

ANÁLISE METATAXONÔMICA DA DIVERSIDADE MICROBIANA DE KEFIR DE ÁGUA

Klinger Vinícius de Almeida¹; Vanessa Cortina Zanetti²; Callebe Camello-Silva³; Luan Amaral Alexandre²; Alice Cristina da Silva²; Gabrielly da Silva Mendes²; Emanueli Marchesan Maran³; Silvani Verruck^{2*}; Luciano José Quintão Teixeira¹

¹Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Alegre – ES.

² Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Florianópolis – SC. *E-mail: silvani.verruck@ufsc.br

³Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Florianópolis – SC.

RESUMO

O kefir de água é um tipo de kefir não lácteo obtido pela fermentação dos grãos de kefir de água inoculados em uma solução de sacarose. O açúcar mascavo é o principal substrato utilizado para a fermentação do kefir de água. Este estudo teve como objetivo realizar a caracterização microbiana (bactérias e fungos) de grãos de kefir de água e da bebida fermentada de kefir de água através da análise metataxonômica do gene 16S rRNA (bactérias) e da região ITS (fungos). Com relação as espécies bacterianas, é possível estabelecer que a população das amostras de grãos de kefir de água e da bebida fermentada por esses grãos de água consiste em uma população dominante de *Zymomonas* spp. com bactérias ácido lácticas (*Lentilactobacillus*, *Liquorilactobacillus* e *Leuconostoc*) e bactérias do ácido acético (*Acetobacter* e *Gluconacetobacter*). A abundância relativa para composição fúngica foi representada pela espécie *Lachancea fermentati* com 95,54% de predominância nos grãos e 67,53% de predominância na bebida fermentada.

INTRODUÇÃO

O kefir de água é um tipo de kefir não lácteo obtido pela fermentação dos grãos de kefir de água inoculados em uma solução de sacarose. Os grãos de kefir são compostos por uma cultura simbiótica de bactérias e leveduras embebidas em uma matriz polissacarídica (1). O açúcar mascavo é o principal substrato utilizado para a fermentação do kefir de água (2). No entanto, vegetais e frutas também podem ser utilizados como substratos na fermentação de kefir, como: soja, cebola, gengibre, cenoura, maçã, abacaxi, uva, marmelo, kiwi, pêra, melão, morango, romã, tomate e coco (3, 4, 5, 6) como uma opção de diversificação, enriquecimento nutricional e melhoria da qualidade sensorial.

Sua fermentação pode durar de dois a três dias a temperatura de 20–25 °C, após os quais, sucos e/ou polpas de frutas são adicionados para melhorar o sabor (7). A bebida fermentada obtida é carbonatada, turva, ligeiramente alcoólica e doce, sendo muito popular entre os consumidores veganos. Sua composição é determinada principalmente pelas condições de cultivo e pela composição microbiológica dos grãos sendo os principais produtos finais da fermentação etanol, ácido láctico, manitol, ácido acético, glicerol e outros ácidos orgânicos (8, 5).

A composição microbiana do kefir de água é fortemente influenciada pela região de cultivo, considerando que é uma bebida tradicional, produzida em pequena escala e de forma artesanal (1). Tradicionalmente, os principais microrganismos presentes em kefir de água pertencem ao grupo das bactérias ácido lácticas (BAL), bactérias acéticas e leveduras. A matriz polissacarídica dos grãos de kefir é produzida por algumas espécies de BAL como *Lentilactobacillus hilgardii* e *Liquorilactobacillus nagelii*, e vem sendo estudada pelo seu potencial probiótico. Por outro lado, é cada vez mais frequente o relato de espécies potencialmente probióticas serem identificadas em alimentos fermentados tradicionais, como o kefir de água (FELS et al., 2018 9). Neste sentido, as técnicas de sequenciamento completo ou parcial do genoma microbiano representam uma mudança na maneira como os produtos fermentados podem ser compreendidos e produzidos. De fato, a aplicação da metataxonômica permite uma compreensão detalhada da ecologia microbiana presente nestes produtos. Desta forma, o conhecimento aprofundado dos mecanismos por trás dos processos biológicos aumentará o controle e a modulação da fermentação para obter produtos com as propriedades organolépticas desejadas.

OBJETIVO

O presente estudo, teve por objetivo realizar a avaliação metataxonômica de uma bebida fermentada a partir do consórcio microbiano de kefir de água bem como dos grãos utilizados nessa fermentação.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

O processo de fermentação foi realizado com grãos de kefir previamente ativos/viáveis (5% m/v) inoculados diretamente na solução de água e açúcar mascavo (10% m/v), e incubados em estufa de cultura bacteriológica (SolidSteel, Brasil) na temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 horas. Após o período de incubação a bebida foi filtrada com o auxílio de filtro de nylon, separando a bebida fermentada dos grãos de kefir. A bebida e os grãos foram mantidos congelados ($-18 \pm 1^\circ\text{C}$) até o momento da extração do DNA.

Análise metataxonômica

Para bactérias, a amplificação foi realizada com os *primers* 341F (CCTACGGGRSGCAGCAG) (WANG; QUIAN, 2009) e 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT) universais para a região V3/V4 do gene 16S rRNA, utilizando o equipamento MiSeq Sequencing System (IlluminaInc., USA) (10). Foi utilizado o método de Diagnóstico Microbiológico Digital (DMD) que faz a identificação de microrganismos por sequenciamento de DNA. Para fungos, a amplificação foi gerada com *primers* para a região ITS1, *primer*, ITS1 (GAACCGCGGARGGATCA) (SCHMIDT *et al.*, 2013) e *primer*, ITS2 (GCTGCGTTCTTCATCGATGC) (11). As sequências de DNA obtidas foram comparadas com o banco de dados proprietário ou públicos (12) e *Greengenes* (13) contendo diversas sequências de DNA anteriormente caracterizadas.

As seqüências foram analisadas por meio de um *pipeline* proprietário de bioinformática (Neopropecta Microbiome Technologies, Brasil). Com isso, ao obter as seqüências de DNA através do sequenciamento, fez-se uma filtragem da qualidade, tendo como base a soma das probabilidades de erro das bases, no qual é permitido no máximo 1% de erro acumulado e após isso, as seqüências de DNA são removidas pelos adaptadores da Tecnologia Illumina. Assim que as seqüências são analisadas pelos procedimentos iniciais, caso tenha 100% de identidade, são agrupadas em filotipos/*clusters* e utilizadas na identificação taxonômica, através de comparações em banco de dados de seqüências de 16S rRNA e ITS (NeoRef, Neopropecta Microbiome Technologies, Brasil).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As leituras relacionadas ao gene 16S rRNA dos grãos e da bebida fermentada foram atribuídas a dois filos bacterianos: *Firmicutes* e *Proteobactérias*. Em ambos os grãos e bebida fermentada, os filos dominantes foram *Proteobacteria* e *Firmicutes*. As proporções de *Proteobacteria* foram em geral maiores no grão (52,38%) do que na bebida fermentada (47,62%). As proporções de *Firmicutes* seguiram a mesma tendência que as proporções obtidas nos filos de *Proteobacteria*, apresentando um valor de 59,12% para os grãos de kefir de água e 40,89% para a bebida após o processo de fermentação.

Com relação as espécies, os resultados indicaram prevalência da espécie *Zymomonas mobilis* com abundância relativa de 94,31% nos grãos e 91,68% na bebida fermentada (Figura 1). Este resultado corrobora com o estudo realizado por Marsh et al. (14) onde o gênero *Zymomonas* foi dominante em todos os grãos e bebidas fermentadas avaliados, com proporções consistentemente maiores nos grãos. *Zymomonas* é tradicionalmente considerado um microrganismo associado à fermentação e faz parte da população microbiana de várias bebidas fermentadas de plantas em regiões tropicais da América, África e Ásia. Foi isolado do pulque mexicano, de uma bebida fermentada feita de seiva de agave que se assemelha ao kefir de água (15).

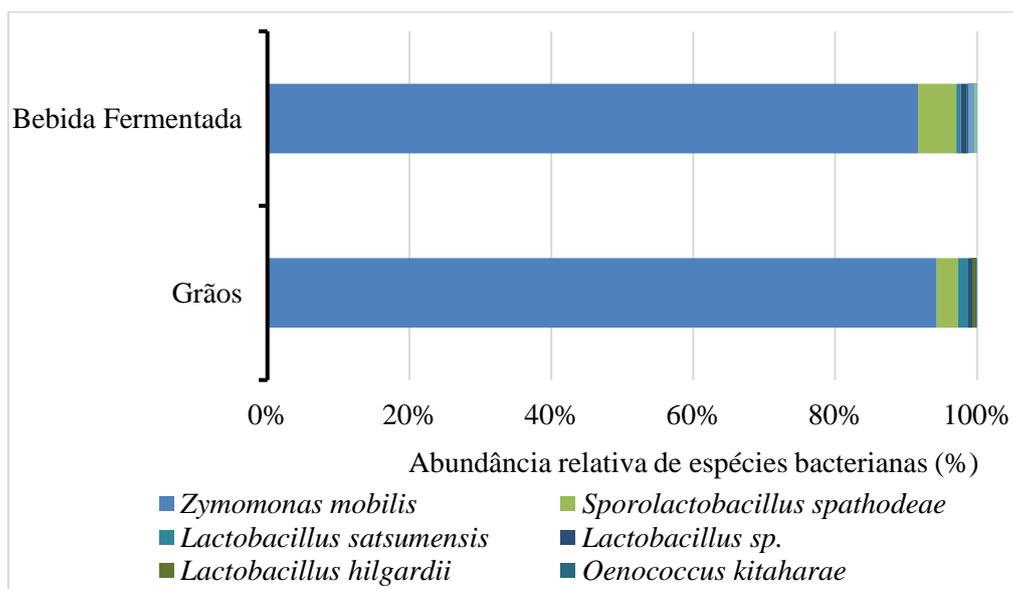


Figura 1. Abundância relativa de espécies bacterianas em grãos de kefir de água e em bebida fermentada por esses grãos.

Outras espécies em menor abundância também foram identificadas, como por exemplo as espécies *Sporolactobacillus spathodeae* (3,00% no grão e 5,42% na bebida fermentada), *Liquorilactobacillus satsumensis* (1,47% no grão e 0,62% na bebida fermentada), *Lactobacillus sp.* (0,57% no grão e 0,77% na bebida fermentada), *Lentilactobacillus hilgardii* (0,46% no grão e 0,16% na bebida fermentada) e *Oenococcus kitaharae* (0,19% no grão e 0,35% na bebida fermentada). *Lactobacillus hilgardii* é uma bactéria ácido láctica heterofermentativa obrigatória que é encontrada principalmente em fermentações de cacau e vinho. Esta espécie bacteriana é conhecida por ser a principal produtora de exopolissacarídeo (EPS) no ecossistema de kefir de água (16, 17, 18).

Com relação a diversidade fúngica, todas as leituras foram atribuídas ao filo *Ascomycota*. Em nível de família, *Saccharomycetaceae*, *Pichiaceae* e *Phaffomycetaceae* foram detectadas tanto nos grãos quanto na bebida fermentada. Cinco diferentes gêneros foram identificados tanto nos grãos quanto na bebida fermentada sendo estes representados por *Lachancea*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulaspota* e *Wickerhamomyces*.

A abundância relativa para composição fúngica é aqui representada pela espécie *Lachancea fermentati* com 95,54% de predominância nos grãos e 67,53% de predominância na bebida fermentada (Figura 2.). Esta espécie era anteriormente conhecida como *Zygosaccharomyces fermentati* (19) e foi detectada em kefir de água anteriormente (20).

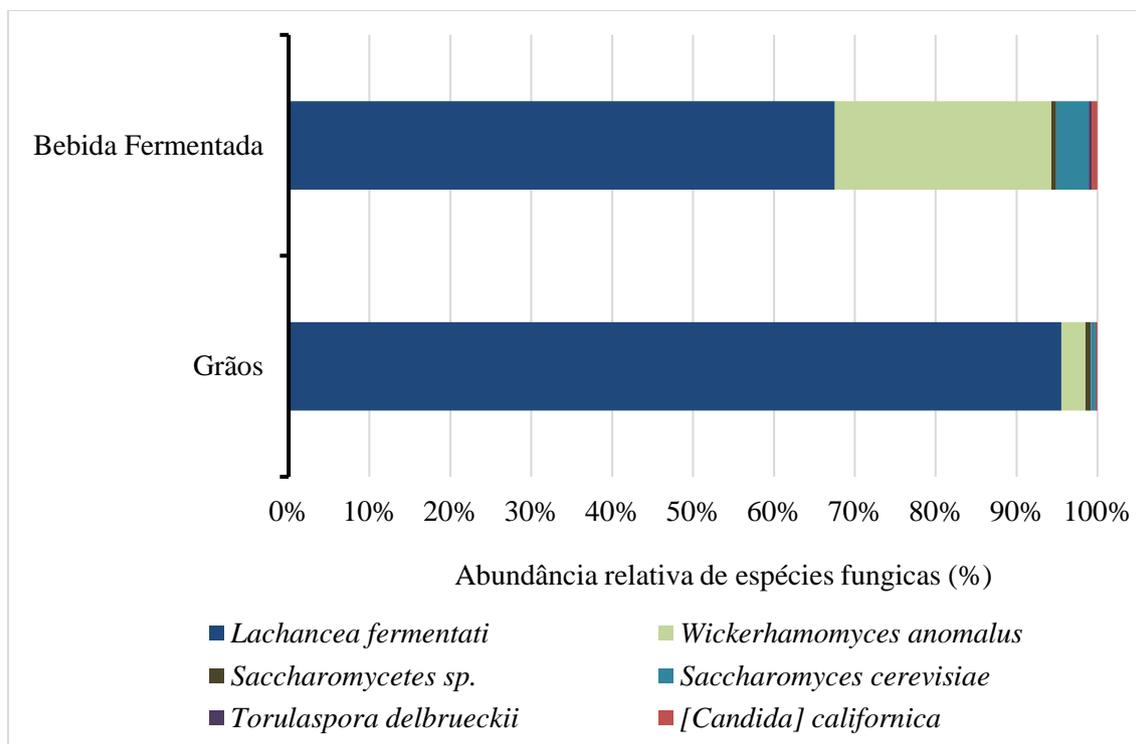


Figura 2. Abundância relativa de espécies fúngicas em grãos de kefir de água e em bebida fermentada por esses grãos.

Espécies fúngicas com menor representação também foram identificadas como por exemplo as espécies *Wickerhamomyces anomalus* (3,00% no grão e 26,77% na bebida

fermentada), *Saccharomyces sp.* (0,66% no grão e 0,60% na bebida fermentada), *Saccharomyces cerevisiae* (0,55% no grão e 4,03% na bebida fermentada), *Torulaspota delbrueckii* (0,14% no grão e 0,33% na bebida fermentada) e *Candida californica* (0,11% no grão e 0,73% na bebida fermentada).

CONCLUSÃO

Através da análise metataxonômica é possível estabelecer que a população bacteriana de das amostras de grãos de kefir de água e da bebida fermentada por esses grãos de água consiste em uma população dominante de *Zymomonas* com bactérias do ácido láctico (*Lentilactobacillus*, *Liquorilactobacillus* e *Leuconostoc*) e bactérias do ácido acético (*Acetobacter* e *Gluconacetobacter*). Os resultados revelam ainda que a composição fungica das amostras de kefir de água e dos grãos é composto essencialmente pela espécie *Lachancea fermentati*.

REFERÊNCIAS

1. LAUREYS, D.; DE VUYST, L. Microbial species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of water kefir fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 8, p. 2564-2572, 2014. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.03978-13>> Acesso em: 28 dez. 2021.
2. BORGUINI, R. G.; TORRES, E. A. F. S. Alimentos Orgânicos: Qualidade nutritiva e segurança do alimento. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 13, n. 2, p. 64-75, 2006. Disponível em: <<https://periodicos.sbu.unicamp.br/ojs/index.php/san/article/view/1833>> Acesso em: 01 jan. 2022.
3. FIORDA, F. A.; PEREIRA, G. V. M.; THOMAZ-SOCCOL, V.; RAKSHIT, D. K.; PAGNONCELLI, M. G. B.; VANDENBERGHE, L. P. S.; SOCCOL, C. R. Microbiological, biochemical, and functional aspects of sugary kefir fermentation - A review. **Food Microbiology**. v. 66, p. 86–95, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002017301120#bib40>> Acesso em: 27 dez 2021.
4. GULITZ, A.; STADIE, J.; WENNING, M.; EHRMANN, M. A.; VOGEL, R. F. The microbial diversity of water kefir. **International Journal of Food Microbiology**, v. 151, n. 3, p. 284-288, 2011. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160511005344?via%3Dihub>> Acesso em: 29 dez. 2021.
5. CAPORASO, J. Gregory *et al.* Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **ISME Journal**, v. 6, n. 8, p. 1621–1624, 2012. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.8>.
6. SCHMIDT, P. A. *et al.* Illumina metabarcoding of a soil fungal community. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 65, p. 128–132, 1 out. 2013.
7. WHITE, T.J. *et al.* Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. **PCR Protocols, a Guide to Methods and Applications**, p. 315-322, 1990.
8. QUAST, C. *et al.* The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, P. D590-D596, 2013. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gks1219>.
9. DeSANTIS, T. Z. *et al.* Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. **Applied and Environment Microbiology**, v. 72, n. 7, p. 5069-72, 2006. DOI:10.1128/AEM.03006-05.