

# Biopolímero de kéfir con efecto antimicrobiano

Silvia Sampieri Bulbarela, Cyntia Rocío Flores Juárez, Sandra Terrazas Urrutia,  
Luis Ángel Sánchez Jiménez, Saúl López Herrera  
Universidad Tecnológica de Querétaro

## Resumen

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto antibacterial de biopolímeros de kéfir impregnados con aceite de clavo (*Syzygium aromaticum*), conocido por su actividad antiinflamatoria y antibacterial. La capacidad antibacterial se evaluó sobre *Escherichia coli* (*E. coli*). También se evaluó factibilidad de utilizar residuos agrícolas como sustrato para las bacterias presentes en los consorcios de kéfir, sin que esto afecte la capacidad del material para inhibir el crecimiento de *E. coli*. En primera instancia se evaluó la cinética de crecimiento de las colonias bacterianas en el kéfir con los diferentes sustratos y, posteriormente, se realizaron pruebas para estimar si este polímero natural inhibe el crecimiento de las bacterias patógenas cuando se le agrega aceite aromático en diferentes concentraciones (0.5, 1 y 2% p/p), empleando para ello el método Kirby-Bauer. Los resultados indican a que el sustrato sí tiene efecto sobre el crecimiento del kéfir pues la piña reduce su velocidad de crecimiento; sin embargo no impacta la capacidad que tiene el material para causar un efecto de inhibición.

**Palabras clave:** biopolímero, kéfir, aceite de clavo, *E. coli*.

## Abstract

The objective of this work was to evaluate the antibacterial effect of kefir biopolymers impregnated with clove oil (*Syzygium aromaticum*), known for its anti-inflammatory and antibacterial activity. The antibacterial capacity was evaluated on *Escherichia coli* (*E. coli*). The feasibility of using agricultural residues as a substrate for the bacteria present in the kefir consortia was also evaluated, without this affecting the capacity of the material to inhibit the growth of *E. coli*. In the first instance, the growth kinetics of bacterial colonies in kefir with the different substrates was evaluated and, subsequently, tests were carried out to estimate whether this natural polymer inhibits the growth of pathogenic bacteria when aromatic oil is added at different concentrations (0.5, 1 and 2% w/w), using the Kirby-Bauer method. The results indicate that the substrate does have an effect on the growth of kefir, since the pineapple reduces its growth rate; however, it does not impact the material's ability to cause an inhibition effect.

**Key words:** biopolymer, kefir, clove oil, *E. coli*

## Introducción

Los aceites esenciales de algunas plantas aromáticas o sus componentes son agentes antibacterianos y antifúngicos, lo cual está relacionado con la composición de éstos, pues son mezclas multicomponentes con actividad biológica diversa, potenciada a menudo por la combinación única de varios componentes (Petropoulos, 2018). Los extractos de plantas contienen grandes concentraciones de componentes fenólicos con fuertes propiedades antioxidantes, efecto antibacteriano y antioxidativo, capaces de conferir a un biopolímero las propiedades de ser barrera contra el vapor y como agentes plastificantes, sin comprometer la resistencia mecánica (Abdul Qadir, 2017; Bermúdez-Oria, 2017). Entre las plantas que han mostrado tener un efecto antioxidante y antimicrobiano está el clavo de olor (*Syzygium aromaticum*).

Un área potencial para el uso de biopolímeros es la creación de apósitos hechos con hidrogeles o hidrocoloides y extractos de plantas que liberan de manera controlada los analgésicos, factores de crecimiento y agentes antimicrobianos y antiinflamatorios (Mokhtarzadeh, 2016; Vargas, 2018); pudiendo ser pertinente investigar la viabilidad de utilizar polímeros provenientes de distintas fuentes naturales (plantas, animales, microorganismos, etc.).

Autores como Pérez-Recalde (Pérez-Recalde, 2018) han mencionado sobre el uso de polisacáridos de diferentes fuentes para obtener películas y recubrimientos; así mismo, en los últimos años se han desarrollado investigaciones de materiales obtenidos a partir de exopolisacáridos microbianos, como lo es el kéfir de agua. Este material compuesto de diferentes bacterias y hongos que habitan de manera simbiótica es muy conocido por su capacidad de fermentar azúcares (Guzel-Seydim, 2021) y con ello crear una bebida conocida como tepache, así como para generar ácido acético. Generalmente, el origen de los azúcares que ingieren proviene del piloncillo pero también han sido cultivados añadiendo otros sustratos, como lo son cítricos, como la piña, que modifican sus propiedades organolépticas. Estos frutos también afectan la cinética de crecimiento de

las colonias bacterianas pues modifican el pH del medio en el que habitan, dando pie a creer que podrían afectar también algunas de sus características, como lo es una posible capacidad de impedir el crecimiento de bacterias ajenas al medio en el que cohabitan las propias del kéfir.

Así mismo, dado que el kéfir es un material biodegradable, biocompatible, soluble en agua, fácilmente reproducible (Moradi & Kalanpour, 2019), que puede ser alimentado incluso con residuos agroindustriales y generar productos que pueden ser comercializados, es una fuente sustentable para obtener biopolímeros a un bajo costo y, si bien se han realizado diversas investigaciones sobre su uso (Cottet, 2020; Gonçalves, 2018), principalmente se ha evaluado el efecto de la concentración de plastificantes sobre sus propiedades mecánicas; dejando de lado la posibilidad de crear compuestos con propiedades antibacteriales, con efecto analgésico y/o antiinflamatorio; propiedades que son inherentes a especies vegetales como el clavo de olor.

Con base en lo anterior, el presente trabajo se enfoca en evaluar el efecto que tiene la adición de aceite de clavo sobre el crecimiento de *E. coli* y si la concentración del mismo en el biopolímero impacta en su actividad antimicrobiana. Aunado a esto, se estudió la posible repercusión de la adición de piña como sustrato para el crecimiento de kéfir y su capacidad antibacteriana, con el fin de analizar la factibilidad de cultivarlo con residuos agroindustriales en futuras investigaciones.

## Metodologías

### 1. Cinética de crecimiento del kéfir.

- a) Preparar dos muestras de kéfir en recipientes diferentes, empleando las siguientes composiciones: la primera agregando kéfir drenado, piloncillo y agua en una relación 1:3:0.5 con respecto a las colonias bacterianas y en la segunda kéfir, agua, piloncillo y piña en una relación 1:3:0.25:0.25. La masa inicial de kéfir será de 50 g.
- b) Colocar las muestras en un lugar oscuro y seco durante todo el periodo de reproducción.
- c) Drenar el líquido de cada muestra cada 72 horas y registrar el peso del kéfir.

- d) Hacer el reajuste en las cantidades de agua y sustrato de acuerdo con las relaciones en peso antes mencionadas, posteriormente volver a dejarlas crecer.
- e) Repetir el procedimiento anterior en 12 ocasiones hasta completar 36 días.
- f) Graficar las cinéticas de crecimiento de las muestras y evaluar el efecto de la adición de piña en la dieta del kéfir sobre su velocidad de reproducción.

### 2. Evaluación antibacteriana del biopolímero de kéfir cultivado con diferentes fuentes de glucosa.

- a) Drenar, por separado, el kéfir de ambos cultivos y lavarlo con agua destilada cinco veces.
- b) Obtener el peso de masa seca del material de partida con el fin de preparar las biopelículas con diferentes concentraciones de AC.
- c) Preparar los biopolímeros con el cultivo de las bacterias alimentadas parcialmente con piña, así como aquellas en donde sólo se adicionó piloncillo, siguiendo para ello estos pasos: mezclar a altas revoluciones 10 g de cada una de las muestras, adicionando 10 ml de agua para incrementar la homogenización del material. Vaciar cada una de ellas en cajas Petri y posteriormente colocarlas en un horno para secarlas a 60°C durante 8 horas.
- d) Realizar un ensayo antibacterial para ambas muestras mediante la prueba de Kirby-Bauer, con el propósito de observar el efecto que tiene el tipo de sustrato empleado como alimento del kéfir sobre el crecimiento de *E. coli*. El procedimiento a seguir está reportado en la guía de normatización del Instituto Nacional de Salud de Bogotá (Serie de notas e informes técnicos No. 9, 1986). Cabe destacar que las pruebas deben ser por triplicado.

### 3. Evaluación antibacteriana del biopolímero de kéfir con diferentes concentraciones de AC

- a) Drenar el kéfir cultivado en piloncillo y lavarlo con agua destilada cinco veces.
- b) Moler a altas revoluciones 10 g de cada una de las muestras con 10 g de agua destilada.

- c) Preparar las biopelículas con tres concentraciones de AC (0.5, 1 y 2% p/p). Para hacer el cálculo de la concentración se emplea el peso de masa seca del kéfir.
- d) Vaciar, por separado las muestras en cajas Petri; posteriormente colocarlas en un horno para secarlas a 60°C durante 8 horas.
- e) Realizar un ensayo microbiológico, por triplicado, mediante la prueba de Kirby-Bauer, y observar el efecto del AC sobre el crecimiento de *E. coli*.

## Resultados

### 1. Cinética de crecimiento del kéfir de agua empleando dos bases alimenticias diferentes.

Los resultados obtenidos muestran que sí existe un efecto significativo sobre el crecimiento de las bacterias si se utilizan diferentes fuentes de carbono (ver Figura 1), puesto que aquellas que fueron cultivadas con piloncillo y piña tuvieron un peso máximo registrado de 120 g a lo largo de las 12 mediciones que se realizaron posterior a la siembra, es decir, un incremento de más del doble de la masa inicial; empero, desde la sexta medición hubo un incremento prácticamente nulo. Por el contrario, las muestras que sólo fueron cultivadas con piloncillo tuvieron un crecimiento exponencial, logrando un máximo de 4000 g, que representa un incremento de 80 veces la población de bacterias inicial. Este hecho podría adjudicarse parcialmente al pH de la solución en la que estaban inmersas las colonias que, si bien no se consideró como una variable del experimento, se hicieron algunas mediciones esporádicamente, encontrando un pH de 3 para las muestras con piña y 4 para las que sólo tienen piloncillo. Así mismo, dado que hubo un estancamiento en el crecimiento del kéfir con piña y se emplearon relaciones en peso de sustrato para su alimentación, esto pudo limitarlo.

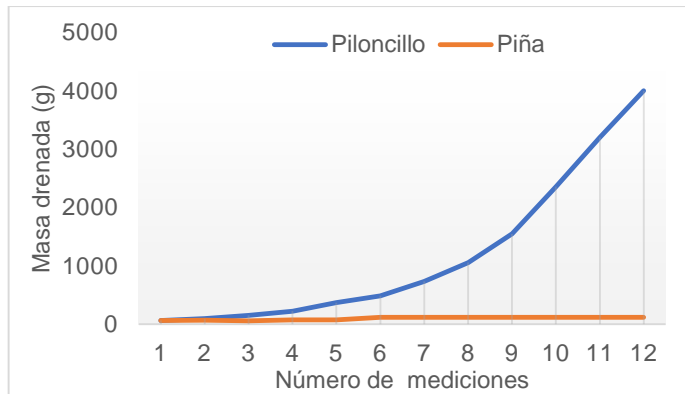


Figura 1. Efecto del sustrato alimenticio sobre la cinética de crecimiento de kéfir.

## 2. Efecto de la fuente alimenticia en el cultivo de kéfir sobre su actividad antibacteriana.

Al inicio del experimento se pensaba implementar la metodología propuesta por Coma et al. (2019) para elaborar las películas, pero los resultados no fueron los esperados dado que se observó que las biopelículas más bien eran una mezcla heterogénea en donde las bacterias tienden a aglomerarse, por lo que se optó por moler a altas rpm el kéfir vivo. Este paso debió ser empleando agua para diluir las muestras pues muestran un comportamiento reopéctico, es decir, a medida que se mantiene el esfuerzo de cizalla la viscosidad aumenta.

Una vez que se realizó el ensayo Kirby-Bauer, se observó que sin importar cuál es la fuente alimenticia que se provea al kéfir, esta variable no impacta sobre la actividad antibacteriana del material, pues en ambos el *E. coli* crece incluso sobre la biopelícula; esto es, no se observa ningún halo de inhibición (ver Figura 2).



Figura 2. Análisis microbiológico de biopolímero de kéfir alimentado con piloncillo (a) y piña/piloncillo (b).

Lo anterior, aunque pareciera un resultado negativo, abre la oportunidad a buscar alternativas en la reproducción de bacterias empleando residuos agroindustriales como sustrato que pudiesen incrementar o, al menos, mantener la cinética de crecimiento del kéfir sin impactar el efecto antibacteriano del biopolímero.

## 3. Impacto de la adición de AC, en diferentes concentraciones, a las biopelículas de kéfir sobre su actividad antimicrobiana.

El primer paso para preparar las biopelículas fue encontrar la concentración en peso del kéfir con respecto del material drenado, cuyo resultado fue el 14% p/p. Posterior a ello, se prepararon las muestras con diferente concentración de AC respecto del kéfir seco y se realizó la prueba microbiológica, cuyos resultados se observan en la Figura 3. En dicha imagen se ve que la concentración de AC en las tres muestras no impacta su capacidad de evitar el crecimiento de *E. coli*, pues en todas ellas hubo un halo de inhibición con un tamaño aproximado de medio centímetro, tal vez si se hubiesen empleado menores cantidades de la esencia natural habría llegado a un punto donde el clavo no impidiera la propagación de las bacterias patógenas.



Figura 3. Análisis microbiológico de biopolímero de kéfir con diferentes concentraciones de aceite de clavo. a) 0.5 % p/p, b) 1% p/p y c) 2%.

## Conclusiones y recomendaciones

De acuerdo a los resultados obtenidos, se concluye que el tipo de alimentación suministrada al kéfir para reproducirlo no tiene ningún efecto sobre el crecimiento de *E. coli* en el biopolímero, pero agregar piña a su dieta sí inhibe el crecimiento de las colonias de kéfir. En conclusión a este respecto, si se buscara crear un biopolímero a gran escala no es recomendable emplear piña como sustrato, pero valdría la pena analizar si es factible emplear otro residuo agroindustrial rico en glucosa. Contrario al resultado anterior, al agregar el aceite esencial sí se crea un efecto antibacteriano en el biopolímero, corroborando así la hipótesis planteada en este trabajo y planteando la posibilidad de llevar a cabo más estudios sobre estos biomateriales, que podrían ser considerados como posibles materiales de curación en seres humanos y/o animales o como recubrimiento para alimentos, los cuales se cree evitarían los procesos oxidativos y de contaminación por hongos y bacterias patógenas.

## Referencias bibliográficas

Abdul Qadir, M., Shahzadi, S. K., Bashir, A., Munir, A., & Shahzad, S. (2017). Evaluation of Phenolic Compounds and Antioxidant and Antimicrobial Activities of Some Common Herbs. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2017, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2017/3475738>.

Bermúdez-Oria, A., Rodríguez-Gutiérrez, G., Vioque, B., Rubio-Senent, F., & Fernández-Bolaños, J. (2017). Physical and functional properties of pectin-fish gelatin films containing the olive phenols hydroxytyrosol

and 3,4-dihydroxyphenylglycol. *Carbohydrate Polymers*, 178, 368–377. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.09.042>.

Coma, M. E., Delgado, J. F., Peltzer, M. y Salvay, A. G. (2019). Water kefir grains as an innovative source of materials: Study of plasticiser content on film properties. *European Polymer Journal*, 2-4. kefir grains as an innovative source of materials. Study of plasticizer content on film properties. <https://www.researchgate.net/publication/335628948Water>.

Cottet, C., De la Osa, O., Delgado, J. F., Peltzer, M. A., Ramírez Tapias, Y. A. y Salvay, A. G. (2020). Biobased Materials from Microbial Biomass and Its Derivatives. *Materials* 2020, 13 (6), 9-14. <https://www.mdpi.com/1996-1944/13/6/1263>.

Gonçalves, C., Maia, F. R., Oliveira, J. M., Radhouani, H. y Reis, R. L. (2018). Biological performance of a promising Kefiran-biopolymer with potential in regenerative medicine applications: a comparative study with hyaluronic acid. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 29, 124. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10856-018-6132-7>

Guzel-Seydim, Z. B., Gökırmaklı, A., & Greene, A. K. (2021). A comparison of milk kefir and water kefir: Physical, chemical, microbiological and functional properties. *Trends in Food Science & Technology*, 113, 42–53. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.04.04>.

Mokhtarzadeh, A., Alibakhshi, A., Hejazi, M., Omidi, Y., & Ezzati Nazhad Dolatabadi, J. (2016b). Bacterial-derived biopolymers: Advanced natural nanomaterials for drug delivery and tissue engineering. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 82, 367–384. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.06.013>.

Moradi, Z., & Kalanpour, N. (2019). Kefiran, a branched polysaccharide: Preparation, properties and applications: A review. *Carbohydrate Polymers*, 223, 115100. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115100>. Pérez-Recalde, M., Ruiz Arias, I. E., & Hermida, L. B. (2018). Could essential oils enhance biopolymers performance for wound healing? A systematic review. *Phytomedicine*, 38, 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2017.09.024>.

Petropoulos, S., Fernandes, N., Barros, L., Ciric, A., Sokovic, M., & Ferreira, I. C. (2018). Antimicrobial and antioxidant properties of various Greek garlic genotypes. *Food Chemistry*, 245, 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.078>.

El antibiograma de discos, guía de normatización del Instituto Nacional de Salud de Bogotá. Serie de notas e informes técnicos No. 9. Ins, 1986.

<https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/IA/INS/antibiograma-de-discos>.

Vargas, S., Sampieri, S., López, S (2018). Síntesis y evaluación antibacteriana y antifúngica de un biopolímero base pectina y aceites vegetales. *Impacta, los universitarios y resultados para las organizaciones*, 15, 2126-2133.