grãos cultivados em leite

Fonte: elaborado pelo autor

Analisando as placas com as colônias isoladas, pode-se verificar que macroscopicamente, as colônias 1, 5 e 6 eram semelhantes, assim como as colônias 2, 3 e 4 também apresentavam características macroscópicas semelhantes.

No exame direto observou-se diferentes estruturas microscópicas: pseudohifas, blastoconídeos e blastoconídeos em brotamento, que foram comparadas com diferentes atlas, o que permitiu identificar presuntivamente as espécies: *Sacharomyces cerevisiae*, *Candida glabrata* e *Candida krusei* (Figuras 15-20).

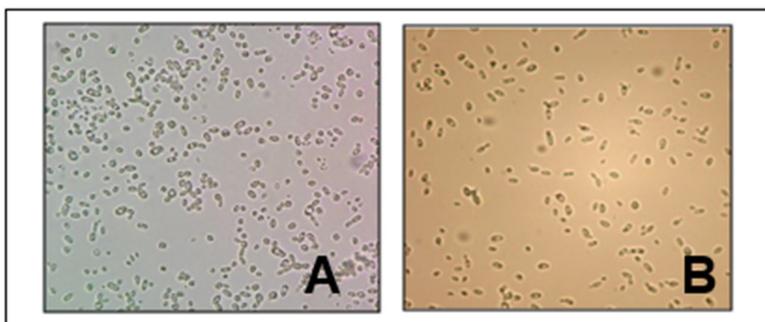


Figura 15: Identificação presuntiva de *Candida glabrata* - **A**: exame direto da colônia 1 (água com açúcar mascavo) no aumento de 40x; **B**: atlas microumftqm

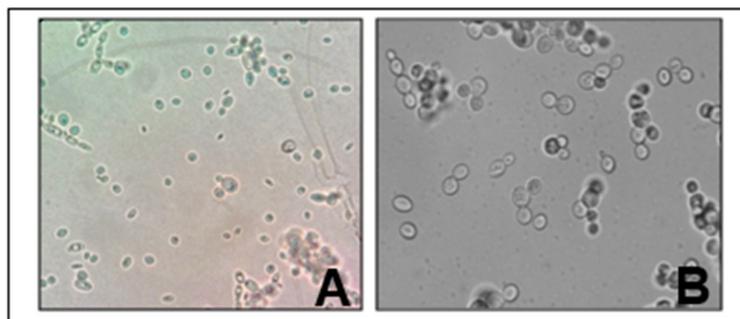


Figura 16: Identificação presuntiva de *Sacharomyces cerevisiae* - **A**: exame direto da colônia 2 (água com açúcar mascavo) no aumento de 40x; **B**: atlas eureka brewing.wordpress

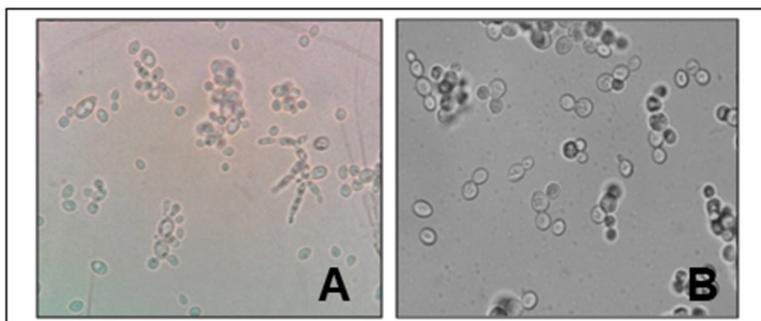


Figura 17: Identificação presuntiva de *S. cerevisiae* - **A**: exame direto da colônia 3 (água com açúcar mascavo) no aumento de 40x; **B**: atlas eureka brewing.wordpress

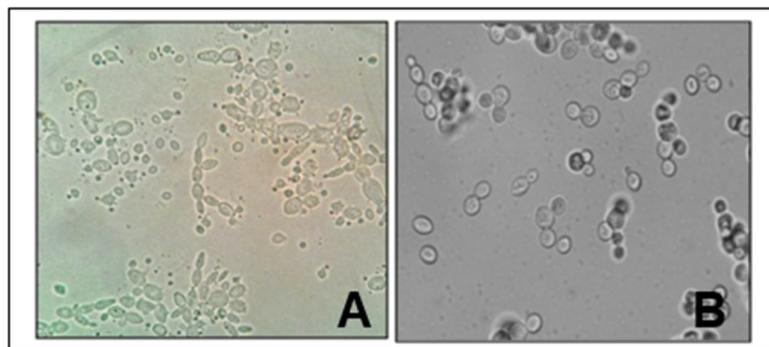


Figura 18: Identificação presuntiva de *S. cerevisiae* - **A**: exame direto da colônia 4 (leite) no aumento de 40x; **B**: atlas eureka brewing.wordpress

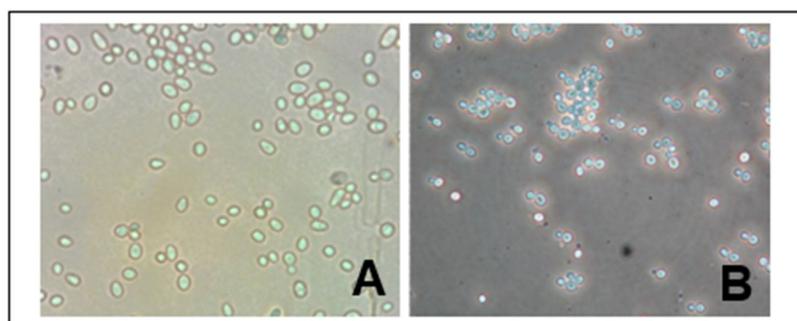


Figura 19: Identificação de *S. cerevisiae* - **A**: exame direto da colônia 5 (leite) no aumento de 40x; **B**: atlas The Virtual Edge (uwo.edu)

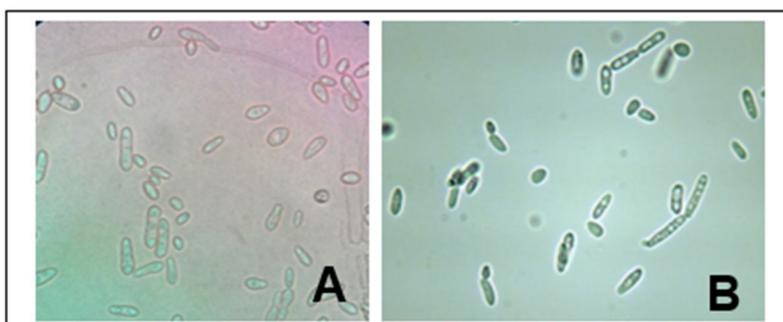


Figura 20: Identificação presuntiva de *Candida krusei* - **A**: exame direto da colônia 6 (leite) no aumento de 40x; **B**: atlas microumftgm

As próximas etapas de identificação das leveduras foram realizadas com a análise dos resultados do zimograma representados na Tabela 2 em comparação com o quadro de identificação da ANVISA (2004) (Figura 21).

Entretanto como o zimograma foi realizado empregando somente lactose, maltose, sacarose e glicose e, além disso, todas as colônias apresentaram resultado negativo para a prova da ureia, bem como para o teste do tubo germinativo (Figura 22), excluindo a possibilidade de estas leveduras serem *Candida albicans*, não foi possível encontrar resultados compatíveis para todas as chaves de identificação de leveduras (Figura 21), sendo necessário considerar apenas as comparações entre atlas micológicos e os exames diretos na identificação presuntiva das leveduras isoladas dos grãos de Kefir.

Tabela 2: Resultados do zimograma, prova da ureia e tubo germinativo e interpretação das possíveis espécies de leveduras

Colônia	Sac	Lac	Gli	Mal	Ureia	TG	Interpretação
1	+	-	+	+/-	-	-	<i>S. cerevisiae, Candida guilhermondii ou Hansenullaanomala</i>
2	+	-	+	+/-	-	-	<i>S. cerevisiae, Candida guilhermondii ou Hansenullaanomala</i>
3	+	-	+	+/-	-	-	<i>S. cerevisiae, Candida guilhermondii ou Hansenullaanomala</i>
4	+	-	+/-	-	-	-	<i>Candida tropicalis ou Candida famata</i>
5	+	-	+	-	-	-	<i>C. guilhermondii ou H. anomala</i>
6	+	-	+	+	-	-	<i>S. cerevisiae ou H. anomala</i>

Mal: maltose; Gli: glicose; Sac: sacarose; Lac: lactose; TG: tubo germinativo; + positivo; - negativo; +/- variável.

Fonte: elaborado pelo autor

LEVEDURAS	Fermentação						Cap	Tg	U
	Gli	Sac	Lac	Gal	Tre	Mal			
<i>Candida albicans</i>	G	-	-	V	G	G	-	+	-
<i>C. guilliermondii</i>	G	G	-	V	G	-	-	-	-
<i>C. krusei</i>	G	-	-	-	-	-	V	-	V
<i>C. parapsilosis</i>	V	-	-	V	V	-	-	-	-
<i>C. pseudotropicalis</i>	G	G	G	G	-	-	-	-	-
<i>C. stellatoidea</i>	G	-	-	-	-	G	-	+	-
<i>C. tropicalis</i>	V	V	-	G	G	G	-	-	-
<i>C. zeylanoides</i>	V	-	-	-	V	-	-	-	-
<i>C. lambica</i>	G	-	-	-	-	-	V	-	-
<i>C. lipolytica</i>	-	-	-	-	-	-	V	-	+
<i>C. lusitanae</i>	G	V	-	V	V	-	-	-	-
<i>C. rugosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. famata</i>	V	V	-	-	G	V	-	-	-
<i>C. glabrata</i>	G	-	-	-	G	-	-	-	-
<i>Cryptococcus neoformans</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	+
<i>C. albidus</i>	-	-	-	-	-	-	V	-	+
<i>C. gastricus</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	+
<i>C. laurentii</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	+
<i>C. terreus</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	+
<i>C. luteolus</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>C. uniguttulatus</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	+
<i>Rhodotorula rubra</i>	-	-	-	-	-	-	V	-	+
<i>R. glutinis</i>	-	-	-	-	-	-	V	-	+
<i>Trichosporon inkii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>T. ovoides</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	G	G	-	G	V	G	-	-	-
<i>Geotrichum candidum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>G. capitatum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Hansenula anomala</i>	G	G	-	V	V	V	-	-	-

Figura 21: Quadro, modificado, de identificação das principais leveduras de interesse clínico. (Gli: glicose; Sac: sacarose; Lac: lactose; Gal: galactose; Tre: trealose; Mal: maltose; Cap: cápsula; Tg: tubo germinativo; U: ureia).

Fonte: ANVISA, 2004; SIDRIM, 2004

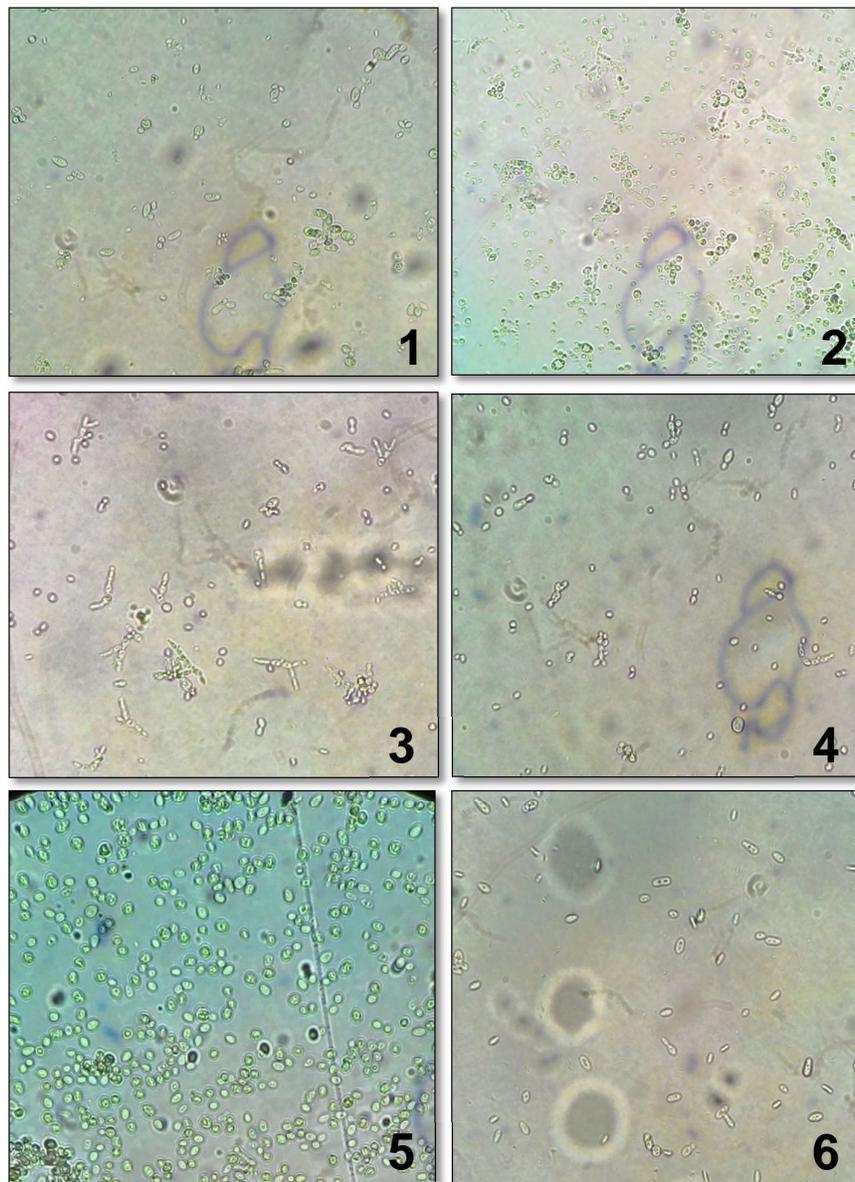


Figura 22: Prova do tubo germinativo no aumento de 40x - **1**: colônia 1; **2**: colônia 2; **3**: colônia 3; **4**: colônia 4; **5**: colônia 5; **6**: colônia 6
 Fonte: elaborado pelo autor

No total foram isoladas, neste estudo, seis colônias com características macroscópicas e microscópicas diferentes dos grãos de Kefir, quantidade inferior ao estudo realizado por Magalhães et al. (2011) em que foram isoladas 110 leveduras entre espécies de *Sacharomyces* sp. e de *Candida* sp. Além disso, outras espécies de leveduras como *Kluyveromyces* sp., *Pichia* sp. e *Zygosaccharomyces* sp. foram reportadas em outras pesquisas com grãos de Kefir (MAGALHÃES et al., 2011; MIGUEL et al., 2012; AHMED et al., 2015), o que remete a necessidade de

continuidade deste estudo e realização de identificação biomolecular para a confirmação da identificação presuntiva.

Segundo Ceccato-Antonini e Sudbery (2004), *S. cerevisiae* sofre dimorfismos a partir de fatores ambientais em que se encontra, quando sofre estresse pode adquirir várias formas. Ainda de acordo com os autores, esse dimorfismo pode oferecer às células vantagens, como aumento da absorção de reagentes e/ou secreção de produtos, possibilitando sua aplicação em diferentes setores industriais. Acredita-se que este fenômeno tenha sido observado nos exames diretos das colônias 2, 3, 4 e 5 que apresentaram diferenças quanto as características microscópicas, porém macroscopicamente apontaram ser a mesma levedura.

As leveduras são consideradas os primeiros micro-organismos usados pelo homem no processo de fermentação alcoólica de bebidas como vinho e cerveja, além da fermentação de pães e outros alimentos. Dentre essas leveduras, *S. cerevisiae* é a mais utilizada no campo biotecnológico por ter sucesso nos processos de fermentação do álcool, produção de etanol, além de ser empregada na expressão de proteínas heterólogas. Devido a essas capacidades, *S. cerevisiae* torna-se uma das mais importantes leveduras nos dias atuais, assim os grãos de Kefir podem não só trazer benefícios à saúde, como também representar uma importante fonte de bioprospecção (MATTANOVICH et al., 2014; KAVSEK et al., 2015).

As espécies de *Candida* sp. possuem grande importância clínica, pois representam um dos maiores grupos de micro-organismos causadores de infecções humanas, além de apresentarem perfil de resistência a antifúngicos. Além da área clínica, algumas espécies vêm mostrando o potencial para a produção de fármacos e antifúngicos e na produção de biossurfactantes a partir de resíduos industriais. Em estudo realizado por Andrade (2010), observou-se que uma linhagem de *Candida glabrata*, isolada de solo semi-árido, foi capaz de produzir biossurfactante polimérico com alta composição de lipídeos, proteínas e carboidratos, empregando como resíduos industriais a milhocina e o soro de leite, demonstrando a potencialidade desse micro-organismo na aplicação em processos ambientais e industriais (ABEGG, 2010; ANDRADE, 2010).

De Luna (2006), também observou a importância da *C. glabrata* na produção de biossurfactante, utilizando como substratos o óleo de algodão, glicose e extrato de levedura, demonstrou propriedades promissoras do biopolímero na remoção de

óleos, conferindo maior empregabilidade nas indústrias petrolíferas onde são usados na produção de petróleo ou incorporados em formulações de óleos lubrificantes.

Devido a elevada biodegradabilidade, baixa toxicidade e aceitabilidade ecológica, os biossurfactantes produzidos por micro-organismos, principalmente as espécies de *Candida* sp. são utilizados em diferentes aplicações industriais como indústrias de medicamentos, cosméticos, alimentos e na proteção ao meio ambiente, contribuindo para a melhoria da qualidade de vida (SILVA 2013).

Além dos biossurfactantes, *Candida* sp. assim como *S. cerevisiae*, vem sendo estudadas na produção de álcool a partir do bagaço de maçã, material com alto conteúdo de açúcares tornando-se um substrato potente na utilização em processos biotecnológicos devido sua ação como fonte de carbono para micro-organismos. Joshi&Sandhu (1996) também utilizaram espécies de *Saccharomyces*, *Candida* e *Torula* para produzir álcool a partir da fermentação em estado sólido do bagaço da maçã (VENDRUSCOLO et al., 2009).

Outro ponto importante com relação a essas leveduras é a produção de enzimas de interesse biotecnológico. A facilidade de manipulação genética e a grande diversidade bioquímica, torna os micro-organismos uma excelente fonte enzimática, mostrando potencial em aplicações industriais. O estudo realizado por Silva-Neves et al. (2006), mostrou a obtenção da enzima protease por diversas leveduras da região Amazônica, inclusive por espécies de *Candida* sp., sendo possível a utilização destas em processamento de alimentos, bebidas, desenvolvimento de detergente, produção de medicamento, dentre outras (ORLANDELLI et al., 2012). O estudo realizado por Silva (2011), revelou a capacidade da *Candia krusei* em secretar celulase e protease de forma extracelular durante a fermentação do cacau na produção do chocolate, tornando-a um recurso promissor na obtenção de enzimas extracelulares de interesse e aplicação industrial.

Segundo Domingues (2001), *S. cerevisiae* além de ser um organismo geralmente reconhecido como seguro, devido sua capacidade em produzir substâncias que podem ser empregadas nas indústrias alimentícias, atua ainda na produção de muitas proteínas heterólogas que podem ser utilizadas em diversas áreas biotecnológicas (Tabela 3).

Tabela 3: Exemplos de proteínas heterólogas secretadas por *S. cerevisiae*

Proteínas	Referência
α -amilase de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Ruohonen, 1995
α -glucosidase de <i>Candida tsukubaensis</i>	Kinsella e Cantwell, 1991
β -galactosidade de <i>Aspergillus niger</i>	Kumar et al., 1992
Celobiohidrolases I e II de <i>Trichoderma reesei</i>	Penttila et. al, 1998

Fonte: Domingues, 2001.

Com os avanços tecnológicos em engenharia genética, atualmente é possível clonar e expressar genes considerados incomuns em hospedeiros heterólogos, possibilitando a produção de produtos biotecnológicos e conseqüentemente a criação de organismos geneticamente modificados. Através da técnica de DNA recombinante, Domingues (2001) conseguiu construir estirpes de *S. cerevisiae* capazes de metabolizar lactose possibilitando sua aplicação no tratamento do soro de queijo, um substrato tóxico para o meio ambiente e amplamente gerado por indústrias de laticínios. Além disso, construiu também estirpes de *S. cerevisiae* excretoras de β -galactosidase, enzima com características potentes para aplicações biotecnológicas.

Os grãos de Kefir são ricos em micro-organismos que podem trazer benefícios à saúde e que, quando isolados, podem ainda ser aplicados em outros processos biotecnológicos, contribuindo para os avanços neste setor.

6 CONCLUSÃO

Concluiu-se que foram isoladas leveduras dos gêneros *Sacharomyces* sp. e *Candida* sp.com grande relevância para os processos biotecnológicos.

REFERÊNCIAS

A LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* na produção de pão, vinho e cerveja e como modelo experimental. **E-escola**, 2005. Disponível em: <<http://e-escola.tecnico.ulisboa.pt/topico.asp?id=321&ordem=1>>. Acesso em 26 jun. 2016

ABEGG, M. A. **Estresse oxidativo em espécies de *Candida* com relevância clínica**. 2010. 156 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia, 2010.

AHMED, Z.; WANG, Y.; AHMAD, A.; KHAN, S. T.; NISA, M.; AHMAD, H.; AFREEN, A. Kefir and Health: a contemporary perspective. **Food Science and Nutrition**, v. 53, p. 422-434, 2013.

ALCAÍNO, J.; CIFUENTES, V.; BAEZA, M. Physiological adaptations of yeasts living in cold environments and their potential applications. **World J Microbiology and Biotechnology**, v. 31, p. 1467-1473, 2015.

ANDRADE, R. F. S. **Produção, caracterização e aplicação de biossurfactantes de *Candida lipolytica* e *C. glabrata* utilizando resíduos industriais como substratos alternativos**. 2010. 132 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais) – Universidade Católica de Pernambuco, Recife, 2010.

ANGELIS-PEREIRA, M. C.; BARCELOS, M. F. P.; SOUSA, M. S. B.; PEREIRA, J. A. R. Effects of the Kefir and banana pulp and skin flours on hypercholesterolemic rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 28, n.7, p. 481-486, 2013.

ANVISA módulo VII: Detecção e Identificação dos Fungos de Importância Médica. **Anvisa**, 2004. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosade/microbiologia/mod_7_2004.pdf>. Acesso em 20 jul. 2016

ANVISA Guia para Comprovação da Segurança de Alimentos e Ingredientes. **Anvisa**, 2013. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/395734/Guia+para+Comprova%C3%A7%C3%A3o+da+Seguran%C3%A7a+de+Alimentos+e+Ingredientes/f3429948-03db-4c02-ae9c-ee60a593ad9c>>. Acesso em 25 out. 2016

ATLAS: Agar plates, 2012. **EurekaBrewing**. Disponível em: <<https://eurekabrewing.wordpress.com/2012/02/06/3-agar-plates-1056-3787/>>. Acesso em: 19 maio 2016

ATLAS Online de Microbiologia – UMF, [entre 2006 e 2014]. **Microumftgm.ro**. Disponível em: <<http://atlas.microumftgm.ro/micologie/levuri/ckrusei.php>>. Acesso em: 19 maio 2016

BERGMANN, R. S. O.; PEREIRA, M. A.; VEIGA, S. M. O. M.; SCHNEEDORF, J. M.; OLIVEIRA, N. M. S.; FIORINI, J. E. Microbial profile of a Kefir sample preparations – grains in natura and lyophilized and fermented suspension. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, SP, v. 30, n. 4, p. 1022-1026, out./dez. 2010.

CARASI, P.; RACEDO, S. M.; JACQUOT, C.; ROMANIN, D. E.; SERRADELL, M. A.; URDACI, M. C. Impact ok Kefir derived *Lactobacillus kefir* on the mucosal immune response and gut microbiota. **Journal of Immunology Research**, v. 2015, 2014.

CARVALHO, A. P. Ciência e Tecnologia no Brasil: Uma Nova Política para um Mundo Global. Biotecnologia, 1993.

CECCATO-ANTONINI, S. R.; SUDBERY, P. E. Filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. **Brazilian Journal of Microbiology**, Araras, SP, v. 35, p. 173-181, Ago. 2004.

CONTRERAS, G.; BARAHONA, S.; SEPÚLVEDA, D.; BAEZA, M.; CIFUENTES, V.; ALCAÍNO, V. Identification and analysis of metabolite production with biotechnological potential in *Xanthophyllomyces dendrorhous* isolates. **World J Microbiology and Biotechnology**, v. 31, p. 517-526, 2015.

DALLAS, D. C.; CITERNE, F.; TIAN, T.; SILVA, V. L. M.; KALANETRA, K. M.; FRESE, S. A.; ROBINSON, R. C.; MILLS, D. A.; BARLIE, D. Peptidomic analysis reveals proteolytic activity of kefir microorganisms on bovine milk proteins. **Food Chemistry**, p. 273-284, 2015.

DE LUNA, J. M. **Influência do óleo de algodão, glicose e extrato de levedura na produção de biossurfactante por uma nova linhagem de *Candida glabrata***. 2006. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.

DIMITRELLOU, D.; KANDYLIS, P.; KOURKOUTAS, Y.; KOUTINAS, A. A.; KANELAKI, M. Cheese production using Kefir culture entrapped in milk proteins. **Appl Biochem Biotechnol**, p. 213-230, mar. 2015.

DIOSMA, G.; ROMANIN, D. E.; REY-BURUSCO, M. F.; LONDERO, A.; GARROTE, G. L. Yeasts from kefir grains: isolation, identification, and probiotic characterization. **World Journal Microbiology biotechnology**, v. 30, p. 43-53, jul. 2014.

DOMINGUES, L. M. A. R. **Estirpes flocculantes de *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificadas para a utilização da lactose: construção e aplicação biotecnológica**. 2001. 345 f. Dissertação (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) – Universidade do Minho, 2001.

FAO/WHO: Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria, 2001. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-a0512e.pdf>>. Acesso em: 8 fev. 2016

FRANCO, M. C.; GOLOWCZYC, M. A.; DE ANTONI, G. L.; PÉREZ, P. F.; HUMEN, M.; SERRADELL, M. L. A. Administration of kefir-fermented milk protects mice against *Giardia intestinalis* infection. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, p. 1815-1822, 2013.

GUIMARÃES, L. H. S.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S. C.; MICHELIN, M.; RIZZATTI, A. C. S.; SANDRIM, V. C.; ZANOELO, F. F.; AQUINO, A. C. M. M.; JUNIOR, A. B.; POLIZELI, M. L. T. M. Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 37, p. 474-480, jul. 2006.

GUZEL-SEYDIM, Z.; KOK-TAS, T.; GREENE, A. K.; SEYDIM, A. C. Review: functional properties of Kefir. **Food Science and Nutrition**, v. 51, p. 261-268, 2011.

KAVSCEK, M.; STRAZAR, M.; CURK, T.; NATTER, K.; PETROVIC, U. Yeast as a cell factory: current state and perspectives. **Microbial Cell Factories**, v. 14, n. 94, jun. 2015.

KONEMEN, E.W.; TRAD; CURY, A.E. *Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido*. 5a. Ed. MEDSI, Rio de Janeiro, 2001.

LEITE, A. M. O.; MIGUEL, M. A. L.; PEIXOTO, R. S.; ROSADO, A. S.; SILVA, J. T.; PASCHOALIN, V. M. F. Microbiological, technological and therapeutic properties of Kefir: a natural probiotic beverage. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 341-349, 2013.

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

MAALOUF, K.; BAYDOUN, E.; RIZK, S. Kefir induces cell-cycle arrest and apoptosis in HTLV-I-negative malignant T-lymphocytes. **Cancer Management and Research**, v. 3, p. 39-47, 2011.

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

MALAJOVICH, M. A. **Biotecnologia 2011**. Rio de Janeiro: Biblioteca Max Feffer do Instituto de Tecnologia ORT, 2012.

MANTZOURANI, I.; PLESSAS, S.; SAXAMI, G.; ALEXOPOULOS, A.; GALANIS, A.; BEZIRTZOGLU, E. Study of Kefir grains application in sourdough bread regarding rope spoilage caused by *Bacillus* spp. **Food Chemistry**, p. 17-21, 2014.

MATTANOVICH, D.; SAUER, M.; GASSER, B. Yeast biotechnology: teaching the old dog new tricks. **Microbial Cell Factories**, v. 13, n. 34, 2014.

MIGUEL, M. G. C. P.; CARDOSO, P. G.; MAGALHÃES-GUEDES, K. T.; SCHWAN, R. F. Identification and assessment of Kefir yeast potential for sugar/etanol-resistance. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 113-118, 2013.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R.N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. **Processos Químicos**, Goiânia, GO, v. 3, n. 5, p. 9-23, jun./jul. 2009.

MURRAY, Patrick R; ROSENTHAL, Ken S; PFALLER, Michael A. *Microbiologia Médica*. 6. ed. Rio de Janeiro Elsevier, 2010.

NIELSEN, B.; GURAKAN, G. C.; UNLU, G. Kefir: a multifaceted fermented dairy product. **Probiotics & Antimicrobial Proteins**, v. 6, p. 123-135, 2014.

OPLUSTI I, C.P.; ZOCCOLI, C.M.; TOBOUTI, N.R.; SINTO, S.I. *Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica*, Sarvier, São Paulo, 2000.

ORLANDELLI, R. C.; SPECIAN, V.; FELBER, A. C.; PAMPHILE, J. A. Enzimas de Interesse Industrial: Produção por fungos e aplicações. **SaBios: Saúde e Biologia**, v. 7, n. 3, p. 97-109, set./dez. 2012.

OSTADRAHIMI, A.; TAGHIZADEH, A.; MOBASSERI, M.; FARRIN, N.; PAYAHOO, L.; GHESHLAGHI, Z. B.; VAHEDJABBARI, M. Effect of probiotic fermented milk (Kefir) on glycemic control and lipid profile in type 2 diabetic patients: a randomized

double-blind placebo-controlled clinical trial. **Iran Journal Public Health**, v. 44, n. 2, p. 228-237, Fev. 2015.

PLESSAS, S.; ALEXOPOULOS, A.; VOIDAROU, C.; STAVROPOULOU, E.; BEZIRTZOGLU, E. Microbial ecology and quality assurance in food fermentation systems: the case of kefir grains application. **Anaerobe**, v. 17, p. 483-485, 2011.

PLESSAS, S.; ALEXOPOULOS, A.; BEKATOROU, A.; BEZIRTZOGLU, E. Kefir immobilized on corn grains as biocatalyst for lactic acid fermentation and sourdough bread making. **Food Chemistry**, v. 77, n. 12, p. 1256-1262, 2012.

PRADO, M. R.; BLANDÓN, L. M.; VANDENBERGHE, L. P. S.; RODRIGUES, C.; CASTRO, G. R.; THOMAZ-SOCCOL, V.; SOCCOL, C. R. Milk Kefir: composition, microbial cultures, biological activities, and related products. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1-7, article 1177, out. 2015.

SANTOS, F. L.; SILVA, E. O.; BARBOSA, A. O.; SILVA, J. O. Kefir: uma nova fonte alimentar funcional ?. 2012.

SIDRIM, JJC.; ROCHA, MFG. *Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos*, 1ª ed. Rio de Janeiro Guanabara, 2004.

SILVA, M. D. S. **Atividade enzimática extracelular de leveduras isoladas da fermentação do cacau**. 2011. 83 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia, 2011.

SILVA, M. D. S. **Produção de biossurfactantes por leveduras isoladas do pólen apícola de *Melipona seminigra merrillae* da região do baixo Amazonas – AM**. 2013. 66 f. Dissertação (Mestrado em Biociência Animal) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2013.

SILVA-NEVES, K. C.; PORTO, A. L. F.; TEIXEIRA, M. F. S. Seleção de leveduras da Região Amazônica para produção de protease extracelular. **Acta Amazonica**, v. 36, n. 3, p. 299-306, 2006.

TERUYA, K.; MYOJIN-MAEKAWA, Y.; SHIMAMOTO, F.; WATANABE, H.; NAKAMICHI, N.; TOKUMARU, K.; TOKUMARU, S.; SHIRAHATA, S. Protective effects of the fermented milk kefir on X-ray irradiation-induced intestinal damage in B6C3F1 mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 36, n. 3, p. 352-359, dez. 2012.

THE VIRTUAL EDGE: Lab 13 Fungi, [20--?].**Uwyo.edu**. Disponível em: <http://www.uwyo.edu/virtual_edge/lab13/fungi_results.htm>. Acesso em 19 maio 2016

VENDRUSCOLO, F.; RIBEIRO, C. S.; ESPÓSITO, E.; NINOW, J. L. Tratamento biológico do bagaço de maçã e adição em dietas para alevinos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, PB, v. 13, n. 4, p. 487-493, 2009.

WESCHENFELDER, S.; PEREIRA, G. M.; CARVALHO, H. H. C.; WIEST, J. M. Caracterização físico-química e sensorial de Kefir tradicional e derivados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Porto Alegre, RS, v. 63, n. 2, p. 473-480, 2011.