



Associação do efeito antimicrobiano e propriedades físico-químicas de bebidas fermentadas a partir de grãos de kefir

Louise Thomé Cardoso¹; Cristiane Cassales Pibernat²; Karla Joseane Perez³

¹ Engenheira de Bioprocessos e Biotecnologia - UERGS, E-mail: louise.thome@gmail.com.

² Professora Assistente da área Engenharia Química da Universidade Estadual do Rio Grande do Sul - UERGS, E-mail: cristiane-pibernat@uergs.edu.br.

³ Professora Adjunta da área Ciências Biológicas da Universidade Estadual do Rio Grande do Sul - UERGS, E-mail: karla-perez@uergs.edu.br.

Sumário: Os grãos de kefir são constituídos de bactérias ácido-lácticas, ácido-acéticas e leveduras imersas em matriz proteica e polissacarídica. Estes microrganismos são responsáveis pela produção de bebidas fermentadas. Atualmente, estudos demonstram que o consumo regular deste fermentado proporciona benefícios à saúde associados a microbiota. Assim, realizou-se a contagem de microrganismos presentes nas amostras e colimetria, avaliou-se a ação antimicrobiana contra bactérias patogênicas à saúde humana (*E. coli*, *S. Enteritidis*, *S. aureus*, *B. cereus* e *L. monocytogenes*) em ensaios de antagonismo em placa e as propriedades físico-químicas das bebidas fermentadas a partir de grãos de kefir artesanais (K1C, K3F e K4I) e suas frações (soro e extrato) e comparou-se com um produto comercial. A contagem de microrganismos da amostra K3F apresentou maior concentração de psicotróficos ($5,4 \cdot 10^7$ UFC.mL⁻¹), a K1C de leveduras ($1,3 \cdot 10^7$ UFC.mL⁻¹), a K4I de mesófilos ($2,1 \cdot 10^8$ UFC.mL⁻¹) e de bactérias ácido-lácticas ($2,7 \cdot 10^9$ UFC.mL⁻¹). As propriedades físico-químicas relevantes foram: glicídios (3,44 %), lipídios (2,87 %) e proteínas solúveis (0,353 %) da bebida comercial; acidez (0,995 % de ácido láctico) e proteínas totais (3,58 %) da K1C; e pH da bebida K3F (4,51). Assim, associou-se o maior conteúdo de acidez, lipídios e proteínas das amostras à elevada inibição das bactérias testadas.

Palavras-chave: antimicrobiano; bebida fermentada; kefir; probióticos

INTRODUÇÃO

A valorização de alimentos saudáveis com propriedades nutricionais e terapêuticas é conhecida há milhares de anos. Um destes é o kefir, com características probióticas e atrativas ao consumo devido à sua composição físico-química e sua microbiota constituída por uma associação simbiótica de bactérias ácido-lácticas, leveduras e bactérias ácido-acéticas (TURKMEN, 2017).

Uma interessante funcionalidade do kefir é a capacidade de inibir o crescimento de microrganismos patógenos ao ser humano. Relaciona-se este efeito, principalmente, as bactérias ácido-lácticas com a produção de substâncias bioativas e de ácidos orgânicos (láctico e acético) (KIM *et al.*, 2016). Determinados autores analisaram as propriedades físico-químicas da bebida produzida pela fermentação do leite e relatam que há diferenças substanciais no teor de proteínas, carboidratos e lipídios entre kefir elaborado com diferentes leites (SARKAR, 2007). Existem poucos estudos com o uso direto de bebidas e de suas frações (soro e



extrato) fermentadas de kefir de leite, testadas contra o crescimento de microrganismos patogênicos. Além disso, em virtude da diversidade da composição microbiana presente nos grãos de kefir, há a possibilidade de diferenças significativas nos produtos fermentados artesanais e nos comerciais.

Assim, visando analisar a bebida fermentada e suas frações (soro e extrato) de kefir de leite em comparação a bebida comercial, realizou-se contagens microbianas dos fermentados e avaliou-se a ação antimicrobiana dos fermentados contra microrganismos relatados em problemas gastrointestinais (*Escherichia coli*, *Salmonella enterica* ser. Enteritidis, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes*). Além disso, foram realizados os ensaios físico-químicos (glicídios, lipídios, acidez, pH e proteínas) das amostras com a finalidade de relacionar essas propriedades com o efeito antimicrobiano das bebidas artesanais e da comercial.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no período de agosto a dezembro de 2019 no Laboratório de Biotecnologia da UERGS - Unidade em Novo Hamburgo. As amostras K1C e K3F foram adquiridas de consumidores no município de Porto Alegre/RS e a K4I foi doada por uma agroindústria da região do Vale do Taquari/RS. O leite usado na fermentação foi do tipo UHT semidesnatado da marca Santa Clara e o produto comercial da marca Keiff® integral sem adição de açúcar, ambos adquiridos em mercado local.

As etapas de manutenção e preparo do kefir foram realizadas pela adaptação do método descrito por Santos (2013). A inoculação de 5% dos grãos em leite UHT semidesnatado consistiu na fermentação láctica por 24 h a 24 °C em incubadora. Após esse período, observou-se a coagulação do leite e procedeu-se à maturação por 24 h a 7 °C em incubadora. A tamisagem das amostras possibilitou a aquisição da bebida fermentada. A partir desta, por centrifugação a 3300 rpm por 20 min, obteve-se duas frações: o extrato (fase sólida) e o soro (fase líquida) de kefir.

As bebidas fermentadas, segundo Portaria nº101 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), foram submetidas a contagem de mesófilos, de psicotróficos, de bactérias lácticas, de leveduras e colimetria (BRASIL, 1993).

Foram testadas bactérias associadas a problemas gastrointestinais, tais: *E. coli* ATCC 25922, *S. Enteritidis* ATCC 14078, *S. aureus* isolado clínico, *B. cereus* ATCC 14579 e *L. monocytogenes* ATCC 7644. Os microrganismos foram ativados em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) incubados a 37 °C em agitador *shaker* por 18h a 120 rpm. Padronizou-se o crescimento em espectrofotômetro a 600 nm para 10^7 UFC.mL⁻¹. Os ensaios do espectro antibacteriano foram avaliados pelo método de Jacobsen *et al.*, (1999), com adaptações. A leitura dos resultados foi realizada pela medição do halo inibitório ao redor dos inóculos de kefir com o auxílio do *software* ImageJ.

As propriedades físico-químicas das amostras foram determinadas pelos ensaios de glicídios redutores a glicose, lipídios, acidez titulável, pH (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008), proteínas solúveis (BRADFORD, 1976) e proteínas totais (BRASIL, 2014). Após a obtenção dos resultados, realizou-se a Análise de



Variância (ANOVA) e a significância estatística pelo teste de Tukey a 5% ($p < 0,05$) no *software* Excel.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segundo a Instrução Normativa (IN) n° 46 do MAPA, a bebida fermentada de kefir deve apresentar contagem mínima de 10^4 UFC.mL⁻¹ de leveduras e 10^7 UFC.mL⁻¹ de bactérias ácido-lácticas (BALs) (BRASIL, 2007). Assim, todas as amostras artesanais (K1C, K3F, K4I) e o produto comercial, atenderam a este critério, conforme Tabela 1.

Segundo a IN n° 46 do MAPA, em relação a leites fermentados, o limite máximo de aceitação para coliformes é de 100 UFC.mL⁻¹ e de *E. coli* é de 10 UFC.mL⁻¹. Portanto, os resultados para *E. coli* indicam condições higiênico-sanitárias adequadas durante a manipulação e preparo das amostras.

Tabela 1. Resultados de contagem de microrganismos nas bebidas fermentadas de kefir

	K1C (UFC.mL ⁻¹)	K3F (UFC.mL ⁻¹)	K4I (UFC.mL ⁻¹)	K. Comercial (UFC.mL ⁻¹)
Mesófilos	$1,5 \cdot 10^5$	$2,6 \cdot 10^6$	$2,1 \cdot 10^8$	$2,7 \cdot 10^7$
Psicrotróficos	$1,1 \cdot 10^5$	$5,4 \cdot 10^7$	$1,7 \cdot 10^5$	$2,6 \cdot 10^7$
Leveduras	$1,3 \cdot 10^7$	$2,4 \cdot 10^6$	$1,2 \cdot 10^6$	$9,7 \cdot 10^4$
BALs	$1,1 \cdot 10^9$	$7,5 \cdot 10^8$	$2,7 \cdot 10^9$	$4,0 \cdot 10^7$
Coliformes totais	$1,0 \cdot 10^3$	$9,6 \cdot 10^4$	<10 est**	<10 est**
<i>E. coli</i>	<10 est**	<10 est**	<10 est**	<10 est**

Obs.: **Nenhuma Unidade Formadora de Colônia (UFC) detectada.
Fonte: Autoras (2019).

Os resultados do efeito antimicrobiano dos fermentados a partir de grãos de kefir estão na Tabela 2. Verificou-se que a amostra K3F e K4I, ambas na fração extrato, demonstram maior atividade antimicrobiana tanto para bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas. Enquanto, K. Comercial apresentou maiores inibições para *L. monocytogenes* e *S. Enteritidis*, ambas na fração extrato.

Tabela 2. Resultados da atividade antimicrobiana dos fermentados de kefir

Microrganismo	Diâmetros de inibição (mm)					
	K1C			K3F		
	Soro	Extrato	Bebida	Soro	Extrato	Bebida
<i>E. coli</i>	$21,3 \pm 1,7^e$	$17,6 \pm 0,8^{cd}$	$21,4 \pm 1,5^e$	$16,7 \pm 1,8^{de}$	$26,7 \pm 1,2^g$	$21,6 \pm 1,5^f$
<i>B. cereus</i>	$19,1 \pm 1,7^{de}$	$24,6 \pm 2,8^f$	$18,6 \pm 0,7^d$	$12,8 \pm 1,2^{ab}$	$17,9 \pm 1,7^e$	$17,9 \pm 1,1^e$
<i>S. Enteritidis</i>	$13,6 \pm 0,9^b$	$24,5 \pm 1,4^f$	$17,6 \pm 0,7^{cd}$	$17,3 \pm 2,4^{de}$	$27,1 \pm 1,1^g$	$25,6 \pm 2,4^g$
<i>S. aureus</i>	$10,2 \pm 0,7^a$	$10,3 \pm 1,6^a$	$19,3 \pm 1,7^{de}$	$16,5 \pm 1,7^{cde}$	$13,7 \pm 1,5^{bc}$	$10,7 \pm 0,7^a$
<i>L. monocytogenes</i>	$14,3 \pm 0,6^b$	$21,3 \pm 1,9^e$	$15,9 \pm 1,4^{bc}$	$16,4 \pm 1,7^{cde}$	$14,7 \pm 1,7^{bcd}$	$21,0 \pm 1,7^f$
	K4I			K.Comercial		
	Soro	Extrato	Bebida	Soro	Extrato	Bebida
<i>E. coli</i>	$19,0 \pm 2,6^{cde}$	$24,0 \pm 2,5^{gh}$	$20,2 \pm 0,8^{ef}$	$9,4 \pm 0,6^{bc}$	$8,1 \pm 1,2^b$	$14,0 \pm 2,2^{de}$
<i>B. cereus</i>	$15,2 \pm 1,3^{ab}$	$26,7 \pm 1,7^h$	$22,8 \pm 2,0^{fg}$	$3,9 \pm 1,0^a$	$14,2 \pm 1,0^{de}$	$15,2 \pm 1,4^e$
<i>S. Enteritidis</i>	$19,9 \pm 1,2^{de}$	$25,3 \pm 1,8^{gh}$	$25,9 \pm 1,4^{gh}$	$11,3 \pm 1,9^c$	$29,0 \pm 1,4^h$	$19,8 \pm 1,0^f$
<i>S. aureus</i>	$17,4 \pm 1,7^{abcd}$	$14,7 \pm 1,0^a$	$18,5 \pm 1,9^{cde}$	$9,6 \pm 1,9^{bc}$	$4,4 \pm 0,6^a$	$11,8 \pm 1,8^f$
<i>L. monocytogenes</i>	$16,8 \pm 1,0^{abc}$	$20,2 \pm 1,0^{ef}$	$17,7 \pm 1,0^{bcde}$	$11,8 \pm 0,8^{cd}$	$25,5 \pm 1,6^h$	$16,4 \pm 1,8^e$

Obs.: Médias com sobrescritos com letras iguais são estatisticamente similares ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.

Fonte: Autoras (2019).



As propriedades físico-químicas das bebidas fermentadas com maiores teores foram: glicídios (3,44 %), lipídios (2,87 %) e proteínas solúveis (0,353 %) da bebida comercial; acidez (0,995 % de ácido láctico) e proteínas totais (3,58 %) da K1C; e pH da K3F (4,51).

Em relação aos resultados de glicídios, a bebida K. Comercial apresentou o maior teor (3,44 ± 0,05 %). Este fato, possivelmente, está associado a produção de *kefiran*. Rodrigues *et al.* (2005) ao testar o *kefiran*, produzido por isolados dos grãos de kefir de leite, o relacionou à inibição dos microrganismos. Entre todas as amostras, a acidez foi maior na amostra K1C (0,995 ± 0,008 g de ácido láctico/100 mL), fato que pode estar relacionado a maior inibição de *S. aureus*. Yüksekda, Beyatli e Aslim (2004) verificaram que microrganismos isolados dos grãos de kefir inibiram o crescimento de *S. aureus*.

Em relação aos extratos, a maior acidez foi do K. Comercial (0,262 ± 0,046 g de ácido láctico/100 mL). Assim, possivelmente, *L. monocytogenes* e *S. Enteritidis* são inibidas devido à produção de ácidos. Segundo Farnworth (2005), ácidos orgânicos, contribuem para o decréscimo de pH, tornando o crescimento de *L. monocytogenes* comprometido. Por outro lado, extrato de K4I e bebida de K1C apresentaram elevados valores de proteínas entre as amostras testadas, 0,274 % e 3,58 % respectivamente. Assim, pode-se inferir que a inibição de *B. cereus* e *E. coli* pela ação destas amostras está associada a produção de proteínas.

A maior e a menor inibição de *E. coli*, possivelmente, ocorreu devido à ação do extrato K3F e do extrato de K. Comercial respectivamente. As propriedades físico-químicas, que as amostras apresentaram diferenças significativas, foram no teor de lipídios, mais elevado para K.Comercial com 2,87 % g/g, e no teor de glicídios, maior para extrato de K3F (0,50 % g/g). Provavelmente, a potencial inibição de K3F está relacionada com a produção mais elevada de açúcares e o menor teor de lipídios. Enquanto, a menor ação de K. Comercial pode estar associada ao teor mais elevado de lipídios.

CONCLUSÕES

Alguns autores relatam a ação antimicrobiana de kefir tradicionais. No entanto, ainda não há estudos da inibição de bactérias oportunistas relacionando a ação de bebida de kefir comercializadas com produtos fermentados de modo artesanal. Entre as amostras de kefir testadas, a mais promissora foi a K4I, visto que apresentou maior contagem de BALs, inibição elevada para as bactérias testadas e propriedades físico-químicas relevantes em relação às outras bebidas artesanais. Possivelmente, a formulação de produtos comerciais com os grãos K4I apresentariam efeitos benéficos à saúde e propriedades atrativas ao consumidor.

Verificou-se que quanto maior o teor de alguns nutrientes, maior é a atividade antibacteriana observada. Um dos fatores mais relevantes no estabelecimento de efeito antimicrobiano foi a produção de ácido láctico; pois, verificou-se que em amostras de extrato, com maior acidez, a inibição das bactérias teve seu efeito intensificado. A aplicabilidade desta pesquisa também pode ser explorada em outros aspectos, visando formulações comerciais. Os principais são o isolamento e identificação dos microrganismos produtores de compostos bioativos presentes no kefir de leite e a caracterização das substâncias produzidas.



REFERÊNCIAS

- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, [S.l.], v. 72, n. 1-2, p.248-254, maio 1976.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 101, de 11 de agosto de 1993. [Métodos analíticos para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes]. Brasília: MAPA, 1993. Disponível em: <https://tinyurl.com/y2qlcc54>. Acesso em: 6 out. 2019.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº46, 23 de outubro de 2007. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. Brasília: MAPA, 2007. Disponível em: <https://tinyurl.com/yxww3y5v>. Acesso em: 5 out. 2019.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Determinação de proteína bruta em produtos de origem animal por acidimetria. Porto Alegre: MAPA, 2014. Disponível: <https://tinyurl.com/y3l2j93f>. Acesso em: 28 out. 2019.
- FARNWORTH, E. R. Kefir - a complex probiotic. *Food Science: Functional Foods*, [S.l.], v. 2, n. 1, p.1-17, abr. 2005.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. Coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1020 p.
- JACOBSEN, C. N. et al. Screening of Probiotic Activities of Forty-Seven Strains of *Lactobacillus* spp. by In Vitro Techniques and Evaluation of the Colonization Ability of Five Selected Strains in Humans. *Applied And Environmental Microbiology*, Frederiksberg, v. 11, n. 65, p.4949-4956, nov. 1999.
- KIM, D. et al. Antimicrobial Activity of Kefir against Various Food Pathogens and Spoilage Bacteria. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, [S.l.], v. 36, n. 6, p.787-790, 31 dez. 2016.
- RODRIGUES, K. L. et al. Antimicrobial and healing activity of kefir and kefiran extract. *International Journal of Antimicrobial Agents*, [S.l.], v. 25, n. 5, p.404-408, maio 2005.
- SANTOS, F.L. Kefir: Produção artesanal e Desenvolvimento de Produtos. Cruz das Almas: Editora UFRB, 2013.
- SARKAR, S. Potential of kefir as a dietetic beverage: a review. *British Food Journal*, [S.l.], v. 109, n. 4, p.280-290, 24 abr. 2007.
- TURKMEN, N. Kefir as a Functional Dairy Product. *Dairy in Human Health and Disease Across the Lifespan*, [S.l.], p.373-383, 2017.
- YÜKSEKDA, Z.N; BEYATLI, Y; ASLIM, B. Determination of some characteristics coccoid forms of lactic acid bacteria isolated from Turkish kefir with natural probiotic. *Lwt - Food Science and Technology*, [S.l.], v. 37, n. 6, p.663-667, set. 2004.