



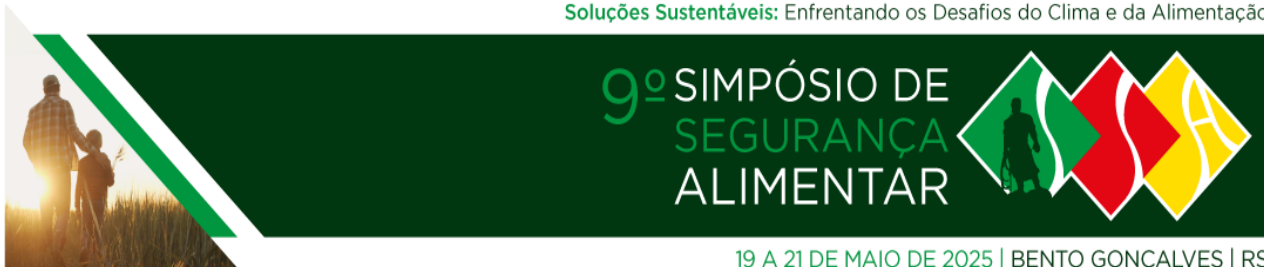
ANÁLISE METAGENÔMICA DE KEFIR ARTESANAL PRODUZIDO NO VALE DO TAQUARI-RS

J. A. Ströher¹, M. M. Salazar², A. S Freitas³, Da Silva, L.F.F⁴ S. H. Flôres⁵, P. S. Malheiros⁶

- 1- Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – CEP: 91509-900 – Porto Alegre – RS – Brasil, Telefone: 55 (51) 3308-6674 – e-mail: jeferson.stroher@hotmail.com
- 2- ProBios Kefir e Saúde (empresa incubada na Universidade do Vale do Taquari) – CEP: 95.900-900 – Lajeado – RS – Brasil, Telefone: 55 (51) 3714-7000 – e-mail: marcelamsalazar@gmail.com
- 3- Centro de Energia Nuclear na Agricultura – Universidade de São Paulo – CEP: 13416-000 – Piracicaba – SP, Brasil, Telefone 19 3429-4611 – E-mail: andersonfreitas@usp.br
- 4- ProBios Kefir e Saúde (empresa incubada na Universidade do Vale do Taquari) – CEP: 95.900-900 – Lajeado – RS – Brasil, Telefone: 55 (51) 3714-7000 – e-mail: lilian.silva@universo.univates.br
- 5- Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande do Sul– CEP: 91509-900 – Porto Alegre – RS – Brasil, Telefone: 55 (51) 3308-6674 – e-mail: simone.flores@ufrgs.br
- 6- Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande do Sul– CEP: 91509-900 – Porto Alegre – RS – Brasil, Telefone: 55 (51) 3308-6674 – e-mail: patricia.malheiros@ufrgs.br

RESUMO – Este estudo investigou as propriedades metagenômicas do kefir de leite artesanal produzido por uma agroindústria localizada no Vale do Taquari, Rio Grande do Sul, ao longo de 30 dias de armazenamento, visando avaliar a viabilidade comercial e a padronização do produto, através da caracterização das comunidades microbianas, através do sequenciamento de alto desempenho, com análise das regiões V3/V4 do gene 16S rRNA para bactérias e da região ITS para fungos. Os resultados mostraram que, na microbiota bacteriana, foram identificadas 20 espécies, com destaque para a redução gradual de *Acetobacter syzygii*, *Enterococcus hirae*, *Enterococcus durans* e *Enterococcus faecium* ao longo de do período de armazenamento. Foram identificadas 11 espécies fúngicas, com predominância inicial de *Kazachstania unispora* e crescimento progressivo de *Aspergillus clavatorphorus*, *A. penicillioides* e *Penicillium pusillum* ao final do período. O estudo destaca a importância de mais pesquisas para compreender os fatores que regulam a microbiota e garantir a padronização do kefir artesanal.

PALAVRAS-CHAVE: kefir artesanal; microbiota; padronização; análise de alimentos; vida útil.



19 A 21 DE MAIO DE 2025 | BENTO GONÇALVES | RS

ABSTRACT – This study investigated the metagenomic properties of artisanal milk kefir produced by an agroindustry located in Vale do Taquari, Rio Grande do Sul, over 30 days of storage, to assess the commercial viability and standardization of the product, through the characterization of microbial communities, applying high-performance sequencing techniques, with analysis of the V3/V4 regions of the 16S rRNA gene for bacteria and the ITS region for fungi. The results showed that 20 species were identified in the bacterial microbiota, with a gradual reduction in *Acetobacter syzygii*, *Enterococcus hirae*, *Enterococcus durans* and *Enterococcus faecium* over the storage period. Eleven fungal species were identified, with an initial predominance of *Kazachstania unispora* and progressive growth of *Aspergillus clavatorphorus*, *A. penicillioides* and *Penicillium pusillum* towards the end of the period. The study highlights the importance of further research to understand the factors that regulate the microbiota and ensure the standardization of artisanal kefir.

KEYWORDS: artisanal kefir; microbiota; standardization; food analysis; shelf life.

1. Introdução

O kefir de leite, conforme o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) (Brasil, 2007), é classificado como um leite fermentado obtido a partir do leite de diferentes espécies animais. Sua fermentação ocorre em grãos formados por uma matriz polissacarídica que abriga bactérias e leveduras em simbiose, proporcionando benefícios como propriedades antitumorais, imunomoduladoras, hipocolesterolêmicas e auxílio na digestão da lactose (Kesenkaý et al., 2017; Jeong et al., 2017). Durante esse processo, microrganismos como bactérias do ácido láctico (*Lactobacillus kefir*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Acetobacter*) e leveduras (*Kluyveromyces marxianus* e *Saccharomyces* spp.) produzem ácido láctico, etanol e dióxido de carbono, que conferem as propriedades funcionais da bebida (Hamet et al., 2013).

A produção pode ser artesanal, com o uso de grãos como inóculos, resultando em maior variabilidade, como é comum no Brasil, ou industrial, utilizando culturas starters que garantem maior uniformidade (Vieira et al., 2021). No caso do kefir artesanal, sua composição é influenciada por fatores como local de produção, condições climáticas e tipo de substrato, o que impacta diretamente seus atributos de qualidade (La Torre et al., 2024). A padronização do kefir artesanal é crucial para preservar as suas propriedades funcionais e viabilizar sua comercialização industrial. A análise metagenômica é crucial nesse processo, permitindo identificar a diversidade microbiana e avaliar fatores que influenciam sua qualidade. Este estudo analisou a metagenômicas do kefir produzido pela



PróBios Kefir e Saúde (Lajeado-RS) ao longo de 30 dias, buscando estabelecer padrões de qualidade e ampliar seu mercado no Brasil.

2. Material e métodos

Produção do kefir

Os grãos de kefir fornecidos pela ProBios Kefir e Saúde foram incubados no Tecnovates (Univates, RS, Brasil). A produção consistiu na adição de 100 g de grãos a 2 L de leite UHT integral em potes de vidro, fermentados a $25 \pm 0,5$ °C por 18 horas. Após a coagem, o líquido fermentado foi maturado por 18 a 24 horas em condições semelhantes, envasado em garrafas esterilizadas e armazenado refrigerado (<8 °C). Amostras foram coletadas nos dias 0, 15 e 30 e após congeladas em frascos de 200 mL para posterior análise metagenômica.

Análises metagenômicas

As comunidades bacterianas foram identificadas por meio de sequenciamento de alto desempenho das regiões V3/V4 do gene 16S rRNA, seguindo o protocolo da Neoprosecta Microbiome Technologies. A amplificação utilizou os primers 341f (Wang et al., 2009) e 806r (Caporaso et al., 2012). As comunidades fúngicas foram analisadas pela amplificação da região ITS com os primers ITS1F/ITS2R (White et al., 1990; Gardes e Bruns, 1993; Walters et al., 2016). O sequenciamento foi realizado no sistema MiSeq (Illumina Inc., EUA), utilizando kits V3 de 600 ciclos ou V2 de 500 ciclos para sequenciamento de extremidade pareada. A análise das comunidades microbianas utilizou o pipeline DADA2 (Callahan et al., 2016), considerando sequências com pontuação de qualidade superior a 30. As leituras filtradas foram agrupadas em variantes de sequência de amplicon (ASVs) e classificadas taxonomicamente com o banco de dados Silva v.138.1 (Quast et al., 2012). A tabela ASV gerada foi importada para o objeto phyloseq (McMurdie e Holmes, 2013) para análises subsequentes.

3. Resultados e discussão

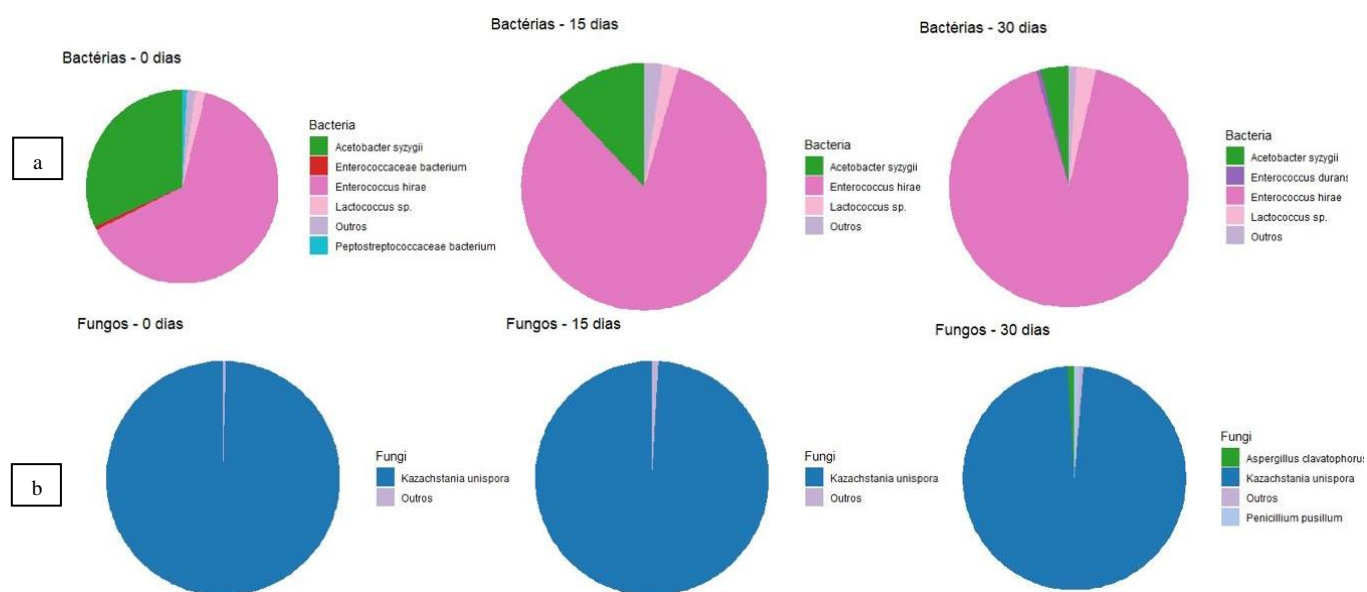
Foram identificadas 20 espécies bacterianas no kefir ao longo de sua vida útil (Figura 1a). *Enterococcus hirae* foi a mais abundante inicialmente, mas sofreu redução acentuada ao longo do



19 A 21 DE MAIO DE 2025 | BENTO GONÇALVES | RS

tempo, assim como *Acetobacter syzygii* e *Enterococcaceae bacterium*. Outras espécies do gênero *Enterococcus*, como *Enterococcus durans* e *Enterococcus faecium*, também reduziram, mas de forma mais moderada. Já *Lactobacillus kefirifaciens* e *Lactobacillus kefiri* mostraram reduções menos pronunciadas, enquanto o gênero *Lactococcus* apresentou um declínio generalizado, com *Lactococcus lactis* desaparecendo após 15 dias. Espécies de *Leuconostoc*, como *L. mesenteroides* e *L. pseudomesenteroides*, também reduziram progressivamente. Por fim, *Peptostreptococcaceae bacterium* teve uma redução significativa ao longo do período analisado. Diferentemente deste estudo, pesquisas anteriores indicam a predominância dos gêneros *Lactobacillus*, *Lentilactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* e *Acetobacter*, com *Lactobacillus* sendo o mais abundante (Sindi et al., 2020; Tenorio-Salgado et al., 2021).

Figura 1 – Abundância relativa bacteriana (a) e fúngica (b) do kefir ao longo de 30 dias de sua vida útil.



No caso das espécies fúngicas, 11 foram identificadas ao longo do estudo. No início do processo (0 dias), *Kazachstania unispora* destacou-se como a espécie predominante, com aumento aos 15 dias e queda ao final do período. Já *Debaryomyces hansenii*, embora presente em menor quantidade no início, mostrou um leve crescimento intermediário, seguido de redução ao final do período analisado. Em contraste, *Aspergillus clavatorphorus*, *Aspergillus penicillioides* e *Penicillium pusillum*, inicialmente detectadas em menores quantidades, apresentaram aumentos em suas abundâncias aos 30 dias de sua vida útil. Sumarmono et al. (2023) identificaram *Kazachstania* e *Kluyveromyces* como dominantes em kefir de leite de vaca na Indonésia, com *Aspergillus* aparecendo em menores proporções. Embora raro no kefir, o gênero *Aspergillus* contribui para a qualidade sensorial



19 A 21 DE MAIO DE 2025 | BENTO GONÇALVES | RS

ao produzir enzimas que degradam amidos e convertem açúcares (Tamang et al., 2016). Diante da complexidade da microbiota do kefir artesanal, impõe-se a revisão da legislação brasileira, de modo a contemplar sua diversidade microbiana e potencial funcional. Tal iniciativa é essencial para subsidiar a padronização, o controle de qualidade e a valorização dos benefícios à saúde associados a esses produtos.

4. Conclusões

Foram identificadas 20 espécies bacterianas e 11 fúngicas no kefir, com mudanças significativas nas abundâncias ao longo do tempo. *Enterococcus hirae* e *Kazachstania unispora* predominam inicialmente, enquanto *Aspergillus penicillioides* e *Penicillium pusillum* aumentaram no final do período. Essas variações refletem a dinâmica microbiana durante o armazenamento e impactam as características sensoriais e nutricionais do kefir. Pesquisas futuras devem explorar os fatores que moldam a microbiota para aprimorar a padronização, qualidade e aceitação do kefir artesanal, ampliando seu consumo e promovendo seus benefícios à saúde.

5. Agradecimentos

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Secretaria de Inovação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (SICT).

6. Referências bibliográficas

BRASIL. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa n.º 46, 3 de outubro de 2007**. Adota o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. DOU de 24/10/2007 (n.º 205, Seção 1, pág. 4).

CALLAHAN, B. J. et al. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. **Nature methods**, v. 13, n. 7, p. 581-583, 2016.

CAPORASO, J. G., LAUBER, C. L., WALTERS, W. A *et al.* **Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms**. ISME J 2012, 6:1621–1624.

CASTANHEIRA, A. C. G. **Controle de Qualidade de leite e derivados**. Manual Básico comentado 2ºEd. Cap-Lab Indústria e Comércio Ltda. São Paulo. 2012.

GARDES, M., BRUNS, T. D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. **Molecular ecology**, v. 2, n. 2, p. 113-118, 1993.



HAMET, M. F. *et al.* Application of culture-dependent and culture-independent methods for the identification of *Lactobacillus kefirianofaciens* in microbial consortia present in kefir grains. **Food Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 327–334, 1 dez. 2013.

JEONG, D. *et al.* Characterization and antibacterial activity of a novel exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefirianofaciens* DN1 isolated from kefir. **Food Control**, v. C, n. 78, p. 436–442, 2017.

KESENKAŞ, H., GÜRSOY, O., ÖZBAŞ, H. Chapter 14 - Kefir. Em: FRIAS, J., MARTINEZ-VILLALUENGA, C., PEÑAS, E. (Eds.). **Fermented Foods in Health and Disease Prevention**. Boston: Academic Press, 2017. p. 339–361.

LA TORRE, C. *et al.* Comparing Nutritional Values and Bioactivity of Kefir from Different Types of Animal Milk. **Molecules**, v. 29, n. 11, p. 2710, 2024.

MCMURDIE, P. J., HOLMES, S. phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. **PloS one**, v. 8, n. 4, p. e61217, 2013.

QUAST, C. *et al.* The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic acids research**, v. 41, n. D1, p. D590–D596, 2012.

SINDI, A., BADSHA, M.B., ÜNLÜ, G. Bacterial populations in international artisanal kefir. **Microorganisms**, v. 8, n. 9, p. 1318, 2020.

SUMARMONO, J. *et al.* Metagenomic analysis of the microbial community in kefir grains from different milk sources. **Biodiversitas Journal of Biological Diversity**, v. 24, n. 10, 2023.

TAMANG, J. P. *et al.* Functional properties of microorganisms in fermented foods. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 578, 2016.

TENORIO-SALGADO, S. *et al.* Metagenomic analysis and antimicrobial activity of two fermented milk kefir samples. **Microbiology Open**, v. 10, n. 2, p. e1183, 2021.

VIEIRA, C. P., ROSARIO, A. I. L. S., LELIS, C. A., REKOWSKY, B. S. S., CARVALHO, A. P. A. *et al.* Bioactive compounds from kefir and their potential benefits on health: a systematic review and meta-analysis. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2021, 2021.

WALTERS, W. *et al.* Improved bacterial 16S rRNA gene (V4 and V4-5) and fungal internal transcribed spacer marker gene primers for microbial community surveys. **Msystems**, v. 1, n. 1, p. 10.1128/msystems.00009-15, 2016.

WANG, Y., QIAN, Pei-Yuan. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. **PloS one**, v. 4, n. 10, p. e7401, 2009.

WHITE, J. W., BRUNS, T. J., TAYLOR, S. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR protocols: a guide to methods and applications (Innis MA, Gelfand DH, eds). **Academic Press**, London: 315–322, 1990.