

Área: Ciência dos Alimentos

**ATIVIDADE ANTAGONISTA DE LEVEDURAS ISOLADAS DE KEFIR
ARTESANAL FRENTE ÀS BACTÉRIAS PATOGÊNICAS**

**Elis Cristina Costa Gubert*, Alice de Souza Ribeiro, Leidi Daiana Preichardt, Neila
S.P.S. Richards, Maritiele Naissinger, Francieli Pozzobom ***

Curso de Tecnologia em Alimentos, Instituto Federal Farroupilha, Câmpus Santo Augusto, RS

**E-mail: elis_gubert@hotmail.com*

RESUMO – Kefir é o produto da fermentação do leite pelos grãos de kefir. Esses grãos contêm uma mistura simbiótica de bactérias e leveduras imersas em uma matriz composta de polissacarídeos e proteínas. Muitos benefícios à saúde humana têm sido atribuídos ao kefir, incluindo atividade antimicrobiana contra bactérias Gram positivas e Gram negativas. A atividade antimicrobiana de quatro cepas de leveduras isoladas de leite fermentado de kefir foi estudada através do teste do antagonismo, frente a cinco cepas de bactérias patogênicas de referência, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* e *enteritidis*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Clostridium sp.* Todas as cepas de leveduras isoladas apresentaram formação de halos de inibição, sendo possível observar diferentes capacidades de inibição frente às cepas patogênicas de importância em alimentos, o que caracteriza as mesmas como potenciais cepas probióticas.

Palavras-chave: Kefir, leveduras, antagonismo.

1 INTRODUÇÃO

O kefir é uma suspensão de micro-organismos simbiotes formada por um grande número de cepas de bactérias (predominantemente ácido-láticas – conhecidas pela sigla BALs) e de leveduras, ambos encapsulados em uma matriz de polissacarídeos secretados pelas bactérias. Produz uma bebida fermentada utilizada no ocidente por suas propriedades sensoriais e uso tradicional na medicina popular. Seu produto fermentado resulta em uma solução ácida contendo compostos aromáticos, gás carbônico e etanol (TOBA, ARHARA, ADACHI, 1990). O objetivo do trabalho foi verificar a capacidade das leveduras isoladas da produção de kefir artesanal da região Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul de exercer efeito antagônico frente às cepas patogênicas de referência.

A microbiota de leveduras do kefir varia conforme sua fonte de fabricação, mas tem sido relatada como uma mistura de espécies fermentadoras e não fermentadoras de lactose, identificadas como *Kluyromyces marxianus*, *C. kefir*, *C. pseudotropicalis*, *S. cerevisiae*, *S. exiguus* e *T. holmii*. As leveduras *Kluyromyces*

marxianus e *S. cerevisiae* também estão presentes na fermentação de kumys e lebem, outros leites fermentados (ROGINSKI, 1988; FLEET, 1990).

Fleet (1990) descreve algumas propriedades fisiológicas e bioquímicas das leveduras importantes para aplicação em produtos lácteos, como a fermentação ou assimilação da lactose; produção de enzimas proteolíticas extracelulares; produção de enzimas lipolíticas extracelulares; assimilação do ácido lático e do ácido cítrico e crescimento em temperaturas baixas..

2 MATERIAL E MÉTODOS

Determinação da atividade antagonista das BALs frente a micro-organismos patogênicos

Foram isoladas e purificadas 4 cepas de leveduras oriundas de leite fermentado por grãos de kefir de oito localidades distintas da região Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul. Esses isolados foram transferidos para caldo GYP (Oxoid®) e cultivados a 27 °C por 18 – 24 h para então, ser realizada a determinação da atividade antagonista. A atividade antagonista foi testada frente a linhagens de referência Gram positivas: *Listeria monocytogenes* ATCC 7466 e *Staphylococcus aureus* ATCC 1901, bem como Gram negativas: *E. coli* ATCC 8739, *Salmonella typhimurium* ATCC 13076 e *Salmonella enteritidis*.

O teste de antagonismo e a leitura dos halos de inibição foram realizados de acordo com o teste da gota (spot-on-the-lawn) proposto por Jacobsen et al. (1999). Uma alíquota de 5 µL de cada cultivo, em caldo MRS (Oxoid®), foi inoculada, em forma de gotas, em placas contendo ágar YM (Oxoid®). Após absorção das gotas, as placas foram incubadas a 35 °C em jarra de anaerobiose por 24 h. Decorrido este período, cada placa recebeu uma sobre camada de 10 mL de ágar BHI (Oxoid®) semi-sólido (0,8%) contendo aproximadamente 106 UFC.mL⁻¹ da cultura de referência previamente cultivada em caldo BHI (Oxoid®) por 24 h. Após solidificação do meio, as placas foram incubadas, em aerobiose, a 27 °C por 24 h. O resultado positivo para atividade antagonista em relação à cultura de referência e controle positivo foi determinado pela formação de halo de inibição. O diâmetro dos halos foi medido utilizando um paquímetro digital 200 MM-8” (Marberg® – China).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade antimicrobiana de leveduras foi descoberta inicialmente por Hayduck em 1909. Um pouco mais tarde, outros pesquisadores relataram a ação antagonista de leveduras contra outras leveduras, envolvendo a produção de metabólitos secundários (YOUNG & YAGIU, 1978; ROSINI & CANTINI, 1987; WALKER et al., 1995; SUZUKI et al., 2001; MARQUINA et al., 2002). Viljoen (2006) menciona ação de ácidos orgânicos, fatores antibióticos, ácidos voláteis, peróxido de hidrogênio, e vários outros substratos excretados no produto que podem ser responsáveis pelos efeitos antimicrobianos de leveduras presentes em bebidas e alimentos fermentados. No entanto, existem poucos estudos dedicados a identificar os mecanismos de inibição por leveduras.

Foram testados quatro isolados de kefir de produção artesanal. Na tabela 1, é possível observar o tamanho dos halos de inibição em todos os isolados. Os resultados demonstram que a sensibilidade às substâncias produzidas pelas leveduras e liberadas no meio extracelular varia de acordo com o patógeno e com o isolado do kefir.

As médias dos halos de inibição observadas frente ao *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enteritidis*, foram respectivamente 17,44 mm, 18,08 mm, 17,03 mm, 17,52 mm e 17,00 mm, autores como OLPLUSTIL, 2010, afirmam que halos são considerados inibitórios a partir de 6 mm, o que varia conforme as variáveis avaliadas. A diferença nas medidas dos halos de inibição dos isolados é sugestiva de que os micro-organismos pertencem a diferentes espécies ou linhagens.

Tabela 1 – Halos de inibição em milímetros (mm) de isolados de leveduras frente às cepas patogênicas de referência.

	Antimicrobiano				
	<i>S. aureus</i>	<i>C. perfringens</i>	<i>S. typhi</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. enteritidis</i>
Isolados					
KO2 A	15,82	16,20	16,05	15,15	16,49
KO2 B	16,92	15,68	17,68	18,33	19,15
KO2 C	16,81	15,15	18,21	16,04	17,03
KO2 D	19,54	18,48	15,77	15,39	16,61
KO2 E	17,76	18,44	17,45	16,73	17,86
KD1 A	16,21	16,06	14,22	20,9	14,90
KD1 B	18,00	19,72	18,29	17,45	17,67
KD1 C	17,52	18,19	16,70	17,76	14,29
KD1 D	17,46	17,01	16,71	14,98	17,22
KD1 E	17,12	17,10	16,74	15,19	15,73
KN2 A	17,52	21,72	18,67	20,04	17,58
KN2 B	16	20,18	17,18	20,06	16,36
KN2 C	16,72	18,01	16	19,56	17,90
KN2 D	20,92	19,09	18,40	17,66	18,30
KN2 E	17,31	20,10	17,38	17,62	17,97

4 CONCLUSÃO

De acordo com os dados encontrados referentes às medidas em milímetros dos halos de inibição, pode-se observar que todos os isolados apresentam atividade antagonista às cepas patogênicas de referência a que foram submetidas. Esse parâmetro é sugestivo de que as cepas de leveduras isoladas possuem um indicativo de

potencialidade probiótica, fato esse que deve ser investigado com testes complementares como sobrevivência a baixo pH, sais biliares, diferentes condições de temperatura, entre outros.

5 REFERÊNCIAS

FLEET, G. H. Yeasts in dairy products. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 68, p. 199-211, 1990.

HAYDUCK, F. Uber einen Hefengiftstoff in Hefe. **Wochenschr. Brau.** v. 26, p. 677-679, 1909.

JACOBSEN, C. N.; NIELSEN, V.R.; HAYFORD, A.E.; MØLLER, P.L.; MICHAELSEN, K.F.; PÆRREGAARD A.; SANDSTRÖM, B.; TVEDE, M.; JAKOBSEN, M. Strains in humans the colonization ability of five selected by in vitro techniques and evaluation of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. screening of probiotic activities of the colonization ability of five selected strains in humans. **Applied Environmental Microbiology**, v. 65, n. 11, p. 4949-4956, 1999.

MARQUINA, D., SANTOS, A., PEINADO, J. M. Biology of killer yeasts. **Int. Microbiol.** 5, 65-7110.1007/s10123-002-0066-z, 2002.

OLPLUSTIL, C. P. et al. **Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica**. 3.ed. Sarvier: São Paulo, 2010.

ROGINSKI, H. **Australian Journal of Dairy Technologie**, v.25, p. 297, 1998.

ROSINI, G., CANTINI, M. Killer character in *Kluyveromyces* yeasts: activity on *Kloeckera apiculata*. **FEMS Microbiol. Lett.** 44, 81-8410.1111/j.1574-6968.1987.tb02247.x, 1987.

SUZUKI C., ANDO Y., MACHIDA S. Interaction of SMKT, a killer toxin produced by *Pichia farinosa*, with the yeast cell membranes. **Yeast** 8, 1471-147810.1002/yea.791, 2001.

TOBA, T.; ARHARA, K.; ADACHI, S. Distribution of microorganisms with particular reference to encapsulated characters of fermented milks. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 10, n. 3-9, p. 219-224, 1990.

VILJOEN, B. Yeast ecological interactions. Yeast-yeast, yeast-bacteria, yeast-fungi interactions and yeasts as biocontrol agents. Em: QUEROL, A. e FLEET, H. **Yeasts in Food and Beverages**. Springer-Verlag, Berlin, p.83 - 110, 2066.

WALKER G. M., MCLEOD A. H., HODGSON V. J. Interactions between killer yeasts and pathogenic fungi. **FEMS Microbiol. Lett.** 127, 213-22210.1111/j.1574-6968.1995.tb07476.x, 1995.

YOUNG T. W., YAGIU M. A comparison of the killer character in different yeasts and its classification.

Antonie Van Leeuwenhoek 44, 59–7710.1007/BF00400077, 1978.