

Comparação da composição microbiana e atividade antimicrobiana de kefir de origem artesanal com kefir de origem industrial

Palavras-Chave: PROBIÓTICOS, *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, KEFIR

Autoras:

**KAROLINE DA SILVA FARIAS, FCF – UNICAMP;
Dra. VALQUÍRIA APARECIDA MATHEUS (Coorientadora), FCF – UNICAMP;
Profa. Dra. KARINA COGO MÜLLER (orientadora), FCF - UNICAMP**

INTRODUÇÃO:

Um probiótico é um suplemento alimentar que contém microrganismos vivos em uma associação simbiótica, proporcionando benefícios ao hospedeiro (Sharifi et al., 2017; Vieira et al., 2021). O kefir é uma bebida probiótica que contém bactérias ácido-acéticas (BAA), bactérias ácido-láticas (BAL) e leveduras fermentadoras e não fermentadoras de lactose, todas coexistindo em uma associação simbiótica (Garrote et al., 2010; Leite et al., 2013).

Estes microrganismos se organizam em pequenos grãos com aspecto de couve-flor. Quando adicionados ao leite fresco ou à água, geralmente servem como cultura inicial no processo de produção do kefir (Slattery et al., 2019). Após a fermentação, os grãos são recuperados por meio de coagem (Ratray e O'Connel, 2011). A produção de kefir pode ser realizada de forma artesanal ou industrial. A produção artesanal é diretamente influenciada pelos microrganismos presentes nos grãos, pelas condições de processamento e pelo armazenamento, fatores que podem interferir na sua qualidade. Já a produção industrial é padronizada, utilizando culturas puras de microrganismos selecionados para fermentação controlada (Ratray e O'Connel, 2011).

O kefir possui propriedades fisiológicas, profiláticas e terapêuticas (Rosa et al., 2017), promovidas pela ação sinérgica dos microrganismos em sua composição. A diversidade de compostos bioativos produzidos durante a fermentação (Azizi et al., 2021) contribui para essas propriedades. Entre as principais, destacam-se a modulação da microbiota gastrointestinal (Frag et al., 2020) e a melhora na digestão e na tolerância à lactose (Weschenfelder et al., 2011). Estudos mostram que o kefir possui ações anti-inflamatórias (Rodrigues et al., 2005), antioxidantes (Liu, Chen e Lin, 2005), antifúngicas e antimicrobianas (Tenorio-Salgado et al., 2021). Além disso, foi demonstrada ação antimicrobiana do kefir contra bactérias resistentes a antimicrobianos, como *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (Vieira et al., 2021; González-Orozco et al., 2022).

Portanto, a composição microbiana do kefir pode variar devido a fatores como a origem dos grãos, as condições de fermentação e os ingredientes utilizados (Frag et al., 2020). Essas variações influenciam a composição microbiana e podem resultar em diferentes compostos bioativos (Vieira et al., 2021). No entanto, não há estudos comparando kefir artesanal e kefir industrializado quanto a composição microbiana e a atividade antimicrobiana. Assim, o objetivo deste estudo é comparar a atividade antimicrobiana do kefir artesanal com o kefir industrializado, analisando a composição qualitativa desses produtos em relação a diferentes bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

METODOLOGIA:

O presente projeto contemplou avaliar a composição microbiana das amostras de kefir lácteo através da padronização do kefir artesanal, caracterização presuntiva e avaliação do pH, assim como, avaliar a atividade antimicrobiana por meio do ensaio de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM). Para a condução dos ensaios, foram utilizadas duas amostras de Kefir industrializados das marcas Atilatte® Reggula® e duas amostras de Kefir artesanal da empresa KefirBr (Fortaleza, Ceará) e doados pelo Prof. Carlos Ueira Vieira, do Instituto de Biotecnologia, da Universidade Federal de Uberlândia.

- **Padronização do Kefir artesanal:**

A padronização das condições de processamento e armazenamento do kefir artesanal foi realizada com o objetivo de manter a composição microbiana e os compostos bioativos que são produzidos por estes no processo de fermentação semelhantes nas duas amostras utilizadas nos experimentos. As garrafas de kefir industrial e os tubos Falcon de kefir artesanal foram congelados a -20 °C e, um dia antes dos experimentos, transferidos para a geladeira (4 °C - 10 °C). Após descongelamento, os grãos de kefir artesanal foram lavados com leite a 40 °C, filtrados, e misturados com 3x seu peso em leite e leite em pó. Fermentaram por 48 h em temperatura ambiente. O processo foi repetido três vezes antes das análises.

- **Análise da Composição microbiana das amostras de kefir artesanal e industrial**

A caracterização presuntiva dos microrganismos foi realizada com o objetivo de identificar os tipos de microrganismos pertencentes ao processo de fermentação. As amostras de kefir foram diluídas em 900µl de solução salina 0,85% para quantificação total de microrganismos, de bactérias ácido-láticas e leveduras (de Lima et al., 2018). Para a quantificação total de microrganismos, as amostras diluídas foram cultivadas em meio Ágar Brain Heart Infusion (BHI ágar, Difco Co., Detroit, MI, USA) com 5% de sangue de carneiro desfibrinado e incubadas em aerobiose, a 35 °C por 48 h. Para quantificação de bactérias ácido-láticas, as amostras diluídas foram plaqueadas e incubadas sob condições aeróbicas em Ágar Man Rogosa Sharpe (MRS ágar, Kasvi, São José dos Pinhais, PR) por 48 h a 35 °C em 5% de CO₂. A contagem de leveduras foi determinada utilizando meio Ágar Sabouraud (SB ágar, Himedia®, Mumbai, Índia), incubadas em aerobiose por 5 dias a 35 °C. Todos os resultados da contagem microbiológica foram expressos como log₁₀ UFC/mL e realizados em duplicatas. Foi realizada a técnica de coloração de Gram, com o objetivo de classificar as espécies presentes nas amostras.

- **Avaliação do pH**

Para avaliar a conversão da lactose presente no leite, as amostras de Kefir artesanal e industrial foram analisadas quanto ao seu pH, utilizando um pHmetro de bancada Ionlab PHB-500, nos tempos de 7, 14, 21 e 28 dias.

- **Determinação da Atividade Antimicrobiana do Kefir Artesanal e Industrial**

Para a avaliação da atividade antimicrobiana através dos ensaios de CIM, foram utilizadas as seguintes cepas bacterianas: *Escherichia coli* ATCC 10536; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25619; *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Streptococcus pyogenes* ATCC 8668. As cepas bacterianas foram armazenadas em meio BHI com 20% de glicerol, à -80 °C. As bactérias foram cultivadas em meio seletivo e incubadas em aerobiose (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*) ou em 5% de CO₂ (*S. pyogenes* e *S. typhimurium*).

As alíquotas de kefir artesanal e industrial foram centrifugadas a 2800 x g por 20 minutos a 4°C (Eppendorf 5804R) e o sobrenadante foi filtrado através de uma membrana de 0,22 µm de diâmetro. Os ensaios foram realizados através de diluições seriadas feitas em placas de 96 poços, utilizando as alíquotas de Kefir artesanal e industrial nas porcentagens de 25% a 0,78% em um volume final de 200 µL, segundo o protocolo da Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI – M07-A9, 2012). Foi utilizado o meio de cultura Mueller Hinton Caldo (MHB, Kasvi, São José dos Pinhais, PR) e o inóculo bacteriano foi preparado a partir de culturas de *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. pyogenes* e *S. typhimurium* em meio Ágar seletivo com 24 h de crescimento.

Posteriormente, as colônias isoladas foram coletadas e suspensas no meio MHB, com densidade óptica de 0,1 em 660 nm. As placas foram incubadas por 24 h, após esse período, a CIM foi verificada por leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 660 nm e a Concentração bactericida mínima (CBM) foi verificada inoculando-se 10 µl de cada poço da microplaca em meio Ágar MHB. As microplacas utilizadas foram divididas nos seguintes grupos experimentais:

- Grupo teste (A, B, C e D): Amostra de Kefir Artesanal ou Industrial + Bactéria + MHB
- Grupo controle de crescimento positivo (E, F): Bactéria + MHB
- Grupo controle negativo (G, H): Amostra de Kefir Artesanal ou Industrial + MHB

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

- **Análise da Composição microbiana das amostras de kefir artesanal e industrial**

Com base nas contagens das colônias isoladas (Figura 1) das diluições de 1:100, 1:1.000 e 1:10.000, observou-se que a quantidade de bactérias variou conforme o tempo de armazenamento. Diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$ e $p < 0,001$, One-Way ANOVA, pós-teste Tukey) foram analisadas entre as quatro amostras contendo os meios Ágar MRS e Ágar SB, nesta ordem. As amostras de KefirBr mantiveram números incontáveis de UFC/mL nos dias 21 e 28 de armazenamento, enquanto as amostras de Kefir Doado apresentaram valores contáveis de UFC/mL apenas até o 14º dia, caindo para menos de 100 após esse período. Esses resultados sugerem que a biomassa dos grãos interfere no tempo de fermentação do leite e na quantidade necessária de ativação dos grãos. O tempo de fermentação foi de 72 h, com biomassa de 203,13 g para Kefir Doado e 4,35 g para KefirBr. A hipótese levantada é que o aumento da viscosidade faz com que as bactérias no leite fermentado se condensam em pequenos grânulos, não se solubilizando durante a agitação com vórtex, o que afeta a contagem de colônias devido à insuficiência de UFC/mL na diluição mãe (1:10) para o crescimento bacteriano adequado.

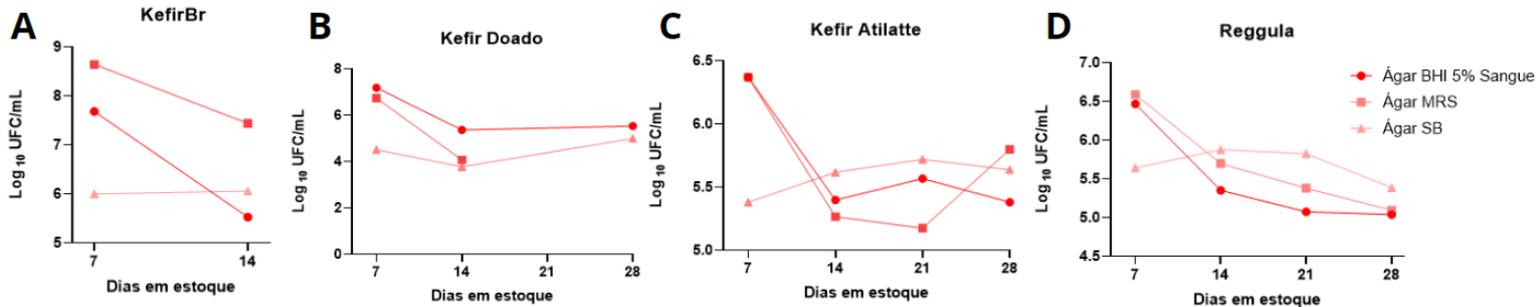


Figura 1: Média das contagens de microrganismos em Log₁₀ por UFC/mL das amostras em relação ao tempo de armazenamento, durante 7, 14, 21 e 28 dias à -20°C. (A) Média da contagem das amostras de KefirBr, sendo os resultados: Ágar BHI 5% sangue da diluição de 1:10.000 e 1:1.000, Ágar SB da diluição de 1:1.000 e Ágar MRS da diluição de 1:10.000. Os resultados dos dias 21 e 28 foram incontáveis. (B) Média da contagem das amostras de Kefir Doado, sendo os resultados: ágar BHI 5% sangue da diluição de 1:10.000, ágar SB da diluição de 1:100 e ágar MRS da diluição de 1:10.000 e 1:1.000. Não houve crescimento nos dias 21 e 28 no meio ágar MRS e no dia 21, para os meios SB e BHI 5% sangue. (C) Média da contagem das amostras de Kefir Atilatte, sendo os resultados: ágar BHI 5% sangue da diluição de 1:10.000 e 1:1.000, ágar SB da diluição de 1:1.000 e ágar MRS da diluição de 1:10.000 e 1:1.000, respectivamente. (D) Média da contagem das amostras de Kefir Reggula, sendo os resultados: ágar BHI 5% sangue da diluição de 1:10.000 e 1:1.000, ágar SB da diluição de 1:1.000 e ágar MRS da diluição de 1:10.000 e 1:1.000.

As médias e o desvios padrão das contagens do sétimo dia de armazenamento para microrganismos totais, BAL e leveduras foi de aproximadamente $1,56 \times 10^7 \pm 1,20 \times 10^7$, $5,58 \times 10^6 \pm 1,41 \times 10^5$ e $3,30 \times 10^4 \pm 1,56 \times 10^4$ UFC/mL, respectivamente, para o Kefir Doado. Por outro lado, as médias e os desvios padrão da contagem do KefirBr foram de $4,85 \times 10^7 \pm 7,78 \times 10^6$, $4,40 \times 10^8 \pm 4,91 \times 10^8$ e $1,00 \times 10^6 \pm 1,70 \times 10^5$ UFC/mL. As amostras de kefir industrial mantiveram uma população bacteriana relativamente estável durante o período de armazenamento, com contagens inferiores a 100 colônias. Isso indica que as culturas foram selecionadas de forma controlada, sem crescimento excessivo de microrganismos, característico da produção industrial de produtos lácteos fermentados. As médias e o desvios padrão das contagens presuntivas do sétimo dia de armazenamento para microrganismos totais, BAL e leveduras de $1,50 \times 10^5 \pm 7,07 \times 10^4$, $2,35 \times 10^6 \pm 2,12 \times 10^5$ e $1,90 \times 10^5 \pm 7,70 \times 10^4$ UFC/mL, respectivamente para o Kefir Atilatte, enquanto para o Kefir Reggula foi de $2,95 \times 10^6 \pm 2,76 \times 10^6$, $3,90 \times 10^6 \pm 1,27 \times 10^6$ e $4,40 \times 10^5 \pm 9,90 \times 10^4$ UFC/mL.

Os resultados da caracterização presuntiva das amostras de KefirBr e dos kefirs industriais são consistentes com os dados de Moslehishad et al. (2013), que relatou que durante o armazenamento de leite fermentado a baixas temperaturas, a atividade proteolítica das bactérias do ácido lático continua liberando peptídeos que atuam como fatores de crescimento, mantendo a cultura estável por mais tempo. Além disso, os resultados obtidos das amostras de kefir industrial corroboram com Walsh et al. (2016), que relatou que as bactérias do ácido lático do gênero *Lactobacillus* são encontradas nas fases iniciais da fermentação, o que explica a alta queda observada no gráfico (Figura 1C e 1D).

Com base no plaqueamento em ágar MRS para a identificação de BAL, observou-se que a maioria das colônias formadas eram arredondadas e esbranquiçadas com superfície brilhosa, enquanto outras eram opacas. As amostras de kefir industrial mostraram colônias com bordas onduladas, parecidas com flores. Observou-se a presença de estreptobacilos em forma de bastonetes, estreptococos e cocos Gram-positivos em todas as amostras testadas. Nas lâminas contendo amostras de kefir industrial, também foram identificados cocos Gram-negativos.

Através da análise do plaqueamento em meio ágar SB, foram observadas duas formas diferentes de colônias: algumas puntiformes e transparentes, sem pigmentação, e outras pequenas, com superfície opaca, forma circular e convexa, com pigmentação amarelada. As colônias isoladas evidenciaram a presença de estirpes bacterianas em forma de bacilos e estreptobacilos Gram-positivos em todas as amostras. Também foram observados diplobacilos Gram-positivos nas lâminas contendo amostras de kefir industrial. Por meio do plaqueamento em ágar BHI 5% de sangue, observou-se diferentes tipos de colônias: algumas pequenas, com superfície convexa e opaca/brilhosa de forma circular, e outras arredondadas e opacas. As colônias isoladas mostraram a presença de estirpes bacterianas em forma de diplococos, estafilococos e estreptococos Gram-positivos em todas as amostras.

• Avaliação do pH

Com base nos dados coletados das alterações de pH das amostras em relação ao tempo de armazenamento (Figura 2), foi possível observar que tanto o kefir artesanal quanto o industrial mantiveram um pH ácido. Isso indica a presença de bactérias ácido-láticas (BAL) e leveduras fermentadoras de leite, responsáveis pela conversão da lactose do leite integral pasteurizado em ácido lático e pela produção de etanol e CO₂ a partir do ácido pirúvico (Magalhães et al., 2011; Leite et al., 2013). Observou-se também que o Kefir Doado, por ter sido ativado mais vezes que o KefirBr, manteve o menor pH entre as amostras, sugerindo que o aumento da biomassa dos grãos de kefir durante o processo de fermentação influencia na conversão dos metabólitos ativos.

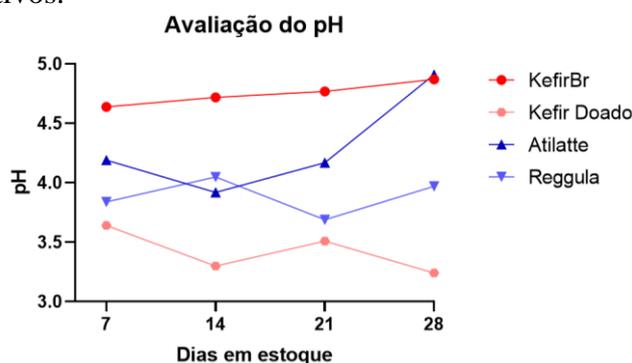


Figura 2: Alterações do pH das amostras analisadas em relação ao tempo de armazenamento, durante 7, 14, 21 e 28 dias à -20°C.

• Determinação da Atividade Antimicrobiana do Kefir Artesanal e Industrial

Os resultados dos ensaios de CIM, demonstraram que as amostras de kefir analisadas possuem atividade antimicrobiana inibitória contra as cepas de *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. pyogenes* e *S. typhimurium*. De forma geral, a concentração de 25%, tanto das duas amostras de kefir artesanal quanto das duas amostras do kefir industrial, foram as que promoveram maior interferência no crescimento bacteriano. No entanto, as demais concentrações também promoveram alterações no crescimento, conforme demonstrado na Figura 3. Esses resultados estão de acordo com o estudo de Tenorio-Salgado et al. (2021), que observaram que os extratos de kefir artesanal inibiram as cepas bacterianas de *S. typhimurium*, *S. aureus*, *E. coli* e *B. subtilis* tanto não diluídos quanto nas diluições de 1:2 e 1:4. Ensaios de CIM, realizados em diferentes dias utilizando o mesmo sobrenadante das amostras, armazenado a -20 °C, demonstraram variação na interferência do crescimento bacteriano em relação aos resultados apresentados (figura 3), porém mantiveram a diferença significativa ($p < 0,001$ e $p < 0,0001$, Two-Way ANOVA, pós-teste Shapiro-Wilk) entre todas as concentrações. A amostra de kefir doado mostrou atividade bactericida mínima na concentração de 25%, contra *E. coli*, pois não houve crescimento de colônias na placa contendo meio ágar MHB semeada com 10 µL da amostra após 24 h, no entanto, a amostra de Kefir Br e as duas amostras de kefir industrial não tiveram valor de CBM.

O espectro da atividade antimicrobiana pode estar associado à presença de metabólitos ativos, como ácido lático, ácido acético, peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, etanol, diacetil e peptídeos (bacteriocinas), juntamente com a redução do pH, que cria condições desfavoráveis para a proliferação de algumas cepas bacterianas, conforme descrito por Biadala et al. (2020) e Azizi et al. (2021). Por fim, as diferenças entre os microrganismos observados nas amostras de kefir artesanal e industrial, confirmam que as condições do processo de fermentação, incluindo o tempo de fermentação, tipo de leite, temperatura, armazenamento e origem dos grãos influenciam na composição microbiana da microbiota do kefir (Batista, et al. 2021).

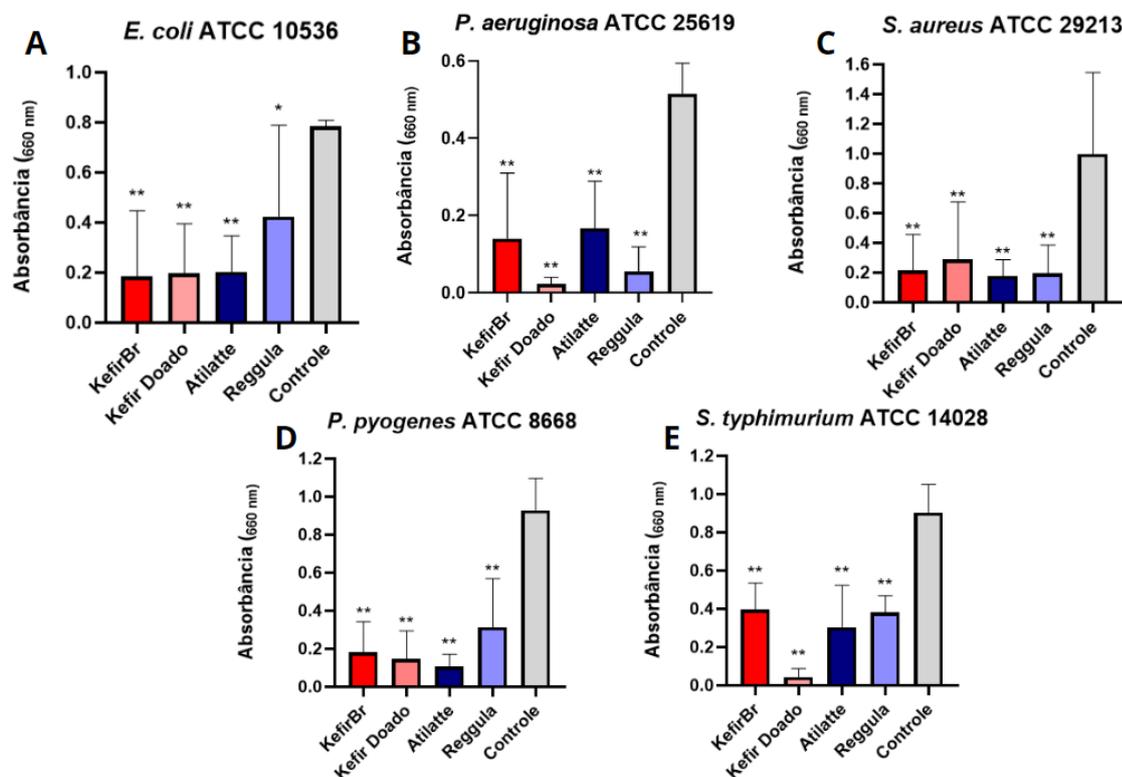


Figura 3: Média das absorbâncias a 660 nm das amostras de kefir artesanal e industrial nas concentrações de 12,5%. O valor de MIC encontrado foi de 25%, entretanto, as demais concentrações de sobrenadante também promoveram alteração do crescimento e, consequentemente, diminuição do valor de absorbância das cepas bacterianas. Todas as amostras foram realizadas em duplicata em três experimentos e descontado o controle negativo (sem a presença de bactéria). O controle é a absorbância das cepas bacterianas sem a presença de sobrenadante. * $p < 0,001$ e ** $p < 0,0001$ (Two-Way ANOVA, pós-teste Shapiro-Wilk) em relação ao grupo controle.

CONCLUSÕES:

A padronização das amostras de kefir artesanal permitiram observar que a biomassa dos grãos influencia diretamente na composição microbiana do leite fermentado. Além disso, o kefir de origem artesanal possui contagens elevadas de microrganismos por UFC/mL. As amostras de kefir industrial mantiveram contagens baixas de colônias, devido a utilização de culturas bacterianas de forma controlada. A atividade antimicrobiana foi observada nas quatro amostras, devido à presença de metabólitos ativos dos microrganismos presentes, com o CIM encontrado de 25%. Estudos adicionais deverão ser realizados para caracterizar com maiores detalhes quais tipos de substâncias são responsáveis pela atividade antimicrobiana das amostras.

BIBLIOGRAFIA

1. Azizi, Nor Farahin et. al. Kefir and Its Biological Activities. *Foods*, 2021 May 27;10(6):1210
2. Batista LL, et. al. Kefir metabolites in a fly model for Alzheimer's disease. *Sci Rep*. 2021 May 27;11(1):11262.]
3. Biadała, A., Szablewski, T., Lasik-Kurdyś, M. et al. Antimicrobial activity of goat's milk fermented by single strain of kefir grain microflora. *Eur Food Res Technol* 246, 1231–1239 (2020).
4. Farag MA, et. al. The Many Faces of Kefir Fermented Dairy Products: Quality Characteristics, Flavour Chemistry, Nutritional Value, Health Benefits, and Safety. *Nutrients*. 2020 Jan 28;12(2):346.
5. Garrote GL, Abraham AG, De Antoni G (2010) Microbial Interactions in Kefir: A Natural Probiotic Drink. In F. Mozzi, R. R. Raya & G. M. Vignolo (Eds.), *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria -Novel Applications* pp. 327-340.
6. González-Orozco, Brianda D. et al. Invited review: milk kefir microbiota::direct and indirect antimicrobial effects. *Journal of Dairy Science*, 2022 may; 105(5):3703-3715.
7. Leite, Analy Machado de Oliveira, et. al. Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2013 oct 9;44(2):341-349
8. Liu, Je-Ruei; Chen, Ming-Ju; Lin, Chin-Wen. Antimutagenic and Antioxidant Properties of Milk–Kefir and Soymilk–Kefir. *Journal of Agricultural And Food Chemistry*. 2005 mar. 2;53(7):2467-2474
9. Magalhães KT, et. al. Brazilian Kefir: Structure, Microbial Communities and Chemical Composition. *Braz J Microbiol*. 2011;42:693–702.
10. Moslehishad M, et. al. (2013) The comparative assessment of ACE-inhibitory and antioxidant activities of peptide fractions obtained from fermented camel and bovine milk by *Lactobacillus rhamnosus* PTCC 1637. *29(2):82–87*.
11. Rattray FP, O'Connell MJ. Fermented Milks Kefir. In: Fukay JW, editor. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. 2th ed. Academic Press; San Diego, USA: 2011. pp. 518–524
12. Rodrigues, K. L., Caputo, L. R., Carvalho, J. C. T., et al. (2005). Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract, *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2005 may;25(5):404–408.
13. Rosa, Damiana D. et. al. Milk kefir: nutritional, microbiological and health benefits. *Nutrition Research Reviews*, 2017 fev. 22;30(1):82-96
14. Slattery, Conor; Cotter, Paul D.; O'toole, Paul W.. Analysis of Health Benefits Conferred by *Lactobacillus* Species from Kefir. *Nutrients*. 2019 jun. 1;11(6):1252
15. Sharifi, Mohammadreza; et. al. Kefir: a powerful probiotic with anticancer properties. *Medical Oncology*. 2017 set. 27;34(11):1-7
16. Tenorio-Salgado S, et. al.. Metagenomic analysis and antimicrobial activity of two fermented milk kefir samples. *Microbiologyopen*. 2021 Mar;10(2):e1183.
17. Vieira, Carla P. et. al. Bioactive Compounds from Kefir and Their Potential Benefits on Health: a systematic review and meta-analysis. *Oxidative Medicine And Cellular Longevity*, 2021 out. 27;2021:1-34.