

RAPHAELLA PUCETTI CARNEIRO

**DESENVOLVIMENTO DE UMA CULTURA
INICIADORA PARA PRODUÇÃO DE KEFIR**

**Faculdade de Farmácia da UFMG
Belo Horizonte, MG
2010**

RAPHAELLA PUCETTI CARNEIRO

DESENVOLVIMENTO DE UMA CULTURA INICIADORA PARA PRODUÇÃO DE KEFIR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Evelyn de Souza Oliveira
Lopes

Co-orientador: Prof. Dr. Jacques Robert Nicoli

Colaboradora: Prof^a. Dr^a. Lúcia Helena Esteves
dos Santos Laboissière

**Faculdade de Farmácia da UFMG
Belo Horizonte, MG
2010**

FOLHA DE APROVAÇÃO

RAPHAELLA PUCETTI CARNEIRO

**DESENVOLVIMENTO DE UMA CULTURA INICIADORA PARA
PRODUÇÃO DE KEFIR**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais pela seguinte banca examinadora:

Orientadora: _____
Prof.^a Dr.^a. Evelyn de Souza Oliveira Lopes

Prof.^a Dr.^a. Silvana da Motta

Prof. Dr. Marcelo Resende de Souza

Prof.^a. Dr.^a. Elisabeth Neumann

Belo Horizonte, 06 de Outubro de 2010.

Dedico este trabalho ao meu querido filho Lucas, meu esposo Fred e minha sogra Maria Helena, que estiveram comigo durante todo este trabalho, dividindo os momentos de alegria e sacrifício.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre ao meu lado e por ter me guiado em mais essa etapa da minha vida.

Ao meu querido filho Lucas pelo seu amor e pela alegria constante em minha vida.

Ao meu marido Fred pelo incentivo, por acreditar na minha capacidade, por estar sempre ao meu lado nos momentos de alegria e de dificuldades, pelo amor e compreensão.

Aos meus pais, Marlene e Januário, pela formação do meu caráter e por me incentivarem a perseguir meus ideais e lutar para concretização dos mesmos.

A minha mãe e principalmente minha sogra Maria Helena por cuidar com tanto carinho do meu filho nos momentos em que eu dedicava a esse trabalho.

A todos da minha família pelo carinho e compreensão da minha ausência durante este trabalho.

A minha orientadora, Dr^a. Evelyn de Souza Oliveira Lopes, pelo voto de confiança, constante incentivo, amizade e orientação.

Ao meu co-orientador, Dr. Jacques Robert Nicoli, pela disponibilidade e atenção dispensadas, pelas dúvidas esclarecidas e valiosas sugestões e correções que ajudaram a dar maior consistência a este trabalho. Além de seu exemplo como pesquisador e ser humano.

A Prof^a. Dr^a. Lúcia Helena Esteves dos Santos Laboissière, pelo carinho e atenção, pelo profissionalismo e exemplo de otimismo, pela imprescindível colaboração na análise sensorial e pelas sugestões e correções enriquecedoras.

Aos integrantes da banca examinadora: Dr^a. Elisabeth Neumann, Dr. Marcelo Resende de Souza e Dr^a. Silvana da Motta, pelas correções, observações, sugestões e valiosas contribuições na elaboração final deste trabalho.

À CAPES (Coordenação do Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida.

A Tássia pela enorme contribuição nos isolamentos dos micro-organismos, pelo apoio e amizade e por tornar a rotina dos experimentos mais divertida.

Ao doutorando João Luiz da Silva Moreira e em especial a Sílvia Crispim pelo carinho e preciosa contribuição na identificação das bactérias lácticas.

A Raquel Cadete pela paciência e contribuição na identificação das leveduras.

A Natália pela dedicação e auxílio nos experimentos de produção e análises do kefir, pelo companheirismo e amizade.

A Raquel Alvarenga pela cumplicidade, apoio e amizade.

A Andréa Carrara pelo carinho e atenção, sugestões e ajuda na técnica de Mapa de Preferência.

A Luciana Faria pelo seu exemplo de coragem e por compartilhar momentos tão especiais e de sacrifícios.

A todos os colegas dos laboratórios de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos, Microbiologia Industrial e Biocatálise e Tecnologia de Alimentos que fizeram do laboratório um ambiente familiar e alegre.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que se dispuseram a me ajudar, contribuíram para a realização deste trabalho e torceram pela minha vitória!

“Nada há a subtrair, nada a acrescentar às maravilhas de Deus; elas são incompreensíveis. Quando o homem tiver acabado, então estará no começo; e quando cessar a pesquisa, ficará perplexo.”

Eclo: 18, 5-6.

SUMÁRIO

LISTA DE APÊNDICES	xii
LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xvi
RESUMO.....	xvii
ABSTRACT	xviii
1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1 Leites fermentados	22
2.1.1 Definição.....	22
2.1.2 Classificação dos produtos lácteos fermentados.....	22
2.2 Probióticos	23
2.2.2 Seleção de probióticos.....	24
2.2.3 Micro-organismos probióticos	25
2.3 kefir.....	25
2.3.1 Definição.....	25
2.3.2 Aspectos gerais	26
2.3.3 Grãos de kefir	27
2.4 Características do kefir	29
2.4.1 Químicas.....	29
2.4.2 Nutricionais	30
2.4.3 Microbiológicas	32
2.4.4 Terapêuticas	34
2.4.4.1 Espectro antibacteriano.....	34
2.4.4.2 Atuação no trato gastrointestinal	34
2.4.4.3 Efeito hipocolesterolêmico.....	35
2.4.4.4 Atividade da β - galactosidase.....	36
2.4.4.5 Efeito anticarcinogênico	36

2.4.4.6	Estimulação do sistema imune	37
2.5	Culturas microbianas	37
2.5.1	Considerações tecnológicas	37
2.5.2	Bactérias do ácido láctico (BAL)	39
2.5.2.1	O gênero <i>Lactobacillus</i>	40
2.5.2.2	O gênero <i>Lactococcus</i>	41
2.5.2.3	O gênero <i>Leuconostoc</i>	41
2.5.3	Leveduras	42
2.5.4	Identificação	43
2.6	Fermentações láctica e alcoólica	44
2.6.1	Fermentação láctica	45
2.6.2	Fermentação alcoólica	46
2.7	Métodos de fabricação	46
2.7.1	Método tradicional	47
2.7.2	Métodos com culturas puras	48
2.7.2.1	Fermentação simultânea	48
2.7.2.2	Fermentação sucessiva	49
3	MATERIAIS E MÉTODOS	53
3.1	Matérias-primas para os ensaios tecnológicos	53
3.2	Métodos	53
3.2.1	Cultivo dos grãos de kefir	53
3.2.2	Obtenção do kefir com os grãos para isolamento dos micro-organismos	54
3.2.3	Isolamento, quantificação e identificação	55
3.2.4	Identificação molecular das BAL pela técnica de PCR-ARDRA	56
3.2.4.1	Extração do DNA	56
3.2.4.2	Amplificação utilizando os iniciadores 16S e 23S	57
3.2.4.3	Digestão por enzimas de restrição (PCR-ARDRA)	57
3.2.5	Sequenciamento de DNA das BAL	58
3.2.5.1	Sequenciamento e análise das sequências	58
3.2.6	Identificação molecular das leveduras	59
3.2.6.1	Extração do DNA	59
3.2.6.2	Amplificação utilizando os iniciadores NL1 e NL4	59
3.2.6.3	Purificação dos produtos de PCR e reação de sequenciamento	60
3.2.6.4	Análise das sequências	60

3.2.7	Elaboração da cultura iniciadora	60
3.2.8	Determinação da fase logarítmica (fase log)	61
3.3	Elaboração do kefir.....	61
3.3.1	Padronização do inóculo da cultura iniciadora	61
3.3.2	Métodos de obtenção do kefir	62
3.3.2.1	Produção do kefir pelo método tradicional.....	62
3.3.2.2	Método com culturas puras por fermentação sucessiva	63
3.3.2.3	Método com culturas puras por fermentação simultânea	65
3.4	Análises físico-químicas	66
3.4.1	pH.....	66
3.4.2	Acidez em ácido láctico.....	66
3.4.3	Viscosidade	66
3.4.4	Etanol	67
3.4.5	Sinérese	67
3.4.6	Densidade.....	67
3.5	Análises microbiológicas.....	67
3.5.1	Contagem de bactérias ácido lácticas	67
3.5.2	Contagem de leveduras	68
3.6	Análise sensorial	68
3.6.1	Perfil do consumidor	70
3.7	Análises da composição centesimal.....	72
3.7.1	Umidade	72
3.7.2	Resíduo mineral fixo (cinzas).....	72
3.7.3	Proteínas	72
3.7.4	Gordura	72
3.7.5	Lactose	72
3.7.6	Carboidratos totais.....	72
3.8	Análises estatísticas.....	73
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
4.1	Quantificação e identificação das BAL e leveduras.....	74
4.1.1	Identificação das BAL	76
4.1.2	Identificação das leveduras.....	82

4.2	Elaboração da cultura iniciadora.....	84
4.2.1	Determinação da fase log	84
4.3	Avaliação físico-química das formulações do kefir	86
4.4	Análise microbiológica.....	92
4.5	Avaliação sensorial	94
4.5.1	Teste de Aceitação	94
4.5.2	Teste de Intenção de Compra.....	104
4.6	Avaliação da composição centesimal das amostras de kefir.....	106
5	RESUMO DOS RESULTADOS E CONCLUSÃO	110
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	112
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113
	APÊNDICES.....	128

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A - Perfis de identificação para <i>Lactobacillus</i> por análise de restrição da região intergênica 16S-23S do rRNA	129
Apêndice B – Cálculo da quantidade de sacarose utilizada nas fermentações.....	131
Apêndice C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido dos Provedores	132
Apêndice D – Questionário demográfico/ Informações gerais sobre leites fermentados.....	134
Apêndice E – Modelo da ficha de avaliação utilizada nos testes sensoriais das amostras de kefir	136
Apêndice F – Termo de Consentimento Laboratório LASEC	138
Apêndice G – Termo de Consentimento Laboratório LAMIB	139
Apêndice H – Termo de Consentimento Laboratório TECAL.....	140
Apêndice I – Características morfológicas e fisiológicas das bactérias lácticas (BAL) isoladas do grão de kefir	141
Apêndice J – Características morfológicas e fisiológicas das leveduras isoladas do grão de kefir	142
Apêndice K – Relação absorvância versus contagem de células de cada linhagem presente na cultura iniciadora	143

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Exemplos de micro-organismos probióticos de leites fermentados	25
Tabela 2: Padrões físico-químicos e microbiológicos do kefir	30
Tabela 3: Composição nutricional do kefir	32
Tabela 4: Microbiota dos grãos de kefir, cultura mãe e bebida kefir	33
Tabela 5: Micro-organismos iniciadores para produtos lácteos	39
Tabela 6: Diferenciação dos principais gêneros das bactérias ácido lácticas	40
Tabela 7: Algumas propriedades fisiológicas e bioquímicas das leveduras importantes para aplicação em produtos lácteos	42
Tabela 8: Frequência e níveis populacionais médios de bactérias e leveduras isoladas dos grãos de kefir	75
Tabela 9: Identificação das BAL pelo kit API 50 CHL	77
Tabela 10: Identificação das BAL pelo Kit API 50 CHL e PCR -ARDRA 16S-23S rDNA ou seqüenciamento	80
Tabela 11: Identificação molecular de leveduras isoladas do grão de kefir	82
Tabela 12: Média dos valores das características físico-químicas de kefir produzido por três métodos diferentes após três dias de acondicionamento a 4°C	87
Tabela 13: Médias das notas de aceitação para as três formulações de kefir	95
Tabela 14: Médias das notas de intenção de compra para as três formulações de kefir.	104
Tabela 15: Composição centesimal e valor calórico das amostras de kefir obtida pelos três métodos de produção	107

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Grãos de kefir (FARNWORTH, 2005).....	28
Figura 2: Processo de fabricação do kefir com grãos (BESHKOVA et al., 2002).	47
Figura 3: Método de produção do kefir utilizando cultura pura por fermentação láctica e alcoólica simultânea (BESHKOVA et al., 2002).	49
Figura 4: Método de produção do kefir utilizando cultura pura por fermentação láctica e alcoólica sucessiva (BESHKOVA et al., 2002).	50
Figura 5: Produção de kefir usando diferentes métodos em uma segunda fermentação.	51
Figura 6: Grãos de kefir.....	54
Figura 7: Preparo das amostras de kefir.....	54
Figura 8: Fluxograma do método tradicional de produção do kefir usando grãos de kefir (adaptado de BESHKOVA et al., 2002).	63
Figura 9: Fluxograma de produção do kefir utilizando cultura iniciadora por fermentação láctica e alcoólica sucessiva (adaptado de BESHKOVA et al., 2002).	64
Figura 10: Fluxograma de produção do kefir utilizando cultura iniciadora por fermentação simultânea (adaptado de BESHKOVA et al., 2002).	65
Figura 11: Perfil sócio- demográfico dos consumidores.....	70
Figura 12: Informações sobre leites fermentados e kefir pelos consumidores.	71
Figura 13: Teste presuntivo para diferenciar micro-organismos produtores de gás.	75
Figura 14: Média da frequência de distribuição dos isolados do grão de kefir.	76
Figura 15: Perfil bioquímico apresentado por dois isolados por meio do kit API 50 CHL.	77
Figura 16: Foto do gel de agarose 1,4% mostrando o resultado da amplificação PCR correspondente à região intergênica 16S-23S rDNA de amostras de bactérias isoladas do grão de kefir.....	78
Figura 17: Perfil de restrição dos espaçadores longo, médio e curto, amplificados, da região intergênica 16S-23S do rDNA de <i>Lactobacillus casei</i> , em gel de agarose 1,4%.....	79
Figura 18: Características do crescimento das BAL em caldo M17 (<i>L. cremoris</i>) e MRS (<i>L. mesenteroides</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. casei</i>) a 22°C em condições de aerobiose durante 72 horas.	84
Figura 19: Características do crescimento das leveduras em caldo YM a 22°C em condições de aerobiose no intervalo de 72 horas.....	85
Figura 20: Contagem (log UFC/mL) das espécies <i>L. casei</i> , <i>L. cremoris</i> , <i>L. mesenteroides</i> , <i>L. lactis</i> , <i>K. unispora</i> e <i>T. delbrueckii</i> versus o tempo de crescimento em meio apropriado.	86
Figura 21: Valores médios de sinérese e viscosidade encontrados nas amostras de kefir tradicional (TRAD), kefir simultâneo (SIM) e kefir sucessivo (SUC).	91

Figura 22: Contagem total (expresso em $\log_{10}$ UFC/g) de bactérias do ácido láctico (BAL) e leveduras presentes nas amostras de kefir TRAD, SIM e SUC após três dias de armazenamento a 4°C.....	93
Figura 23: Histograma de frequência das porcentagens de aprovação e rejeição em relação ao atributo consistência das três amostras de kefir..	97
Figura 24: Histograma de frequência de notas para os atributos aroma, efervescência, acidez e consistência e para a impressão global referente às amostras de kefir SIM, SUC e TRAD, respectivamente.	98
Figura 25: Histograma de frequência das porcentagens de aprovação e rejeição quanto à aceitação global das três amostras de kefir.....	100
Figura 26: Histograma de frequência das porcentagens de aprovação e rejeição em relação ao atributo efervescência das três amostras de kefir.....	101
Figura 27: Representação gráfica das dimensões 1 e 2 do Mapa Interno da Preferência para as três amostras de kefir em relação à impressão global.	103
Figura 28: Porcentagens de intenção de compra positiva e negativa no teste de intenção de compra para as três amostras de kefir.....	105
Figura 29: Modificações sugeridas às três formulações de kefir pelos consumidores.	106

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

TGI	Trato gastrointestinal
SNG	Sólidos não gordurosos
UHT	Ultra High Temperature (ultrapasteurização)
HTST	High Temperature Short Time (pasteurização rápida)
BAL	Bactérias ácido lácticas
BAA	Bactérias ácido acéticas
DVS	Direct vat set
UFLA	Universidade Federal de Lavras
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
MRS	Man, Rogosa & Sharpe (meio de cultura)
YM	Yeast Malt (meio de cultura)
UFC	Unidades formadoras de colônia
ANOVA	Análise de variância
LDLc	<i>Low density lipoprotein cholesterol</i> (lipoproteína de baixa densidade - colesterol)
HDLc	<i>High density lipoprotein cholesterol</i> (lipoproteína de alta densidade - colesterol)
BALB/c	Tipo de linhagem de camundongos usada em laboratórios
g	gramas
mL	mililitros
ng	nanograma
µL	microlitro
pmol	picomol
mM	milimol/L
DNA	<i>Desoxy Ribonucleic Acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (ácido ribonucleico)
rDNA	Gene que codifica o RNA ribossomal
rRNA	RNA ribossomal
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
ARDRA	<i>Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis</i> (análise de restrição do DNA ribossomal amplificado)
16S	Tipo de RNA localizado na subunidade menor do ribossomo procarioto
23 S	Tipo de RNA localizado na subunidade maior do ribossomo procarioto
dNTP	<i>Deoxyribonucleotide triphosphate</i> (dideoxinucleotídeo trifosfato).
MMF	Meio mínimo de fermentação

RESUMO

O kefir é um leite fermentado de sabor ácido suave, efervescente e de baixo teor alcoólico, resultante da atividade metabólica dos micro-organismos presentes nos grãos de kefir, uma mistura complexa e específica de bactérias e leveduras envolvidas por uma matriz de polissacarídeo. O método tradicional de obtenção do kefir por culturas sucessivas com reinoculação dos grãos é de simples execução, mas sem possibilidade de controle, o que resulta em uma produção irregular. Assim, o objetivo deste trabalho foi isolar e identificar micro-organismos dos grãos de kefir para serem utilizados no desenvolvimento de uma cultura iniciadora capaz de produzir um kefir padronizado com as características típicas do kefir tradicional. Foram comparados três métodos para produção do kefir: o método tradicional utilizado como controle e dois métodos utilizando a cultura iniciadora selecionada, por fermentação simultânea e fermentação sucessiva, respectivamente. Para comparação, as bebidas resultantes foram submetidas a determinações físico-químicas, microbiológicas e sensoriais. Os diferentes métodos utilizados na elaboração do kefir influenciaram significativamente os aspectos de viscosidade e sinérese dos produtos. A técnica tradicional levou a um produto com menor acidez, enquanto os produtos desenvolvidos com cultura iniciadora apresentaram um menor tempo de fermentação. As contagens de leveduras e bactérias lácticas foram em média de 6,39 e 9,99 $\log_{10}$ de unidades formadoras de colônias (UFC). mL^{-1} , respectivamente. As intenções de compra dos produtos obtidos por cultura iniciadora foram semelhantes entre elas, enquanto o kefir tradicional recebeu maior percentual de intenção de compra negativa (73%). A técnica do Mapa de Preferência mostrou boa correlação com as análises feitas pelos testes de média (Tukey) e análise de frequência, indicando que as amostras obtidas de cultura iniciadora foram as mais aceitas. O método por fermentação simultânea foi considerado mais adequado para a elaboração do kefir, pois apresentou maior viscosidade, menor sinérese e preferência dos consumidores pela consistência. Concluindo, a cultura iniciadora desenvolvida no presente trabalho pode ser utilizada na produção de kefir já que levou a um produto com propriedades físico-químicas, microbiológicas e sensoriais similares ou superiores ao kefir tradicional.

Palavras-chave: kefir, cultura iniciadora, bactérias do ácido láctico, leveduras, análise sensorial, análise físico-química, identificação microbiana

ABSTRACT

The kefir is a fermented milk with sweet sour taste, self-carbonated, with low alcohol content, resulting from the metabolic activity of microorganisms present in kefir grains, a complex and specific mixture of bacteria and yeasts surrounded by a polysaccharide matrix. The traditional method of obtaining the kefir cultures by successive reinoculation grain is simple, but with no possibility of control which results in an irregular production. The objective of this study was to isolate and identify microorganisms in kefir grains to be used in the development of a starter culture capable of producing a standardized milk beverage with the typical characteristics of traditional kefir. Three methods for production of kefir were compared: the traditional method used as a control and two methods using the selected starter culture by simultaneous fermentation and subsequent fermentation, respectively. For comparison, the resulting beverages were submitted to physical-chemical, microbiological and sensory determinations. The different methods used in the manufacture of kefir significantly influenced aspects of viscosity and syneresis of products. The traditional technique resulted in a product with lower acidity, while the products developed with starter culture led to shorter fermentation time. The counts of yeasts and lactic bacteria averaged 6.39 and 9.99 log₁₀ colony forming units (CFU). mL⁻¹, respectively. Intentions to purchase products produced by starter culture were similar between them, while the traditional kefir received the highest percentage of negative intention to purchase (73%). The technique of preference mapping showed good correlation with the analyses done by the average tests (Tukey) and frequency analyses, indicating that the samples of starter culture were the most accepted. The method by simultaneous fermentation was considered the most appropriate method for the manufacture of kefir, due to its higher viscosity, lower syneresis and consumer preference for consistency. In conclusion, the starter culture developed in this work can be used to produce kefir as it has led to a product with physical-chemical, microbiological and sensorial characteristics similar or superior to traditional kefir.

Key words: kefir, starter culture, lactic acid bacteria, yeasts, sensory analysis, physical-chemical analysis, microbial identification

1 INTRODUÇÃO

As observações feitas pelo pesquisador *Metchnikoff*, no início do século XX, deram origem à “teoria da longevidade”, a qual postulava que o consumo de leite fermentado por *Lactobacillus* spp. dava origem à competição deste micro-organismo benéfico com outras bactérias putrefativas do intestino que abreviariam a vida humana por produzirem substâncias tóxicas. Essa teoria foi baseada na constatação de que camponeses búlgaros tinham vida longa e sua dieta era rica em leites fermentados (VASILJEVIC & SHAH, 2008). Embora essa teoria tenha superestimado o valor real do iogurte, estimulou extensivos estudos sobre o tema. Atualmente, sabe-se que apenas aqueles iogurtes e leites fermentados contendo micro-organismos probióticos podem ser considerados alimentos funcionais.

O termo probiótico proposto por R. Fuller em 1989 foi definido por uma comissão especializada conjunta FAO/WHO como “micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2002).

A definição de alimentos funcionais tem sido proposta por governos, indústrias e acadêmicos. Internacionalmente, o conceito de alimentos funcionais parece ser consensual. Os alimentos funcionais devem promover outros benefícios à saúde além das propriedades nutricionais básicas. Esses alimentos são consumidos em dietas convencionais, contudo apresentam capacidade de atuar em funções fisiológicas auxiliando na proteção contra doenças crônicas não-degenerativas (diabetes, hipertensão, câncer, doenças cardiovasculares, osteoporose) e infecções (KWAK & JUKES, 2001; MORAES & COLLA, 2006).

A indústria de laticínios está reagindo para aumentar a sua competitividade no segmento de alimentos funcionais, a fim de se adaptar à tendência de inovações em um mercado consumidor exigente, que se modifica rapidamente, além de ter que manter a liderança tecnológica na indústria de alimentos. O interesse por produtos alimentícios saudáveis, nutritivos, seguros e agradáveis para o consumidor tem crescido mundialmente, o que resulta em diversos estudos na área de produtos lácteos (THAMER & PENNA, 2006).

Associado à crescente preocupação com a dieta, as indústrias de laticínios estão respondendo com a pesquisa e o desenvolvimento de novos alimentos com alegações de propriedades funcionais/saúde. Ultimamente, cerca de 70% dos lançamentos de

leites fermentados no mercado europeu apresentam propriedades funcionais. O principal fator que contribuiu para o crescimento rápido deste mercado é a estimativa de que, pelo menos cerca de um sexto das causas de morte no mundo, encontra-se relacionada com a dieta. A adoção de uma dieta mais saudável por parte dos consumidores pode aumentar a expectativa e melhorar a qualidade de vida da população como um todo (BRANDÃO, 2002).

O kefir é um leite fermentado de sabor ácido suave, efervescente e de baixo teor alcoólico, resultante da fermentação do leite com grãos de kefir ou de uma cultura anterior preparada dos grãos (“cultura mãe”) (GARROTE et al., 1998).

Comparado ao iogurte, o kefir além de possuir uma escala maior e mais diversificada de micro-organismos viáveis em sua cultura inicial, também apresenta um nível de atividade da β -galactosidase 60% mais elevado, contribuindo para um aumento significativo da digestão da lactose do leite (HERTZLER & CLANCY, 2003). Também, difere do iogurte tradicional por ser menos viscoso e por conter, além de ácido láctico, etanol e gás carbônico. O ácido láctico produzido combina-se com os minerais cálcio e ferro, facilitando a absorção destes elementos e também aumentando a digestibilidade das proteínas, principalmente nos casos em que a secreção de ácido clorídrico está dificultada (GARCIA et al., 1984).

Além dos benefícios nutricionais e da alta atividade da β -galactosidase, acredita-se que os micro-organismos do kefir possuam várias outras propriedades terapêuticas, tais como: atividade antibacteriana, atuação no trato gastrointestinal, efeito hipocolesterolêmico, efeito anticarcinogênico e estimulação do sistema imune (OTLES & CAGINDI, 2003; FARNWORTH, 2005; SARKAR, 2007).

A produção artesanal-familiar do kefir fundamenta-se na cultura alimentar de povos do Cáucaso e difundiu-se, mundialmente, a partir do final do século passado, integrando suas indicações nutricionais-dietéticas e mesmo terapêuticas ao cotidiano alimentar atual. No Brasil, a bebida kefir vem sendo divulgada há pouco tempo e sua fabricação e seu consumo são exclusivamente artesanais, sendo obtido pela fermentação do grão em leite ou em água adicionada de açúcar mascavo. A maioria das pessoas em nosso país desconhece o produto, bem como os possíveis benefícios da inclusão deste alimento probiótico na dieta.

Apesar de resultar na formação de um produto que possui valor nutricional e terapêutico, o método tradicional de obtenção do kefir por culturas sucessivas com reinoculação dos grãos gera produtos não padronizados. A composição da microbiota pode variar de uma produção para outra, ocorrendo perda da cultura de leveduras e

bactérias durante a sequência de transferências e também varia de fonte para fonte. Assim, é difícil ou mesmo impossível a manutenção do padrão de qualidade. A aplicação de uma adequada combinação de bactérias ácido lácticas e leveduras iniciadoras, portanto, permitiria a produção do kefir como um produto uniforme associado a propriedades específicas.

Diante do exposto, o objetivo geral deste trabalho foi isolar e identificar micro-organismos dos grãos de kefir e a partir de uma cultura iniciadora selecionada desenvolver um kefir padronizado com as características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais próprias do kefir tradicionalmente obtido com o grão.

Os objetivos específicos do trabalho foram:

- (i) Quantificar e isolar bactérias do ácido láctico e leveduras em grãos utilizados na produção do kefir tradicional;
- (ii) Identificar as bactérias do ácido láctico e comparar os resultados obtidos por meio de kit bioquímico e métodos de genética molecular;
- (iii) Identificar as leveduras e comparar os resultados obtidos por meio de testes bioquímicos e fisiológicos e método de genética molecular;
- (iv) Desenvolver formulações da bebida empregando três métodos de produção: tradicional que utiliza o grão de kefir como inóculo e processos de fermentação simultânea e sucessiva de uma cultura iniciadora selecionada, respectivamente;
- (v) Comparar os produtos obtidos por meio de parâmetros físico-químicos e microbiológicos;
- (vi) Avaliar a aceitação e a intenção de compra das três formulações de kefir pelos consumidores;
- (vii) Definir o melhor método de processamento com cultura iniciadora selecionada para obtenção do kefir, levando em consideração aspectos físico-químicos, microbiológicos e sensoriais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Leites fermentados

2.1.1 Definição

São os produtos adicionados ou não de outras substâncias alimentícias, obtidas por coagulação e diminuição do pH do leite, ou reconstituído, adicionado ou não de produtos lácteos, por fermentação láctica mediante ação de cultivos de micro-organismos específicos. Estes micro-organismos específicos devem ser viáveis, ativos e abundantes no produto final durante seu prazo de validade. São exemplos de leites fermentados: iogurte, leite acidófilo, Kefir, Kumys e coalhada (BRASIL, 2007).

2.1.2 Classificação dos produtos lácteos fermentados

Leites fermentados são fabricados em todo mundo e cerca de 400 nomes genéricos são atribuídos aos produtos tradicionais e industrializados. Mas, na verdade, a lista pode incluir poucas variedades (TAMINE, 2002). ROBINSON e TAMINE (1990) propuseram um esquema para classificação dos leites fermentados, baseado nos micro-organismos predominantes no produto e seus principais metabólitos:

- fermentações por bactérias lácticas: a) mesofílicas: *buttermilk*, *filmjolk*, *tatmjolk* e *langofil*; b) termofílicas: iogurte, *butter-milk* búlgaro, zabadi, dahi; e c) probióticas ou terapêuticas: leite acidófilo, Yakult, ABT, Onka, Vifit – o grupo mais conhecido mundialmente;
- fermentações por bactérias lácticas e leveduras: Kefir, Kumys, leite acidófilo com leveduras;
- fermentações por bactérias lácticas e bolores: villi.

TAMINE e MARSHALL (1997) sugeriram que os leites fermentados na forma de bebidas carbonatadas deveriam ser classificados separadamente dos leites fermentados, tal procedimento minimizaria confusões entre os consumidores.

Já o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) classificam os leites fermentados em (BRASIL, 2007):

- Iogurte, Yogur ou Yoghurt: fermentação com cultivos protosimbióticos de *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* ssp.

bulgaricus, aos quais se podem acompanhar, de forma complementar, outras bactérias ácido-láticas.

- Leite Fermentado ou Cultivado: fermentação com um ou vários dos seguintes cultivos: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium* spp., *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* e/ou outras bactérias ácido-láticas.
- Leite Acidófilo ou Acidofilado: exclusivamente com cultivos de *Lactobacillus acidophilus*.
- kefir: fermentação com cultivos ácido-láticos elaborados com grãos de kefir, *Lactobacillus* kefir, espécies dos gêneros *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Acetobacter* com produção de ácido láctico, etanol e dióxido de carbono. Os grãos de kefir são constituídos por leveduras fermentadoras de lactose (*Kluyveromyces marxianus*) e leveduras não fermentadoras de lactose (*Saccharomyces omnisporus* e *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces exiguus*), *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium* spp. e *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*.
- Kumys: cultivos de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* e *Kluyveromyces marxianus*;
- Coalhada ou Cuajada: cultivos individuais ou misto de bactérias mesofílicas produtoras de ácido láctico.

2.2 Probióticos

2.2.1 Definições

O termo probiótico proposto por R. Fuller em 1989 foi definido por uma comissão especializada conjunta FAO/WHO como “micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2002).

Tal definição não exige mudanças na microbiota intestinal ou na denominada “colonização” ou na colonização temporária do trato gastrointestinal (TGI) humano uma vez que os micro-organismos probióticos podem exercer seus efeitos localmente ou durante a passagem pelo sistema gastrointestinal. A definição estabelece que os micro-organismos devem estar vivos. Embora o número específico de micro-organismos não seja mencionado na definição, OUWEHAND et al. (2002) sugerem que seja necessário no mínimo 10^9 unidades formadoras de colônias por dia. A associação de leites fermentados e bebidas lácteas do Japão recomenda o mínimo de 10^7 ufc/g ou mL, mas

outros já sugeriram uma dosagem de 10^5 (FARNWORTH, 2008). No entanto, além do efeito de diluição intestinal, as duras condições do trato gastrointestinal e o ambiente estressante associado ao baixo pH do estômago, sais biliares e enzimas digestivas, exigem que um grande número de micro-organismos probióticos seja consumido para garantir que um número adequado de micro-organismos sobreviventes alcance seus sítios de ação no TGI inferior (FARNWORTH, 2008).

Muitos estudos têm mostrado que os probióticos devem ser consumidos diariamente, pois eles não colonizam o intestino e desaparecem do TGI quando o consumo é interrompido (ALANDER et al., 1999).

A definição de probiótico segundo SALMINEN et al. (1999) poderá mudar pouco a pouco, pois especialmente os cientistas japoneses têm demonstrado que micro-organismos probióticos inativados ou as estruturas de suas células também podem ter efeitos benéficos na saúde humana. Porém, a maioria das evidências clínicas já relatadas foram feitas com linhagens viáveis e relativamente poucos efeitos foram documentados com linhagens não-viáveis (OUWEHAND & SALMINEN, 1998; OUWEHAND et al., 2002).

2.2.2 Seleção de probióticos

O critério de seleção para uma bactéria ácido láctica ser usada como probiótica inclui as seguintes propriedades (PARVEZ et al., 2006):

- exercer efeito benéfico no hospedeiro;
- suportar as condições do alimento em número elevado de células, e permanecer viável durante toda a vida-de-prateleira do produto;
- resistir à passagem pelo TGI;
- aderir às células do intestino e colonizar o lúmen do trato (para alguns autores a colonização não é necessária);
- produzir substâncias antimicrobianas aos patógenos;
- equilibrar a microbiota intestinal.

Além disso, os probióticos potenciais precisam ter boas propriedades tecnológicas para que possam ser cultivados em grande escala, ter uma vida de prateleira aceitável, tolerância aos aditivos e processamentos industriais e, no caso de aplicações em produtos fermentados, contribuir com um bom sabor (OUWEHAND et al., 2002).

2.2.3 Micro-organismos probióticos

Atualmente, vários produtos contendo micro-organismos probióticos estão disponíveis em muitos mercados para os consumidores, e alguns exemplos são: leite “sweet” acidófilo, queijos, sorvete, leite em pó infantil e leites fermentados (TAMINE & MARSHALL, 1997). Entretanto, o leite fermentado é o veículo popular mais usado na indústria para a introdução da microbiota probiótica em humanos (TAMINE, 2002).

Pesquisadores em diferentes países utilizaram vários micro-organismos probióticos e a Tabela 1 ilustra alguns exemplos.

Tabela 1: Exemplos de micro-organismos probióticos de leites fermentados

Gênero	Espécie microbiana
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. acidophilus</i>
	<i>L. acidophilus</i> linhagens LC1, La5, La1, La7, Gilliland
	<i>L. casei</i> linhagens Shirota, Imunitass, NCC208
	<i>L. rhamnosus</i> GG
	<i>L. johnsonii</i>
	<i>L. helveticus</i>
	<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>
	<i>L. gasseri</i>
	<i>L. plantarum</i>
	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> e ssp. <i>tolerans</i>
	<i>L. reuteri</i>
	<i>L. brevis</i>
	<i>L. cellobiosus</i>
	<i>L. fermentum</i>
	<i>L. curvatus</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>L. lactis</i>
	<i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. adolescentis</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. animalis</i> , <i>B. thermophilum</i>
<i>Pediococcus</i>	<i>P. acidilactici</i>
<i>Lactococcus</i>	<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i>
<i>Saccharomyces</i>	<i>S. boulardii</i> e <i>S. cerevisiae</i>

Fonte: TAMINE, 2002; PARVEZ, 2006.

2.3 kefir

2.3.1 Definição

A legislação brasileira vigente (BRASIL, 2007) define **kefir** como o “produto resultante da fermentação do leite pasteurizado ou esterilizado, por cultivos ácido-lácticos elaborados com grãos de kefir, *Lactobacillus kefir*, espécies dos gêneros *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Acetobacter* com produção de ácido láctico, etanol e dióxido de carbono. Os grãos de kefir são ainda constituídos por leveduras fermentadoras de lactose (*K. marxianus*) e leveduras não fermentadoras de lactose (*S.*

onisporus, *S. cerevisiae* e *S. exiguus*), *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium spp.* e *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus*”, devendo apresentar as seguintes características (AQUARONE, 2001): homogeneidade e consistência cremosa; sabor acidulado, picante e ligeiramente alcoólico; acidez menor que 1,0 g de ácido láctico/100g; teor alcoólico entre 0,5 e 1,5 (%v/m); bactérias lácticas totais no mínimo 10^7 ufc/g; leveduras específicas no mínimo 10^4 ufc/g e acondicionamento em frascos com fecho inviolável.

2.3.2 Aspectos gerais

Kefir é um leite fermentado carbonatado refrescante com leve sabor ácido, feito de grãos de kefir, uma mistura complexa e específica de bactérias e leveduras “presas” por uma matriz de polissacarídeo. kefir significa “sentir-se bem” em turco e é inserida na categoria de bebida fermentada com uma mistura de ácido láctico e etanol (SARKAR, 2008). É também conhecido por *Kefyr*, *Kephir*, *Kefer*, *Kiaphur*, *Knapon*, *Kepi* e *Kippi*.

Os grãos e a tecnologia empregada na fabricação do kefir tradicional podem variar significativamente e, conseqüentemente, produtos com diferentes composições serão formados (OTLES E CAGINDI, 2003). Normalmente, a porcentagem de ácido láctico varia de 0,8 a 1,1(% m/m) e a de álcool de 0,5 a 1,0 (% m/v). Na Áustria, por exemplo, tem-se a preferência por um produto com baixos teores de gás carbônico, álcool e ácidos (GARCIA et al.,1984).

O kefir ocupa um importante lugar na dieta humana em muitas partes do mundo incluindo Sudoeste da Ásia, Leste e Norte da Europa, América do Norte, Japão (OTLES e CAGINDI, 2003), Oriente Médio, Norte da África e Rússia (SARKAR, 2007, 2008) devido a seus significativos valores terapêutico e nutricional. É recomendado para lactentes acima de seis meses (IVANOVA et al., 1980; SARKAR, 2007) e o *bifidokefir*, que contém células ativas de *Bifidobacterium bifidum*, provou ser mais eficaz do que o kefir tradicional na eliminação de infecção intestinal em crianças (MURASHOVA et al., 1997; SARKAR, 2007).

Na Rússia, onde é produzido e comercializado em larga escala, é o leite fermentado mais popular depois do iogurte. Nos Estados Unidos, o produto é comercializado há mais de 20 anos, e este pode ou não conter álcool. No Brasil, o kefir é pouco conhecido. Todavia, é obtido a nível caseiro, principalmente por pessoas procedentes de países onde ele é de uso tradicional (GARCIA et al.,1984).

2.3.3 Grãos de kefir

A produção do grão de kefir é baseada no cultivo contínuo em leite, que resulta no aumento da biomassa de 5 a 7% por dia (LIBUDZISZ & PIATKIEWICZ, 1990). Mas, os grãos de kefir podem somente crescer a partir de grãos preexistentes (SHOEVEERS & BRITZ, 2003). MOTAGHI et al. (1997) produziram grãos de kefir em um saco de pele de cabra usando leite pasteurizado inoculado com micro-organismos da microbiota intestinal de ovelhas e a cultura foi formada na superfície do leite.

Apesar da intensa pesquisa e muitas tentativas realizadas para produzir grãos de kefir a partir de culturas puras ou mistas, normalmente presentes nos grãos, nenhum resultado positivo foi relatado (LIBUDZISZ & PIATKIEWICZ, 1990). Isto provavelmente pode ser atribuído ao fato de que muito pouco se sabe sobre o mecanismo de formação dos grãos. É muito provável que uma combinação de diferentes fatores tem influência no aumento da biomassa dos grãos de kefir, incluindo a renovação de leite em intervalos regulares, a temperatura de cultivo, lavagem dos grãos e a presença de nutrientes essenciais na concentração correta no meio de crescimento (CHEN et al., 2009).

Os grãos de kefir lembram pedaços de corais ou pequenos segmentos de couve-flor ou pipoca com diâmetro variando de 3 a 20 mm (LIBUDZISZ & PIATKIEWICZ, 1990; OTLES & CAGINDI, 2003). São partículas gelatinosas brancas ou amarelas que contém bactérias ácido-lácticas (*Lactobacilos*, *lactococos*, *leuconostoc*), bactérias ácido-acéticas (*acetobacter*) e leveduras misturadas com caseína e açúcares complexos presos numa matriz de polissacarídeos, descrita como uma associação simbiótica (Figura 1).

Diferentes relatos apontam falta de padronização na proporção grão/leite usada na produção de kefir. Vários autores empregaram 20-50g/L, enquanto outros utilizaram 20-100g/L e 50-100g/L. REA et al. (1996) usaram 1g/L como iniciadora, já MARSHALL & COLE (1985) usaram 200g de grãos de kefir para fermentar um 1L de leite.

GARROTE et al. (1998) sugeriram a concentração de 10g/L de grãos de kefir adequada para produzir um produto viscoso e não muito ácido, já a concentração 100g/L foi recomendada para uma bebida ácida, com baixa viscosidade e mais efervescente. Mas, segundo SARKAR (2008), a proporção 5% provou ser adequada para produção de etanol e ácidos voláteis.



Figura 1: Grãos de kefir (FARNWORTH, 2005)

A composição populacional varia com a origem dos grãos como também o método de cultivo e substrato adicionado. WITTHUHN et al. (2005a) mostraram que a composição das espécies microbianas varia de acordo com o método usado para produção de kefir e também notaram que o número de micro-organismos diminuiu com o tempo de produção.

A organização dos micro-organismos no grão não é completamente conhecida. A matriz do grão é composta por um complexo de 13% de proteína (massa seca), 24% de polissacarídeo, detritos celulares e componentes desconhecidos (OTLES e CAGINDI, 2003). O principal polissacarídeo é uma substância hidrossolúvel denominada kefirano.

É recomendado que os grãos de kefir, em operações comerciais, sejam mantidos viáveis por propagações diárias e devem ser substituídos caso a capacidade para fermentar o leite se torne prejudicada (KOROLEVA, 1982; FARNWORTH, 2005).

Segundo WITTHUHN et al. (2005a), não é recomendada a secagem do grão ao ar para aplicação comercial devido ao desenvolvimento de coloração e sabores indesejáveis.

O armazenamento sob baixas temperaturas parece ser o melhor caminho para manter as propriedades dos grãos de kefir por longo período. GARROTE et al. (1998) mostraram que os grãos de kefir armazenados a -80°C ou -20°C por 120 dias não alteraram as características de fermentação comparado aos grãos frescos. Entretanto, grãos acondicionados a 4°C não obtiveram qualidade aceitáveis após serem refrigerados.

Ingredientes bioativos no kefir

A área de alimentos funcionais tem despertado grande interesse, visto que hoje é reconhecido que muitos alimentos contêm ingredientes bioativos que conferem benefícios a saúde ou resistência a doenças.

Os próprios micro-organismos (vivos ou mortos), os metabólitos dos micro-organismos formados durante a fermentação (incluindo antibióticos ou bacteriocinas), ou fragmentos da matriz de alimentos, tais como peptídeos, podem ser responsáveis por estes benefícios (OUWEHAND & SALMINEM, 1998).

Estudos feitos por FARNWORTH (2005) sobre o teor de peptídeos na bebida kefir apresentaram um grande número de peptídeos e sua maioria de peso molecular menores ou iguais a 5000 KDa.

2.4 Características do kefir

2.4.1 Químicas

A composição físico-química do kefir pode variar conforme a idade dos grãos, as matérias-primas, a microbiota e a tecnologia utilizada no processamento (GARCIA et al., 1984).

O kefir geralmente apresenta as seguintes características: pH entre 4,2 e 4,6; cerca de 0,8% (m/m) de ácido láctico; álcool na proporção de 0,1 a 2,0% (m/v), conteúdo de gordura dependente do leite utilizado; textura macia; e um sabor ácido, picante e levemente efervescente, resultando numa bebida muito refrescante. As características de sabor picante e sensação efervescente podem ser consideradas como o sabor típico do kefir, o qual é devido principalmente à ótima proporção (3:1) entre diacetil e diacetaldeído (MANUS, 1979; KEMP, 1984; DUITSCHAVER et al., 1987; GORSKI, 1994; MESQUIARI, 1999).

LIUT KEVICIUS & SARKINAS (2004) relataram que os grãos de kefir contêm 86,3% de umidade, 4,5% de proteína, 1,2% de cinzas e 0,03% de gordura. Já a composição do típico kefir possui 89-90% de umidade, 0,2% de lipídios, 3,0% de proteína, 6,0% de açúcar, 0,7% de cinzas (OZER & OZER, 1999; SARKAR, 2007) e 1,0% de ácido láctico e de álcool (WEBB et al., 1987; SARKAR, 2007).

A quantidade de etanol e CO₂ produzidos durante a fermentação do kefir dependem das condições usadas. Produções modernas resultaram em níveis de etanol que variaram de 0,01-0,1% (m/m), enquanto kefir produzido de grãos em laboratórios atingiram valores de 0,25% (m/m). O teor de CO₂ é comparativamente baixo em

relação às outras bebidas fermentadas (KOROLEVA, 1982; FARNWORTH, 2005). Foram relatados valores de 0,85-1,05 g/L para kefir produzido de grãos (BESHKOVA et al., 2002; SIMOVA et al., 2002; FARNWORTH, 2005) e 1,7 g/L para kefir produzido de cultura iniciadora (GOBBETTI et al., 1990; citados por FARNWORTH, 2005).

O kefir é fonte de vários compostos com propriedades aromáticas tais como, acetaldeído, diacetil (BESHKOVA et al., 2003), ácidos pirúvico, acético, propiônico e butírico (GUZEL-SEYDIM et al., 2000; SARKAR, 2007). Estudos realizados por GUZEL-SEYDIM et al. (2000) mostraram que o kefir acondicionado a 4°C por 21 dias apresentou redução nas concentrações de etanol de 0,08%, acetaldeído de 11 µg/g e um declínio em acetoina de 16 µg/g. Entretanto, diacetil não foi detectado durante a fermentação ou acondicionamento.

KLYAVINYA (1980, citado por SARKAR, 2007) encontrou uma composição de 3,2-3,4%(m/m) de gordura, 8,0% (m/m) de sólidos não gordurosos e 5,0% (m/m) de sacarose para kefir destinado a alimentação infantil. A composição do kefir recomendada pela FAO/WHO (2003) é apresentada na Tabela 2.

Tabela 2: Padrões físico-químicos e microbiológicos do kefir

Parâmetros	Padrões
Proteína (%m/m)	min. 2,7%
Gordura (% m/m)	< 10,0 %
Ácido láctico (% m/m)	min. 0,6%
Etanol (% v/m)	Não mencionado
Contagem bacteriana total (UFC/g)	min. 10 ⁷
Leveduras (UFC/g)	min.10 ⁴

Fonte: FAO/WHO (2003).

2.4.2 Nutricionais

O kefir contém vitaminas, minerais e aminoácidos essenciais que auxiliam no tratamento e manutenção das funções do corpo. É rico em vitaminas B₁, B₁₂, cálcio, aminoácidos essenciais, ácido fólico e vitamina K. Considerado uma boa fonte de biotina, a vitamina B que ajuda na assimilação de outras vitaminas do complexo B, tais como ácido fólico, ácido pantotênico e vitamina B₁₂. Os numerosos benefícios das vitaminas do complexo B incluem regulação dos rins, fígado e sistema nervoso, auxílio no tratamento de pele, aumento de energia e promoção da longevidade. O kefir possui proteínas que são parcialmente digeridas, sendo facilmente utilizadas pelo organismo. Aminoácidos essenciais, como triptofano, precursor do neurotransmissor serotonina,

além dos minerais cálcio e magnésio que são importantes na saúde do sistema nervoso. É, ainda, uma boa fonte de fósforo, segundo mineral mais abundante no corpo, que auxilia na utilização de carboidratos, lipídeos e proteínas para crescimento celular, manutenção e energia (SALOFF-COSTE, 1996; OTLES & CAGINDI, 2003).

Teor de Vitamina – O teor em vitaminas do kefir é influenciado pelo tipo de leite bem como pela microbiota dos grãos. Foi observado um enriquecimento de 20% no teor de piridoxina (B₆) no kefir feito com leite de ovelha, cabra e égua e aumento de ácido fólico (B₉) com leite de ovelha, vaca e cabra (KNEIFEL & MAYER, 1991). ROCZNIAKOVA et al. (1974, citado por SARKAR, 2007) notaram uma diminuição no teor de vitamina B₁₂ (34-37%) devido à inclusão de *Propionibacterium peterssoni* e *Propionibacterium pituitosum*. Já CERNA & HRABORAVA (1982; citados por SARKAR, 2007) relataram uma diminuição de vitamina B₁₂ (30 vezes) e ácido fólico (cinco vezes) com um leve aumento de ácido pantotênico e vitamina B₆ devido ao uso de *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*.

Teor de Proteína - Foi encontrado aumento no teor de proteína, quando os grãos de kefir foram cultivados em soro (FIL'CHAKOVA & KOROLEVA, 1997) ou extrato de soja (ABRAHAM & ANTONI, 1999) em relação àqueles cultivados em leite. Durante a fermentação do leite, há uma mudança no perfil de aminoácidos e aumento da quantidade de treonina, serina, alanina, lisina e amônia (GUZEL-SEYDIM et al., 2003; SARKAR, 2007). LIUT KEVICIUS & SARKINAS (2004) estudaram o perfil de aminoácidos do kefir mostrando a presença de valina, isoleucina, metionina, lisina, treonina, fenilalanina e triptofano (Tabela 3).

Teor de Minerais – LIUT KEVICIUS & SARKINAS (2004) relataram a presença de macro-elementos tais como, potássio, cálcio, magnésio, fósforo e micro-elementos tais como, cobre, zinco, ferro, manganês, cobalto e molibdênio no kefir (Tabela 3).

Tabela 3: Composição nutricional do kefir

Atributos nutricionais	Componentes nutricionais	Concentração 100g
Vitaminas (mg)	Vitamina B1	<1
	Vitamina B2	<0,5
	Vitamina B5	0,3
Aminoácidos (g)	Treonina	0,18
	Lisina	0,38
	Valina	0,22
	Isoleucina	0,26
	Metionina	0,14
	Fenilalanina	0,23
	Triptofano	0,07
Minerais Macro elementos (g)	Potássio	1,65
	Cálcio	0,86
	Magnésio	1,45
	Fósforo	0,30
Micro elementos (mg)	Cobre	0,73
	Zinco	9,27
	Ferro	2,03
	Manganês	1,30
	Cobalto	0,02
	Molibdênio	0,03

Fonte: LIUT KEVICIUS E SARKINAS (2004).

2.4.3 Microbiológicas

A composição microbiológica dos grãos de kefir é ainda incerta. Várias pesquisas indicam que a microbiota do grão de kefir depende fortemente da origem do grão, das condições locais do cultivo e do acondicionamento e processo de fabricação (GARROTE et al., 2001).

KOROLEVA (1991) afirmou que bactérias e leveduras do kefir, quando isoladas e separadas, não cresciam no leite ou tinham sua atividade bioquímica reduzida, dificultando o estudo da população microbiana dos grãos de kefir.

Em geral, bactérias ácido-láticas (BAL) são mais numerosas (10^8 - 10^9 UFC/g) que leveduras (10^5 - 10^6 UFC/g) e bactérias ácido-acéticas (BAA) (10^5 - 10^6 UFC/g) nos grãos de kefir. Entretanto, as condições de fermentação podem afetar este padrão (KOROLEVA, 1991; GARROTE et al., 2001; FARNWORTH, 2005).

É reconhecido que as leveduras têm um importante papel na fabricação de leites fermentados, pois fornecem nutrientes essenciais de crescimento tais como

aminoácidos e vitaminas, altera o pH, libera etanol e produz CO₂ (VILJOEN, 2001). Porém, são menos estudadas que as bactérias, apesar de fornecerem ambiente para o crescimento das bactérias e produzirem metabólitos que contribuem com o sabor do kefir (CLEMENTI et al., 1989; KWAK et al., 1996; SIMOVA et al., 2002; FARNWORTH, 2005).

Segundo IRIGOYEN et al. (2005), as concentrações dos micro-organismos variam consideravelmente nos grãos de kefir, cultura mãe e bebida (Tabela 4).

Tabela 4: Microbiota dos grãos de kefir, cultura mãe e bebida kefir

Micro-organismos	Grãos (ufc/g)	Cultura mãe (ufc/g)	Bebida (ufc/g)
Lactococos	10 ⁶	10 ⁸ - 10 ⁹	10 ⁹
Leuconostoc	10 ⁶	10 ⁷ - 10 ⁸	10 ⁷ - 10 ⁸
Lactobacilos termofílicos	10 ⁸	10 ⁵	10 - 10 ⁸
Lactobacilos mesofílicos	10 ⁶ - 10 ⁹	10 ² - 10 ³	-
Bactérias ácido acéticas	10 ⁸	10 ⁵ - 10 ⁶	10 ⁴ - 10 ⁵
Leveduras	10 ⁶ - 10 ⁸	10 ⁵ - 10 ⁶	10 ⁴ - 10 ⁵

Fonte: REA et al., 1996; SARKAR, 2007.

WANG et al. (2004) encontraram as seguintes bactérias no kefir: *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* (8), *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (6), *Lactobacillus kefir* (2), *Lactobacillus acidophilus* (1), *Enterococcus faecalis* (7), *Enterococcus faecium* (2), *Streptococcus thermophilus* (1) e *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* (3). As leveduras identificadas foram *Zygosaccharomyces*, *Candida* e *Saccharomyces* spp. (WITTHUHM et al., 2004), *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces lactis* e *Saccharomyces cerevisiae* como microbiota dominante e *Saccharomyces unisporus*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Torulaspora delbrus*, *Torulaspora delbrueckii* e *Debaryomyces hansenii* (LORETAN et al., 2003; SARKAR, 2007).

2.4.4 Terapêuticas

Após fermentação, o kefir contém muitos ingredientes que são apontados como bioativos. Até hoje, um exopolissacarídeo foi identificado no kefir, embora outros possam estar presentes. Muitas bactérias encontradas no kefir têm apresentando atividade proteinase, e um grande número de peptídeos bioativos têm sido encontrados no kefir. Além disso, há evidência para afirmar que o consumo de kefir afeta não somente a digestão, mas também influencia o metabolismo e função imune em humanos (FARNWORTH, 2005).

2.4.4.1 Espectro antibacteriano

A atividade antibacteriana do kefir contra vários patógenos pode ser atribuída à produção de metabólitos como os ácidos orgânicos (ácidos láctico e acético), peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, etanol, diacetil e peptídeos (bacteriocinas) produzidos pelas BAL, BAA e leveduras durante a fermentação (FARNWORTH, 2005; SARKAR, 2007).

GARROTE et al. (2000) ao estudar a atividade inibitória do kefir obtiveram maior inibição dos micro-organismos Gram-positivo em relação aos Gram-negativo. Os autores também mostraram que as concentrações de ácido láctico ou ácido láctico mais ácido acético encontradas no sobrenadante do kefir apresentaram atividade inibitória contra *Escherichia coli*. CZAMANSKI et al. (2004) afirmaram que o kefir tem um maior efeito bacteriostático contra bactérias Gram-negativo, mas melhor efeito bactericida contra Gram-positivo.

SANTOS et al. (2003) mostraram que *Lactobacillus* isolados dos grãos de kefir apresentaram atividade antimicrobiana contra várias linhagens de *E. coli* (43/58), *Listeria monocytogenes* (28/58), *Salmonella typhimurium* (10/58), *S. enteritidis* (22/58), *Shigella flexneri* (36/58) e *Yersinia enterocolitica* (47/58). Os autores sugeriram que bacteriocinas seriam responsáveis por tal fenômeno, embora elas não tenham sido identificadas.

2.4.4.2 Atuação no trato gastrointestinal

Leites fermentados são capazes de restaurar a microbiota intestinal por inibir micro-organismos indesejáveis. A atividade antibacteriana é influenciada pela atividade da cultura, temperatura e tempo de armazenamento e nível inicial de contaminação.

Segundo MARQUINA et al. (2002), a ingestão de kefir aumentou significativamente o número de células de BAL na mucosa intestinal de ratos e diminuiu expressivamente a população de *Enterobacteriaceae* e *Clostridium*.

O kefir é útil no tratamento pós-operatório de pacientes ou de pacientes com doenças gastrintestinais (FIL'CHAKOVA & KOROLEVA, 1997; SARKAR, 2007). MURASHOVA et al. (1997) observaram que crianças com infecção intestinal grave ao ingerir *bifidokefir* (kefir contendo células de *Bifidobacterium bifidum*) apresentaram inibição rápida de *Salmonella* e *Shigella*, no intervalo de sete a 11 dias da doença e a microbiota voltou ao normal após $4,8 \pm 0,8$ dias, enquanto valores correspondentes ao grupo de crianças que não receberam *bifidokefir* foram de 12-18 dias e $6,6 \pm 0,9$ dias, respectivamente.

Já MERENSTEIN et al. (2009), ao verificarem o papel de um kefir disponível comercialmente nos Estados Unidos na prevenção de diarreia associada a antibiótico, não obtiveram resultados significativos. Os autores informaram o volume ministrado às crianças, mas não informaram a quantidade de micro-organismos presente na dose diária.

2.4.4.3 Efeito hipocolesterolêmico

Considerável atenção tem sido dada aos níveis de colesterol dos alimentos devido à sua importância de saúde pública, pois níveis elevados estão associados ao maior risco de doenças cardiovasculares.

Os possíveis mecanismos propostos para tentar explicar a ação exercida pelas BAL para reduzir o nível de colesterol são: ligação direta e incorporação das células bacterianas ao colesterol, assimilação do colesterol, impedindo sua absorção pelo organismo bem como a desconjugação dos sais biliares e produção de ácidos biliares livres em função da atividade da enzima hidrolase (WANG et al., 2009).

Estudos realizados com ratos alimentados com dieta rica em colesterol e suplementados com *Lactobacillus plantarum* MA2 isolado de kefir apresentaram redução significativa nos níveis séricos de colesterol total, LDLc e triacilgliceróis, enquanto não houve mudança no nível HDLc. Além disso, o colesterol total e triacilgliceróis do fígado também foram reduzidos. Já o colesterol e triacilgliceróis das fezes dos animais aumentaram significativamente (WANG et al., 2009).

2.4.4.4 Atividade da β -galactosidase

A intolerância à lactose (má absorção da lactose, hipolactemia intestinal) é uma condição prevalente dos mamíferos adultos, incluindo a maioria dos adultos humanos. Há muito mais grupos intolerantes à lactose do que tolerantes (JAY, 2005)

Muitas vezes o termo "intolerância à lactose" é utilizado como sinônimo de má digestão de lactose, mas este uso não é necessariamente correto. Má digestão de lactose significa simplesmente a digestão incompleta de lactose. E intolerância à lactose, por outro lado, significa a presença de sintomas gastrintestinais, como dor abdominal, flatulência, distensão abdominal, náuseas ou diarreia resultante da má digestão da lactose (HERTZLER & CLANCY, 2003).

DE VRESE et al. (1992) relataram melhoria na digestão de lactose ao dosar galactose no plasma sanguíneo de mini porcos alimentados com kefir inoculados com grão fresco em relação ao grão inativado termicamente (grupo controle).

O primeiro estudo realizado em adultos intolerantes à lactose demonstrou que o kefir natural melhorou a digestão da lactose tão bem como o iogurte natural e reduziu cerca de 65% das flatulências geradas na ingestão de leite. Isto pode ser explicado pelo alto nível da atividade da enzima β -galactosidase encontrada no kefir, a qual foi 60% maior que a presente no iogurte natural (HERTZLER & CLANCY, 2003). Outro fato importante, é que o trânsito intestinal de leites fermentados é mais rápido que o de leite.

2.4.4.5 Efeito anticarcinogênico

O papel anticarcinogênico dos leites fermentados pode ser atribuído, de um modo geral, a prevenção de câncer e supressão de tumores iniciais pelo decréscimo das atividades das enzimas que produzem compostos que convertem células pro-carcinógenas a carcinógenas ou pela ativação do sistema imune (KNEATING, 1985; citado por SARKAR, 2007).

GÜVEN et al. (2003), mostraram que camudongos expostos ao tetracloreto de carbono (uma hepatotóxina que induz danos oxidativos) e recebendo kefir por gavagem, tiveram diminuição dos níveis de tumores do fígado e rim, indicando que o kefir agiu como antioxidante. Além disso, o kefir foi mais eficaz do que a vitamina E (conhecida por suas propriedades antioxidantes) na proteção contra danos oxidativos.

A alimentação com kefir (2g/Kg de peso corporal por intubação) foi mais eficaz na inibição do crescimento do tumor (carcinoma pulmonar de Lewis) do que o iogurte,

quando ingerido pelos camundongos por nove dias após inoculação do tumor (FURAKAWA et al., 1990; FARNWORTH, 2005).

LIU et al. (2002) relataram que as propriedades anti-tumoral do kefir podem ser devidas aos micro-organismos, especialmente *Lactobacillus* (SANTOS et al., 2003) ou polissacarídeos produzidos durante a fermentação.

2.4.4.6 Estimulação do sistema imune

A estimulação do sistema imune também pode ocorrer devido a ação de exopolissacarídeos encontrados nos grãos de kefir. MUROFUSHI et al. (1983, 1986; citados por FARNWORTH, 2005) ao extrair kefirano dos grãos de kefir e alimentarem os camundongos, observaram que a redução do crescimento do tumor tinha ligação com uma resposta mediada por célula, e pareceu que a dose total de polissacarídeo determinou sua efetividade. FURUKAWA et al. (1992) também mostraram que a fração hidrossolúvel dos grãos de kefir (kefirano) pode atuar como um modulador da resposta imune.

VINDEROLA et al. (2006) observaram que frações de kefir, sobrenadante obtido após centrifugação, administradas a camundongos BALB/c induziram resposta a mucosa intestinal. O kefir foi capaz de manter a homeostasia intestinal, aumentando a produção de IgA, tanto no intestino delgado quanto grosso.

2.5 Culturas microbianas

2.5.1 Considerações tecnológicas

Lactobacilos e bifidobactérias têm sido os probióticos mais utilizados em alimentos com alegação de propriedades funcionais. Nesse contexto, a indústria de laticínios se posiciona como a que apresenta maior número de lançamentos de produtos funcionais, contendo culturas probióticas, em especial nos segmentos de iogurtes e leites fermentados. O Japão se apresenta como o país que lidera esse mercado com mais de 50 produtos lácteos diferentes contendo micro-organismos probióticos viáveis. Em países da Europa, como a Suécia, mais de 25% do mercado de fermentados é de produtos contendo probióticos (CHR. HANSEN, 2007).

No Brasil, os produtos lácteos funcionais contendo probióticos vêm sendo produzidos com *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium animalis* e *Lactobacillus casei* (CHR. HANSEN, 2007).

Segundo Heller (2001), quando o cientista Henneberg propôs usar *Lactobacillus acidophilus* para produzir um iogurte modificado que, posteriormente, recebeu nome de leite acidophilus, ele obteve um iogurte suave e este atributo foi mais relevante que os aspectos de saúde deste iogurte. Conseqüentemente, as espécies de lactobacilos usadas na fermentação foram e ainda são selecionadas com base em suas propriedades tecnológicas e não somente nos seus potenciais benefícios a saúde.

O aspecto principal da produção de leites fermentados probióticos é a interação entre probióticos e micro-organismos da cultura iniciadora. Apesar do pouco conhecimento sobre estas interações, os efeitos sinérgico e antagónico entre diferentes micro-organismos iniciadores são bem estabelecidos. Por exemplo, a cultura clássica do iogurte é caracterizada por uma protossimbiose entre *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. Este sinérgismo é percebido por uma acelerada e eficiente acidificação do leite e multiplicação dos micro-organismos pela troca de nutrientes entre eles. Esta relação não é propriedade de duas espécies, mas sim de duas linhagens específicas destas espécies. O antagonismo, por outro lado, é muitas vezes baseado na produção de substâncias que inibem ou inativam outras culturas relacionadas ou até mesmo bactérias de outras espécies. A capacidade de produzir bacteriocinas é freqüentemente discutida como uma propriedade desejável, entretanto, o antagonismo da cultura iniciadora pode ser um fator limitante para combinações entre a cultura iniciadora e probióticos. Outras atividades antagónicas produzidas pelas BAL têm sido descritas e as substâncias envolvidas são peróxido de hidrogénio, ácido benzóico, aminas biogénicas e ácido láctico (HELLER, 2001).

A Tabela 5 apresenta bactérias iniciadoras usadas em leites fermentados e algumas de suas propriedades fisiológicas relevantes.

Tabela 5: Micro-organismos iniciadores para produtos lácteos

Espécies ¹	Temp.de crescimento			Fermentação ácido láctica		Ácido láctico	pH final
	mínima	ótima	máxima	Homofermentativo	Heterofermentativo		
	°C					% m/m	
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	22	45	52	+		1,5-1,8	3,8
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i>	18	40	50	+		1,5-1,8	3,8
<i>L. helveticus</i>	22	42	54	+		1,5-2,2	3,8
<i>L. acidophilus</i>	27	37	48	+		0,3-1,9	4,2
<i>L. kefir</i>	8	32	43		+	1,2-1,5	—
<i>L. brevis</i>	8	30	42		+	1,2-1,5	—
<i>L. casei</i> ssp. <i>casei</i>		30		+		1,2-1,5	—
<i>S. thermophilus</i>	22	40	52	+		0,6-0,8	4,5
<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	8	30	40	+		0,5-0,7	4,6
<i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	8	22	37	+		0,5-0,7	4,6
<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>	8	22-28	40	+		0,5-0,7	4,6
<i>L. mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i>	4	20-28	37		+	0,1-0,2	5,6
<i>L. mesenteroides</i> ssp. <i>dextranicum</i>	4	20-28	37		+	0,1-0,2	5,6
<i>Bifidobacterium</i> (<i>bifidum</i> , <i>infantis</i> , etc)	22	37	48		+	0,1-1,4	4,5

Fonte: HELLER, 2001.

Quando a bactéria probiótica participa ativamente na fermentação, os aspectos da composição do alimento e de interação da matriz alimentar e cultura iniciadora devem ser levados em consideração. Uma importante variável é a produção de ácido láctico e, conseqüentemente, a redução do pH durante a fermentação que podem inibir os micro-organismos probióticos (HELLER, 2001).

2.5.2 Bactérias do ácido láctico (BAL)

As bactérias do ácido láctico compreendem um grupo composto por vários gêneros, como mostra Tabela 6, dentro do filo Firmicutes, classe Bacilli, que apresentam alguns fenótipos em comum: são Gram positivo, geralmente imóveis, não produzem esporos, quase sempre catalase negativo e anaeróbios aerotolerantes. Uma importante diferença dentre os subgrupos das BAL são os produtos formados durante a fermentação dos carboidratos. Um grupo, denominado de homofermentativo, produz ácido láctico como único ou principal produto, enquanto o outro grupo, denominado heterofermentativo, produz etanol, CO₂ e lactato em quantidades equimolares

(MADIGAN,1997; JAY, 2005). Em geral, são mesofílicas, mas podem crescer em baixas temperaturas como 5°C ou altas como 45°C, em situações específicas. A maioria das linhagens cresce em pH 4 a 4,5. São pouco proteolíticas e lipolíticas e requerem aminoácidos pré-formados, purina, pirimidina e vitaminas do complexo B para seu crescimento (JAY, 2005).

Tabela 6: Diferenciação dos principais gêneros das bactérias ácido lácticas

Gênero	Formato e arranjo	Fermentação
<i>Streptococcus</i>	Cocos em cadeias	Homofermentativo
<i>Leuconostoc</i>	Cocos em cadeias	Heterofermentativo
<i>Pediococcus</i>	Cocos em tétrades	Homofermentativo
<i>Lactobacillus</i>	Bastonetes geralmente em cadeias	Homofermentativo/ Heterofermentativo
<i>Enterococcus</i>	Cocos em cadeias	Homofermentativo
<i>Lactococcus</i>	Cocos em cadeias	Homofermentativo
<i>Paralactobacillus</i>	Bastonetes isolados ou em pares ou cadeias curtas	Homofermentativo

Fonte: MADIGAN et al.,1997; LEISNER et al.,2000.

2.5.2.1 O gênero *Lactobacillus*

Lactobacillus é o maior gênero incluído no grupo das BAL, contendo espécies substancialmente diferentes em características fenotípicas, bioquímicas, fisiológicas e genotípicas. É um gênero classicamente composto por espécies homofermentativas obrigatórias, heterofermentativas facultativas e heterofermentativas obrigatórias. Apresentam-se na forma de bastonetes ou cocobacilos Gram positivo, ocorrem isolados, aos pares ou formando cadeias curtas, são microaerófilos e fastidiosos. Não formam esporos e são catalase negativo. Crescem numa faixa de temperatura entre 2 e 53°C. São acidúricos ou acidofílicos, produzindo pH 4,0 em alimentos contendo carboidratos fermentáveis (FERREIRA, 2003; CRISPIM, 2008).

Os *Lactobacillus* constituem um grupo bastante diverso, com 106 espécies validamente descritas (DELLAGLIO & FELIS, 2007), sendo encontrados em uma variedade de habitat, como cavidade oral, trato intestinal e trato urogenital de humanos e outros animais; associado aos vegetais, à matéria orgânica, além de solos, água ou quaisquer outras fontes de substratos fermentáveis com alguns nutrientes especiais, como certas vitaminas, sais e aminoácidos.

Eles têm importante papel na produção e preservação dos alimentos e na manutenção de uma microbiota intestinal equilibrada. Em laticínios, os *Lactobacillus*

são empregados como fermentos para produção e maturação de queijos e leites fermentados. Podem também ser utilizados como culturas iniciadoras em muitos alimentos fermentados e são ainda componentes importantes na produção de produtos probióticos para homens e animais (FERREIRA, 2003).

2.5.2.2 O gênero *Lactococcus*

Os *Lactococcus* são cocos do grupo sorológico N de Lancefield, que anteriormente eram classificados como *Streptococcus*. São células esféricas ou ovóides Gram-positivo, não-móveis, catalase-negativas, que ocorrem em pares ou em cadeias. A temperatura ótima é 30°C, sendo que eles crescem a 10°C, mas não toleram 45°C, e a maioria das linhagens reage com o anti-soro do grupo N. O ácido L-Láctico é o principal produto final de fermentação (JAY, 2005).

Lactococcus lactis é comumente encontrado em superfícies de plantas e em leite. É usado como cultura iniciadora na produção de produtos lácteos, principalmente na fabricação de queijos (NOMURA et al., 2006).

A espécie *Lactococcus lactis* é subdividida em *L. lactis* ssp. *lactis* e *L. lactis* ssp. *cremoris*. A subespécie *cremoris* é geralmente distinguida da subespécie *lactis* por algumas características fenotípicas, incluindo o não crescimento a 40°C, em 4% de NaCl ou em pH 9,0, e a incapacidade de hidrolisar arginina. A subespécie *lactis* que utiliza o citrato foi recentemente reconhecida como *L. lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* e, nos últimos anos, estudos mostraram que esse microrganismo foi capaz de melhorar o balanço microbiológico intestinal de hospedeiro animal, sendo assim utilizado como microrganismo probiótico (NOMURA et al., 2006).

2.5.2.3 O gênero *Leuconostoc*

Os *Leuconostoc* são cocos Gram positivo, catalase negativo e anaeróbios facultativos (JAY, 2005). São morfologicamente similares aos *Streptococcus*, entretanto são heterofermentativos. Linhagens de *Leuconostoc* também produzem compostos aromáticos, como diacetil e acetoína por meio da utilização do citrato e são usados como culturas iniciadoras em fermentações lácteas. Algumas linhagens produzem quantidades grandes de dextrana quando cultivados em sacarose (MADIGAN et al., 1997).

Este gênero possui também outras características importantes em alimentos, são elas: tolerância a alta concentração de sal, o que lhes permite iniciar fermentação láctica, produzindo quantidades de ácido suficiente para inibir o crescimento de bactérias não lácticas; tolerância a altas concentrações de açúcares, crescendo em

misturas doces; produção de gás (CO₂) em quantidades consideráveis; participam do processo de fermentação de queijos e produzem alta quantidade de mucilagem em meios contendo açúcares (MADIGAN et al., 1997).

2.5.3 Leveduras

Alguns produtos como kefir, Kumys e Leben possuem algumas de suas características atribuídas às atividades das leveduras. Estas bebidas são produzidas pela fermentação do leite com uma mistura de bactérias ácido lácticas, leveduras e outras bactérias, como as bactérias ácido acéticas e têm como produto final uma bebida ácida, levemente alcoólica, líquida ou semi-líquida e efervescente (FLEET, 1990).

A microbiota de leveduras do kefir varia conforme sua fonte de fabricação, mas tem sido relatada como uma mistura de espécies fermentadoras e não fermentadoras de lactose, identificadas como *Kluyveromyces marxianus*, *C. kefir*, *C. pseudotropicalis*, *S. cerevisiae*, *S. exigiuus* e *T. holmii*. As leveduras *Kluyveromyces marxianus* e *S. cerevisiae* também estão presentes na fermentação de Kumys e Leben (ROGINSKI, 1988; FLEET, 1990).

Algumas propriedades das leveduras para seleção do crescimento e predominância em produtos lácteos estão listadas na Tabela 7.

Tabela 7: Algumas propriedades fisiológicas e bioquímicas das leveduras importantes para aplicação em produtos lácteos

-
1. Fermentação ou assimilação de lactose
 2. Produção de enzimas proteolíticas extracelulares
 3. Produção de enzimas lipolíticas extracelulares
 4. Assimilação de ácido láctico
 5. Assimilação de ácido cítrico
 6. Crescimento em temperaturas baixas
-

Fonte: FLEET (1990).

Kluyveromyces marxianus, por exemplo, é bastante conhecida pela produção de β -galactosidase e, conseqüentemente, pela assimilação de lactose no leite. *Debaryomyces hansenii* tem boa tolerância ao sal, um importante ingrediente utilizado na produção de alguns queijos. Linhagens de ambas as espécies têm capacidade de

produzir enzimas lipolíticas e proteolíticas e assim metabolizar proteína e gordura do leite (FLEET, 1990).

A fonte de carbono para a propagação de culturas de leveduras consiste usualmente de açúcares facilmente assimiláveis, como: glicose, frutose, manose, galactose, maltose, lactose hidrolisada entre outros. A utilização da sacarose não apresenta problemas, pois ela é hidrolisada, antes de ser transportada para o interior da célula em glicose e frutose. Ao contrário dos outros dissacarídeos, a lactose não é assimilada pela *S. cerevisiae* (CHEN & CHIGER, 1985; MESQUIARI, 1999).

As leveduras possuem, predominantemente, as vitaminas do complexo B, constituindo assim uma excelente fonte destas vitaminas para a nutrição humana e animal (AQUARONE, 2001).

A maior parte dos probióticos comercializados são bactérias. Apenas duas leveduras são usadas, *S. boulardii* na medicina humana e *S. cerevisiae* na medicina veterinária em bovinos. A vantagem de se trabalhar com levedura é que ela pode ser liofilizada, é rapidamente eliminada após interrupção da terapia e não é afetada pelo uso de antibacterianos (MARTINS et al., 2005).

A levedura *S. boulardii* faz parte de um dos poucos micro-organismos utilizados como probióticos que não são de origem humana e possui ao seu favor o maior número de ensaios laboratoriais e clínicos (MARTINS et al., 2005).

O grupo de pesquisa de MARTINS et al. (2005) demonstrou que uma linhagem de *S. cerevisiae*, isolada de cachaça, foi eficaz na proteção de camundongos contra desafios com patógenos intestinais.

2.5.4 Identificação

Pesquisas clássicas de taxonomia das bactérias lácticas eram baseadas em características morfológicas e fisiológicas. Posteriormente, foram incluídas a composição da parede celular, presença de ácidos graxos, quinonas e outras características celulares. A caracterização molecular foi se tornando uma importante ferramenta, por meio de várias técnicas como avaliação do conteúdo C-G do DNA, propriedades eletroforéticas dos produtos gênicos, estudos de hibridização DNA-DNA, além de estruturas e sequência de RNA ribossômico (rRNA). Essas pesquisas resultaram em mudanças drásticas na taxonomia das bactérias e, em especial, do gênero *Lactobacillus* (SCHLEIFER & LUDWIG, 1995). Atualmente, metodologias utilizadas para classificação de bactérias lácticas dependem da análise e sequenciamento do rRNA 16S, além de outras técnicas de biologia molecular. A

taxonomia baseada na análise e seqüenciamento do rRNA 16S revela que algumas taxas geradas com base em características fenotípicas não correspondem às relações filogenéticas (CRISPIM, 2008).

A identificação de *Lactobacillus* por métodos fenotípicos é notoriamente ambígua e complicada, sendo exigida, em muitos casos, determinação das características bacterianas além dos testes comuns de fermentação. Em geral, cerca de 17 testes fenotípicos são necessários para a identificação precisa de espécies de *Lactobacillus* (TANNOCK et al., 1999). A coloração de Gram, testes de catalase, produção de gás em presença de glicose e ausência de H₂S em ágar Tríplice Sugar Iron (TSI) são considerados métodos presuntivos na caracterização do gênero *Lactobacillus* (SNEATH et al., 1986). No entanto a concentração de células parece exercer uma forte influência na fermentação, dando resultados falso-negativos após 24-48h de incubação.

Os testes bioquímicos têm sido utilizados atualmente para uma identificação preliminar dos *Lactobacillus*, embora sua leitura seja até certo ponto subjetiva. É crescente a utilização de métodos baseados em biologia molecular devido a sua eficácia para determinação de espécies do gênero *Lactobacillus* (BARROS, 2003; MOREIRA et al., 2005; CRISPIM, 2008). As técnicas baseadas em biologia molecular são menos sujeitas a erros e os resultados são mais rápidos e seguros.

Os testes bioquímicos e fisiológicos usados para identificar leveduras são trabalhosos e algumas vezes ambíguos devido à variabilidade das linhagens. Dadas estas dificuldades e a impraticabilidade da maioria das espécies obtidas de cruzamentos genéticos, comparações moleculares são cada vez mais utilizadas para a identificação de leveduras (KURTZMAN & ROBNETT, 1998).

2.6 Fermentações láctica e alcoólica

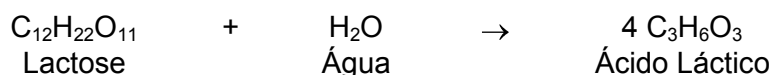
Além de serem mais estáveis, todos os alimentos fermentados possuem aroma e sabor característicos que resultam direta ou indiretamente dos organismos fermentadores. Os micro-organismos metabolizam carboidratos a fim de obter energia para seu crescimento. A metabolização desses substratos pode ocorrer na presença de oxigênio - metabolismo oxidativo – quando há predominância de bactérias aeróbias, com produção de H₂O e CO₂ e sem o acúmulo excessivo de produtos intermediários; ou na ausência de oxigênio metabolismo fermentativo - quando bactérias anaeróbias estritas ou facultativas utilizam carboidratos, acumulando os produtos intermediários ou

finais e, conseqüentemente, contribuindo com as características sensoriais do alimento. (FRANCO & LANDGRAF, 2005).

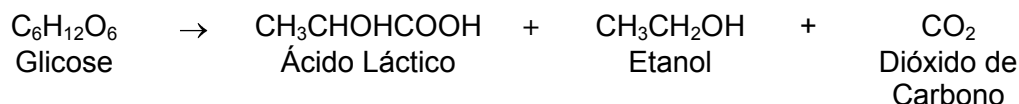
De acordo com o tipo de produto final formado, os processos fermentativos podem ser classificados em fermentação láctica, alcoólica, ácida mista, butanodiólica, butírica ou propiônica (FRANCO& LANDGRAF, 2005).

2.6.1 Fermentação láctica

A fermentação láctica pode ser caracterizada como homo e heteroláctica. A fermentação homoláctica é a mais comum entre os produtos lácteos. Resulta da ação de enzimas de bactérias lácticas sobre a lactose, que a desdobram primeiramente em glicose e galactose, e posteriormente reduzem a glicose ($\pm 90\%$) para ácido láctico, como ex., *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. lactis* pela seguinte reação:



A fermentação heteroláctica resulta do metabolismo de bactérias do gênero *Leuconostoc* e alguns *Lactobacillus* heterofermentadores (FRANCO& LANDGRAF, 2005) que desdobram a lactose a ácido láctico e outros metabólitos, como etanol e CO_2 , que são formados em partes aproximadamente iguais (FERREIRA, 1987).



As diferenças nos produtos finais da metabolização da glicose apresentadas pelas bactérias homo e heterofermentativas são resultados das diferenças genéticas e fisiológicas dessas bactérias. As bactérias homolácticas possuem as enzimas aldolase e hexose isomerase, mas não a fosfocetolase. Tais micro-organismos utilizam a via Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) para a produção de duas moléculas de lactato para cada molécula de glicose. Por sua vez, as bactérias heterolácticas possuem fosfocetolase, mas não aldose e hexose isomerase e, ao invés de utilizarem a via EMP para degradarem glicose, estes organismos utilizam as rotas das hexoses monofosfatos ou das pentoses (JAY, 2005).

A importância do ácido láctico na elaboração de leites fermentados deve-se à diminuição da estabilidade das micelas de caseína. Isto ocorre pela mudança da forma do fosfato e do cálcio de um estado coloidal para uma forma solúvel, que se difunde na parte aquosa do leite levando à precipitação da caseína em intervalos de pH entre 4,6

e 4,7 (ponto isoelétrico) e iniciando a formação do gel. Além disso, o ácido láctico confere sabor ácido e aroma ao produto (FERREIRA, 1987; TAMINE & ROBINSON, 1991).

2.6.2 Fermentação alcoólica

A produção de etanol e dióxido de carbono (CO_2) em produtos lácteos ocorre, principalmente, em produtos como Kefir e Koumiss, em que existe uma associação de micro-organismos capazes de metabolizar a lactose (AQUARONE, 2001).

Em condições aeróbicas e sob baixas concentrações de glicose, leveduras, mais comumente *S. cerevisiae*, crescem bem; entretanto, produzem pouco etanol. Em condições anaeróbicas, o crescimento é lento e o piruvato produzido durante o catabolismo é transformado em acetaldeído e CO_2 . O acetaldeído é então reduzido a etanol pela ação da enzima álcool desidrogenase. A reação geral produz dois moles de etanol e dióxido de carbono para cada mol de glicose consumido, e a energia da reação é armazenada como dois moles de ATP, para ser usada na biossíntese ou manutenção (CRUEGER & CRUEGER, 1993).

Teoricamente pode-se obter 0,511g de etanol a partir de um grama de glicose. Reações secundárias consomem uma pequena quantidade de glicose para produzir biomassa e produtos secundários. Assim, o rendimento real é reduzido a 95% do máximo teórico quando utiliza substratos puros e a 91% quando utilizam substratos complexos. Então 100 gramas de glicose pura produzem 48,4g de etanol, 46,6g de CO_2 , 3,3 g de glicerol e 1,2 g de biomassa (células de levedura) (CRUEGER & CRUEGER, 1993).

2.7 Métodos de fabricação

Existem vários métodos para produzir kefir. Atualmente, pesquisadores da área de alimentos estão estudando técnicas modernas para produzir kefir com as mesmas características encontradas no kefir tradicional (OTLES & CAGINDI, 2003).

O processo de fermentação do leite é de aproximadamente 24 horas, durante este tempo estreptococos ácido lácticos homofermentativos crescem rapidamente, causando inicialmente uma queda no pH. Este pH baixo favorece o crescimento de lactobacilos, mas causa um declínio no número de estreptococos. A presença de leveduras na mistura junto com a temperatura de fermentação (21-23°C) incentivam o

crescimento de estreptococos heterofermentativos produtores de aroma. Como resultado da fermentação, o crescimento das BAL é favorecido em relação ao crescimento de leveduras e BAA (KOROLEVA, 1982; FARNWORTH, 2005).

2.7.1 Método tradicional

O método tradicional de obtenção do kefir ocorre pela adição direta dos grãos. O leite contendo 3% de gordura, é homogeneizado entre 12,5-17,5 MPa, pasteurizado a 92°C/15 min, resfriado a 22°C, e inoculado com 3% de grãos de kefir. A fermentação é realizada a 22°C por 22h (pH 4,7), com 3-5 agitações manuais. O coágulo é resfriado lentamente a 10°C por 20 h. Os grãos de kefir são separados do leite fermentado usando uma peneira e lavados com água estéril antes de serem usados na próxima inoculação. O kefir é distribuído em garrafas de vidro de 500 ml (400 ml por garrafa) e acondicionado a 4°C (Figura 2).

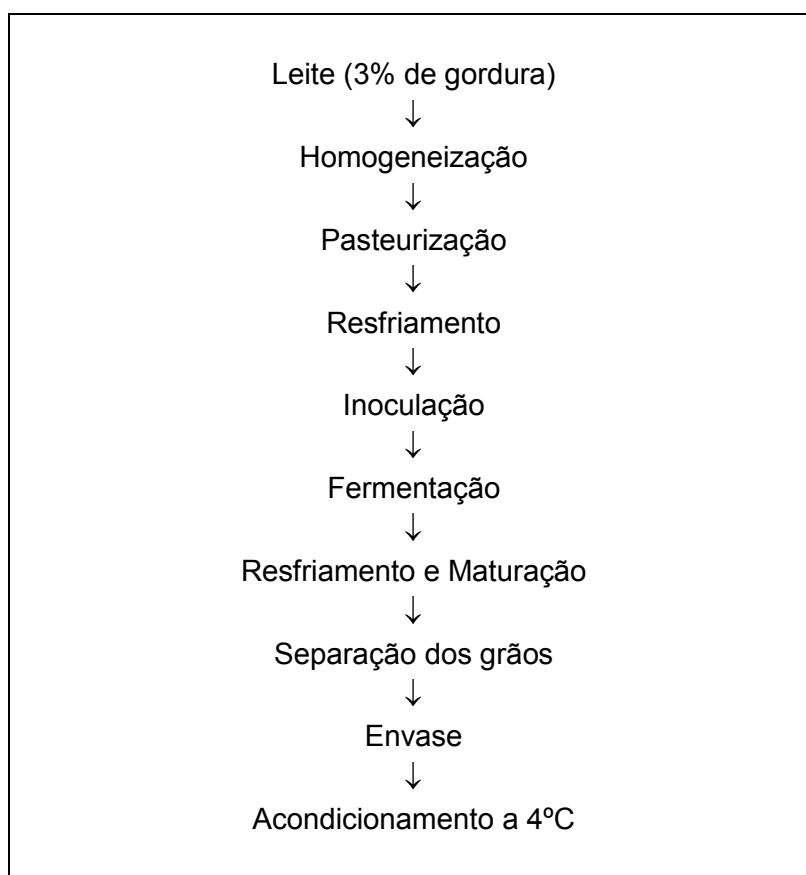


Figura 2: Processo de fabricação do kefir com grãos (BESHKOVA et al., 2002).

Este tipo de processamento apresenta várias desvantagens, são elas (DUITSCHAEVER, 1989):

1. A composição da microbiota dos grãos de kefir varia de fonte para fonte, também pode variar de uma produção para outra, ocorrendo perda da cultura de leveduras e bactérias durante a sequência de transferências. Assim, é difícil ou mesmo impossível a manutenção do padrão de qualidade;
2. O cultivo de grãos exige tempo, condições laboratoriais adequadas e uma equipe qualificada;
3. A cultura da qual os grãos tenham sido removidos não contem a mesma microbiota dos grãos considerados isoladamente. Os lactobacilos e, em menor extensão, as leveduras permanecem embebidos nos grãos e não migram para o meio externo (leite) durante a incubação. A composição e as propriedades da cultura *starter* (cultura-mãe) usada como inóculo no leite são muito diferentes daquelas observadas nos grãos. Desta forma, a qualidade do produto final não é uniforme.

2.7.2 Métodos com culturas puras

Dois métodos utilizando culturas puras têm sido sugeridos para superar as desvantagens dos métodos tradicionais de produção: por fermentação simultânea e por fermentação sucessiva (SARKAR, 2008).

BESHKOVA et al. (2002) usaram bactérias e leveduras isoladas dos grãos de kefir juntamente com as linhagens do iogurte (*S. thermophilus* + *L. bulgaricus*) para produzir kefir por dois processos de fermentação.

2.7.2.1 Fermentação simultânea

O leite após ser homogeneizado, pasteurizado e resfriado foi adicionado de 0,45% de sacarose e, posteriormente, inoculado com os micro-organismos iniciadores: cultura do iogurte, *L. helveticus*, *L. lactis* e *S. cerevisiae*. O leite inoculado, após agitação, foi distribuído em garrafas e incubado a 22°C até atingir pH 4,7. O coágulo formado foi resfriado lentamente a 10°C e o kefir, então foi armazenado a 4°C (Figura 3).

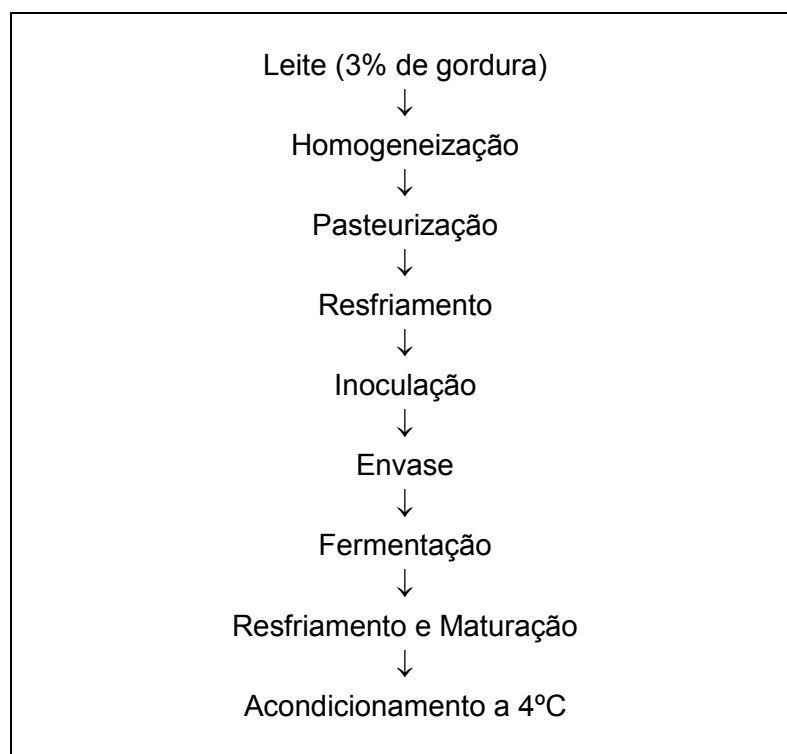


Figura 3: Método de produção do kefir utilizando cultura pura por fermentação láctica e alcoólica simultânea (BESHKOVA et al., 2002).

2.7.2.2 Fermentação sucessiva

O leite após ser submetido às etapas de homogeneização, pasteurização e resfriamento foi inoculado com as bactérias iniciadoras (cultura do iogurte, *L. helveticus*, *L. lactis*). A incubação foi realizada a 28°C até pH 4,7. O coágulo foi resfriado a 20°C e adicionado de sacarose (0,45%) e inoculado com *S. cerevisiae* (0,5%). Após agitação, o kefir foi envasado e incubado a 20°C por 16 h. O produto foi acondicionado a 4°C (Figura 4).

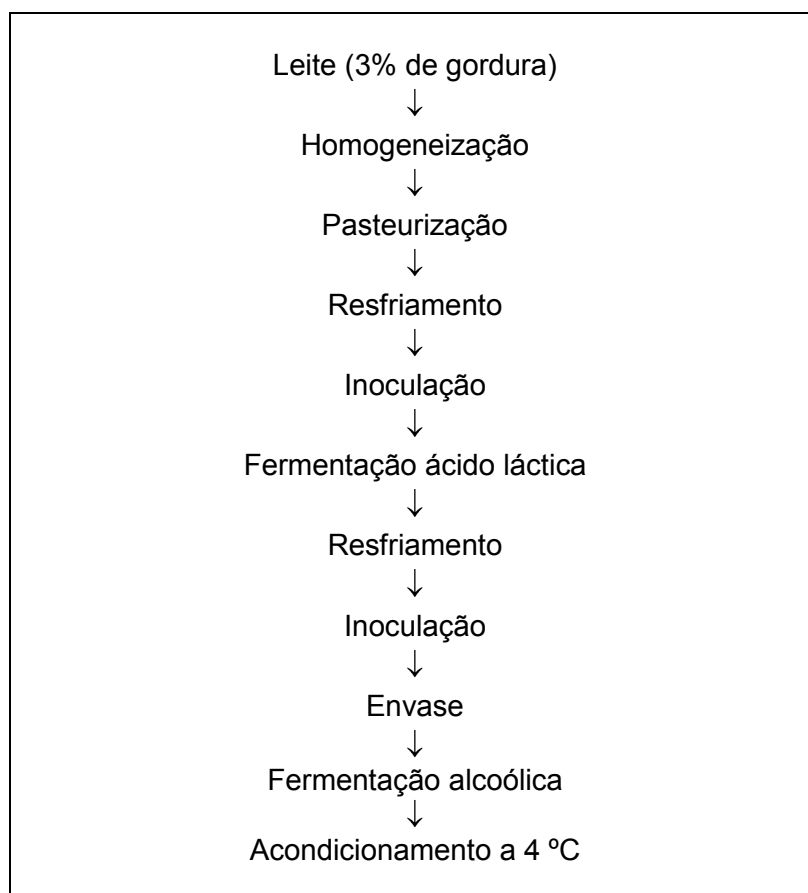


Figura 4: Método de produção do kefir utilizando cultura pura por fermentação láctica e alcoólica sucessiva (BESHKOVA et al., 2002).

KWAK et al. (1996) sugeriram o contrário, o processo de fermentação alcoólica seguido pela fermentação láctica visando o controle da produção de etanol e dióxido de carbono durante a estocagem. Entretanto, o kefir apresentou apenas 0,07% de etanol.

MARSHALL & COLE (1985) propuseram dois métodos para desenvolver uma bebida fermentada com características similares ao kefir tradicional e de aplicação industrial. Os métodos consistiram em duas etapas de fermentações (Figura 5):

1ª fermentação: O leite foi pasteurizado e adicionado de grãos de kefir, a temperatura ambiente. Após 18 h de incubação a 22°C, os grãos foram removidos do leite fermentado;

2ª fermentação:

Método I: o leite fermentado, sem os grãos, foi reincubado por mais 18h a 25°C.

Método II: adicionou-se 5% do leite fermentado obtido na 1ª fermentação a um novo leite pasteurizado e incubou a 25°C por 18h.

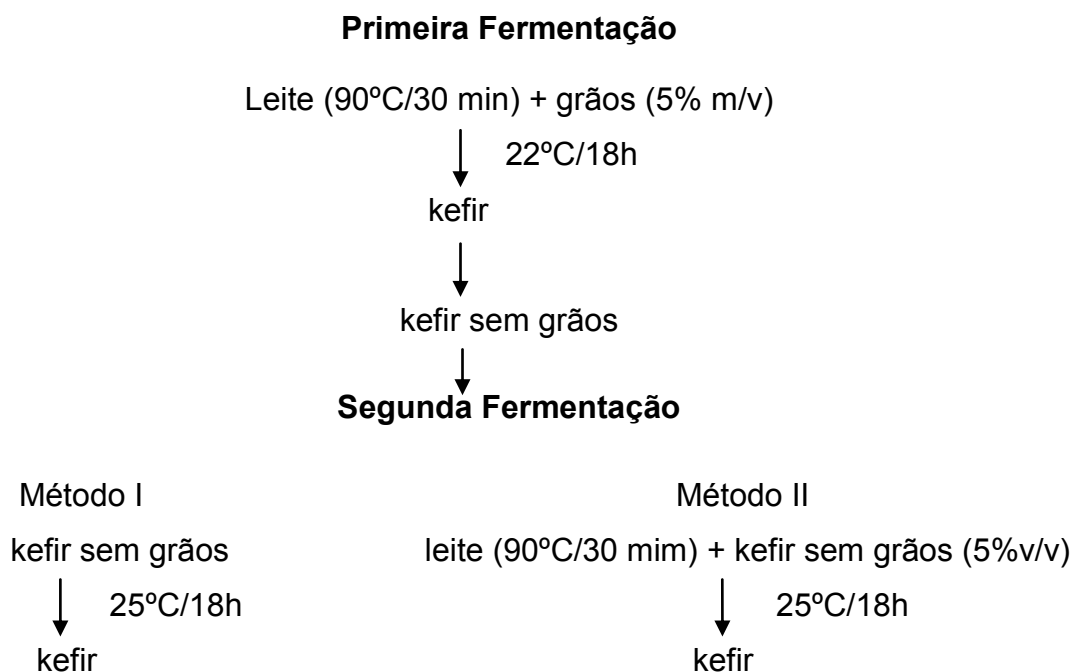


Figura 5: Produção de kefir usando diferentes métodos em uma segunda fermentação.

O método I resultou em uma bebida com uma boa efervescência, sabor pronunciado e maiores teores de etanol e CO_2 , apresentando assim, características próximas do kefir tradicional. Enquanto o método II apresentou maior rendimento, o que poderia ser considerado vantagem para produção em larga escala (MARSHALL & COLE, 1985).

Mas segundo SIMOVA et al. (2002) o kefir (sem grãos) tem um perfil microbiológico diferente dos grãos e, então, não poderia ser usado como inóculo em um novo lote de produção. Os grãos possuem uma microbiota dinâmica e complexa que desfavorece a produção comercial de um produto uniforme e estável (PETERSSON et al., 1985; FARNWORTH, 2005).

DUITSCHAEVER et al. (1988) avaliaram cinco procedimentos diferentes para produzir kefir: T1 - utilizou cultura pura e fermentação seqüencial (láctica seguida da alcoólica); T2 - utilizou cultura DVS (Direct Vat Set); T3 - utilizou cultura pura e fermentação simultânea; T4 - idem ao T3 seguido de uma incubação adicional (18h/ 20°C) e T5 - feito com os grãos de kefir

A maior pontuação na análise sensorial foi atribuída ao kefir produzido pelo procedimento 1 (T1). Este foi descrito como uma bebida de sabor ácido limpo, sem amargura, de textura suave, aroma agradável e com leve sabor picante, em geral uma bebida muito refrescante. Enquanto o kefir obtido do tratamento 4 (T4) foi significativamente mais fervescente em relação ao kefir do tratamento 3 (T3), mas em

relação aos atributos de viscosidade, aroma e sabor não houve diferença significativa entre eles. O kefir de grãos (T5) foi considerado menos efervescente e menos viscoso comparado ao kefir do T1. Já o kefir produzido pelo tratamento 2 (T2), apresentou menor viscosidade e efervescência e aroma atípico do kefir, lembrando um leiteiro (*buttermilk*).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas e nos Laboratórios de Microbiologia Industrial e Biocatálise, Tecnologia de Alimentos e Análise Sensorial e Estudos de Consumidor do Departamento de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG.

3.1 Matérias-primas para os ensaios tecnológicos

Para os ensaios tecnológicos de obtenção do kefir foram utilizadas cultura iniciadora isolada do grão de kefir, grão de kefir, leite UHT integral e sacarose adquiridos no comércio de Belo Horizonte- MG.

Os grãos de kefir utilizados nestes experimentos foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. José Maurício Schneedorf Ferreira da Silva, Laboratório de Fitofármacos (Unifenas, MG, Brasil).

A cultura iniciadora utilizada nas fermentações neste estudo continha seis micro-organismos: *Lactobacillus casei*², *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*², *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*², *Leuconostoc mesenteroides*¹, *Kazachstania unispora*² e *Torulaspora delbrueckii*², todos isolados e identificados no presente trabalho.

3.2 Métodos

3.2.1 Cultivo dos grãos de kefir

Os grãos de kefir congelados a -20°C foram ativados e cultivados diariamente durante algumas semanas, a fim de se obter a quantidade necessária para os ensaios de fermentação. Os grãos eram coados e lavados com água destilada e, posteriormente, inoculados em leite UHT integral adicionado de sacarose (31g/L) e mantidos a 22°C por 24 h.

¹ Micro-organismo identificado segundo teste bioquímico (API 50 CHL).

² Micro-organismos identificados por métodos da biologia molecular.

3.2.2 Obtenção do kefir com os grãos para isolamento dos micro-organismos

O isolamento foi efetuado em três amostras distintas de kefir que foram produzidas para essa finalidade. As fermentações foram realizadas inoculando-se 5% (m/v) dos grãos de kefir (Figura 6), em 30 mL de leite UHT integral adicionado de sacarose (31g/L) em frascos erlenmeyer de 125 mL os quais foram incubados a 22°C por 24h em BOD (Figura 7). Após, os leites fermentados com os grãos foram homogeneizados em mini processador (Mix R11341 Philips Walita) e distribuídos em tubos estéreis tipo falcon.

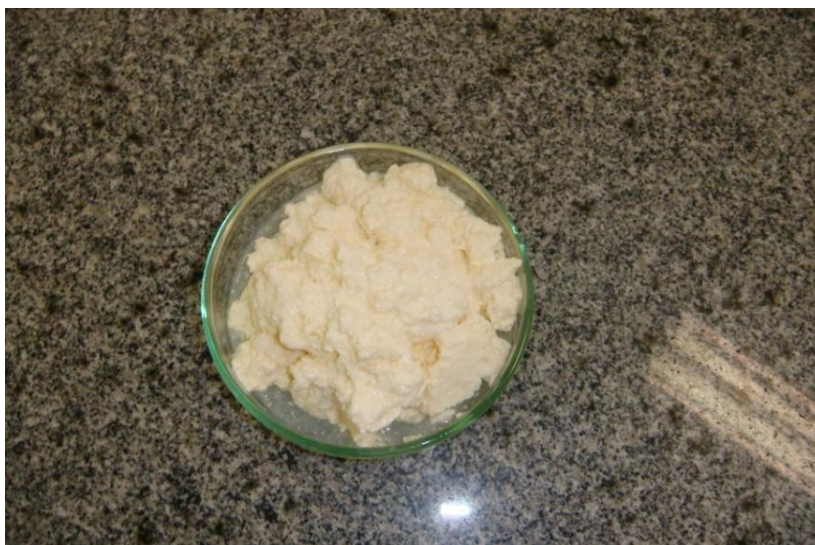


Figura 6: Grãos de kefir



Figura 7: Preparo das amostras de kefir

As amostras de kefir bruto produzidas foram submetidas a diluições decimais seriadas em água peptonada 0,1% esterilizada. Cada amostra foi processada medindo-se 1 mL do produto em recipiente previamente esterilizado, homogeneizado e diluído em 9,0 mL de água peptonada 0,1%. A partir desta diluição foram feitas as demais (10^{-2} a 10^{-7}). Das diluições decimais seriadas foram retiradas alíquotas de 0,1 mL e inoculadas no meio de cultura adequado.

3.2.3 Isolamento, quantificação e identificação

Os isolamentos de BAL e leveduras dos grãos de kefir foram realizados em três lotes do produto preparados para essa finalidade e utilizando três meios parcialmente seletivos.

As bactérias do ácido láctico foram isoladas pelo plaqueamento em superfície das diluições decimais adequadas (10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7}) em ágar De Man, Rogosa e Sharpe (MRS, Difco, Detroit, EUA) e em ágar M-17(Difco) acrescidos de cicloheximida (Sigma, St. Louis, EUA) na concentração de 100 mg/L. As leveduras foram isoladas pelo plaqueamento das diluições (10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6}) em ágar extrato de malte-extrato de levedura (YM, glicose 1%, extrato de levedura 0,3%, extrato de malte 0,3%, peptona bacteriológica 0,5%, ágar 1,5%) acrescido de cloranfenicol (INLAB) na concentração de 200 mg/L. As placas foram incubadas em condições de anaerobiose para bactérias (câmara anaeróbica Forma Scientific Company, Marietta, EUA, contendo uma atmosfera de N₂ 85%, H₂ 10% e CO₂ 5%) e aerobiose para leveduras por 72 h, a 22°C. Após estes períodos, foram feitas as contagens das colônias de distintas morfologias (ex., em relação à cor, forma e tamanho) e cada morfotipo diferente foi selecionado e purificado por estriagem no mínimo três vezes em ágar MRS, M17 e YM para a obtenção de culturas puras. As culturas foram mantidas em tubos criogênicos contendo meio de cultura adequado acrescido de 20% de glicerol e congeladas em temperatura de -80°C

A caracterização fenotípica das bactérias isoladas se baseou na morfologia celular pela coloração de Gram, teste respiratório (incubação em aerobiose, anaerobiose e microaerofilia), produção de gás em presença de glicose, além da pesquisa de catalase. Com base nestes testes, utilizou-se o kit API 50 CHL (Bio Mérieux, Marcy l'Étoile, França) e os resultados foram comparados com identificação molecular pela técnica de *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis* (ARDRA) e seqüenciamento de DNA.

As leveduras isoladas foram agrupadas em perfis de acordo com testes fisiológicos e bioquímicos, segundo procedimento padrão (YARROW, 1998) e os resultados foram confirmados pelo seqüenciamento de DNA.

3.2.4 Identificação molecular das BAL pela técnica de PCR-ARDRA

A identificação molecular PCR-ARDRA, consiste na amplificação por PCR do segmento intergênico compreendido entre o rRNA 16S e 23S e análise por restrição enzimática dos fragmentos amplificados (MOREIRA et al., 2005, CRISPIM, 2008). Esta técnica é mais rápida e precisa em relação às metodologias baseadas em perfis de fermentação. Esta técnica permite discriminar espécies de *Lactobacillus* sem a necessidade das etapas de purificação e clonagem dos produtos de PCR (MOREIRA et al., 2005).

3.2.4.1 Extração do DNA

Os isolados foram crescidos em 10 mL de caldo MRS e M17 por 24 h, a 22°C. Após o crescimento, acrescentou-se a metodologia o tratamento prévio às células. Estas foram centrifugadas a 1710 xg, em centrífuga B4i (Jouan Industries S.A.S., Château Gontier, France), a 4°C por 10 min. O pellet foi suspenso em 1mL de LiCl 5M e a suspensão transferida para tubos de microcentrifuga de 1,5 mL. O material foi colocado em incubadora de bancada shaker (Cientec, CT 712-1) a 25°C, sob agitação constante, a 1.500 rpm, por 2 h. Decorrido este tempo, as amostras foram centrifugadas a 20.800 xg (Eppendorf, 5417R, Hamburg, Germany), por 1 minuto. O sedimento foi suspenso em 1 mL de água mili-Q estéril e o material centrifugado, novamente, a 20.800 xg (Eppendorf 5417R), por 1 minuto. O pellet foi suspenso em 1 mL de solução de lisozima (10 mg/mL em TE10 – Tris-HCl 1,25M; EDTA 0,5M, pH 8). Após incubação a 37°C, por 2 horas, sob agitação (Cientec, CT 712-1), a 1.500 rpm, a suspensão foi centrifugada a 20.800 xg, por 5 min, e o sobrenadante desprezado. Em seguida o DNA cromossômico foi obtido por meio do kit de extração de DNA “Wizard Genomic DNA Purification” (Promega, Madison, EUA), conforme instruções do fabricante.

A integridade e a concentração do DNA extraído foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose 1,4%, após coloração com gel red. As amostras de DNA foram mantidas em freezer - 20°C até o momento de sua utilização.

3.2.4.2 Amplificação utilizando os iniciadores 16S e 23S

Após a extração do DNA bacteriano, este foi diluído para obter aproximadamente 50 ng/μl e usado como molde na Reação em Cadeia de Polimerase (PCR). A amplificação da região intergênica 16S-23S foi realizada usando os iniciadores *forward* 16-1A (5'-GAATCGCTAGTAATCG-3'), correspondentes aos nucleotídeos 1361 ao 1380 do gene que codifica o rRNA 16S de *Lactobacillus casei* e *reverse* 23-1B (5'-GGGTTCCCCCATTCGGA-3'), correspondentes aos nucleotídeos 123 a 113 do gene que codifica o rRNA 23S de *L. casei* (TILSALA-TIMISJARVI & ALATOSSAVA, 1997; MOREIRA et al., 2005; CRISPIM, 2008; SANTOS, 2008). A mistura de reação foi composta por 5 μL de DNA molde (10 ng/μL), 30 μL de PCR *Master Mix* (Promega), 6 μL de cada iniciador na concentração de 10 pmol/L e 13 μL de água quimicamente pura (Promega) em um volume final de 60 μL.

As amplificações foram realizadas em termociclador (PCR Express Thermo Hybaid Middlesex, Inglaterra) com o seguinte programa: 94°C por 2 min, 35 ciclos de 94°C, por 30 segundos, 55°C por 1 min, 72°C por 1 min e 72°C, por 10 min. Os amplicons foram analisados em gel de agarose 1,4% corados com gel red em tampão TAE 1X (40 mM tris acetato, 1mM EDTA) por 40 min a 100 V e observados em transiluminador UV. As amostras cujo produto de PCR apresentaram três bandas correspondentes às três regiões intergênicas 16S-23S (espaçadores grande, médio e pequeno) mostraram perfil sugestivo do gênero *Lactobacillus*.

3.2.4.3 Digestão por enzimas de restrição (PCR-ARDRA)

Os fragmentos amplificados foram submetidos à restrição enzimática com as seguintes endonucleases específicas para *Lactobacillus*: *SphI*, *NcoI*, *NheI*, *EcoRV*, *DraI*, *SfiI*, *SspI*, *VspI*, *HincII*, *EcoRI*, *HindIII* (Promega) e *AvrII* (New England Biolabs, Beverly, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. A escolha das enzimas de restrição foi baseada na análise *in silico* das seqüências depositadas no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) (SANTOS, 2008). Os produtos da restrição enzimática foram analisados pela eletroforese em gel de agarose 1,4%, corados com gel red em tampão TAE 1X (40 mM tris acetato, 1mM EDTA) e visualizados sob luz ultravioleta. As espécies de *Lactobacillus* foram identificadas comparando-se o padrão enzimático obtido com o padrão de restrição enzimático dos espaçadores pequeno, médio e grande de acordo com as seqüências depositadas no GenBank (Apêndice A) (MOREIRA et al., 2005; CRISPIM, 2008).

3.2.5 Sequenciamento de DNA das BAL

As bactérias isoladas do grão de kefir não identificadas pela técnica de PCR-ARDRA foram submetidas ao seqüenciamento do gene rDNA 16S.

A PCR foi realizada sob as mesmas condições descritas no item 3.2.4.2, com exceção dos iniciadores que foram os de seqüências *forward* 27F- 5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3' e *reverse* 149R- 5' GGTTACCTTGTTACGACTT 3' que amplifica a região do rDNA 16S, segundo Ampe e colaboradores (1998).

3.2.5.1 Purificação dos produtos de PCR

Os amplicons gerados pela reação de PCR foram purificados por meio da técnica com Polietilenoglicol (PEG). Ao produto de PCR, foi adicionado v/v de Polietilenoglicol 20% em NaCl 2,5 M e os tubos foram incubados em banho-maria à 37°C por 15 min. Os tubos foram então centrifugados a 20.800 xg (Eppendorf, Hamburg, Germany) por 15 min e o sobrenadante retirado e descartado com auxílio de pipeta. A seguir, foram adicionados 125 µL de etanol 70-80% gelado (4-8°C) aos tubos, e os mesmos foram centrifugados a 20.800 xg, por 3 min. O etanol foi retirado com auxílio da pipeta. Este último passo de lavagem dos amplicons com etanol foi repetido mais uma vez. Uma nova centrifugação a 20.800 xg por três segundos foi realizada (spin down) e os tubos deixados *overnight* à temperatura ambiente para total evaporação do etanol. Decorrida essa etapa, 10 µL de água MiliQ estéril foram adicionados aos tubos e o conteúdo dos mesmos foram homogeneizados em vortex por 15 segundos. Em seguida, os tubos foram incubados em banho-maria a 37°C por 10 min. O produto obtido foi dosado em NanoDrop ND 1000 (NanoDrop Technologies).

3.2.5.1 Sequenciamento e análise das seqüências

O seqüenciamento das BAL foi realizado no Núcleo de Análise e Expressão Gênica (NAGE, ICB/UFMG, Belo Horizonte, MG), utilizando o DYEnamic *ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* em seqüenciador automático *MegaBACE™ 1000 Analysis Systems* (Amersham Biosciences). Cada produto amplificado foi seqüenciado em duplicata, nos sentidos senso e reverso.

As seqüências obtidas foram alinhadas e comparadas com seqüências depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>), do programa BLAST (<http://0-www.ncbi.nlm.nih.gov.library.vu.edu.au/BLAST>), algoritmo BLASTN. A seqüência de similaridade maior ou igual a 98% com outra seqüência de nucleotídeos foi considerada identificada.

3.2.6 Identificação molecular das leveduras

Um isolado de cada perfil fisiológico foi selecionado para a identificação molecular pela metodologia de seqüenciamento da região D1/D2 da subunidade maior do rDNA, segundo Lachance e colaboradores (1999).

3.2.6.1 Extração do DNA

Para a extração do DNA total, os isolados foram crescidos em ágar extrato de malte e extrato de levedura (glicose 1%, extrato de levedura 0,3%, extrato de malte 0,3%, peptona bacteriológica 0,5%, Agar 1,5%) por 24 h a 22°C. Após o crescimento, as colônias foram suspensas em 100 µL de tampão de lise e incubadas em banho-maria a 65°C por 30 min. Decorrida essa etapa do processo, adicionou-se 100 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) aos tubos e os mesmos foram vedados com parafilme, homogeneizados em vortex durante 4 min e centrifugados a 20.800 xg durante 15 min. O sobrenadante foi retirado com auxílio de pipeta e transferido para outro tubo, ao qual foram adicionados 100 µL de etanol 70% gelado (4-8°C). Os tubos foram novamente centrifugados a 20.800 xg por 5 min. O etanol foi retirado com auxílio de pipeta e descartado e os tubos incubados *overnight* a temperatura ambiente para total evaporação do etanol. Após essa etapa, o DNA foi re-suspendido em 100 µL de tampão Tris EDTA 0,1 M (TE) pH 8 e estocado a - 20°C.

3.2.6.2 Amplificação utilizando os iniciadores NL1 e NL4

A amplificação da região D1/D2 da subunidade maior do rDNA foi realizada com os iniciadores NL-1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') e NL-4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') segundo Lachance e colaboradores (1999). A reação de PCR foi realizada em um volume final de 50 µL contendo 5 µL de tampão de PCR Fermentans 10X, 2 µL de MgSO₄ 1,5M, 2 µL de dNTP 0,05 mM, 1 µL dos iniciadores NL1 e NL4 a 10 pmol/µL (MWG Biotech), 2 a 5 µL de DNA, 0,2 µL de Taq DNA Polimerase 1,25 U/µL (Taq DNA Polymerase Fermentans) e água Dpec q.s.p. 50 µL. As reações de PCR foram realizadas utilizando-se o termociclador PCR Express (PCR Express Thermo Hybaid Middlesex, Inglaterra). O programa de ciclagem consistiu de uma desnaturação inicial a 95°C por 5 min, seguido por 35 ciclos de 15 segundos de desnaturação a 94°C, 25 segundos de anelamento do iniciador a 54°C e 20 segundos de extensão a 68°C, e uma extensão final por 10 min a 68°C. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 0,5X (54 g de tris base, 27,5 g de ácido bórico, 20 mL de EDTA 0,5M, pH 8,0) durante

aproximadamente 30 min a 120 V. Os géis foram corados com solução de brometo de etídio, visualizados sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de fotodocumentação de gel (Vilber Lourmat, France).

3.2.6.3 Purificação dos produtos de PCR e reação de seqüenciamento

Os amplicons gerados pela reação de PCR com os iniciadores NL1 e NL4 foram purificados por meio da técnica com polietilenoglicol (PEG) descrita no item 3.2.5.1.

As reações de seqüenciamento foram realizadas utilizando-se o DYEnamic™ (Amersham Biosciences, USA) em combinação com o sistema de seqüenciamento automatizado MegaBACE™ 1000. O seqüenciamento foi realizado no Laboratório de Biodiversidade e Evolução Molecular (LBEM, ICB/UFMG, Belo Horizonte, MG).

3.2.6.4 Análise das seqüências

As seqüências de DNA obtidas foram analisadas utilizando o programa BLASTN como descrito no item 3.2.5.1. Isolados apresentando similaridade na seqüência analisada de 99% ou mais em relação a outro já depositado no GenBank foram considerados como pertencentes àquela espécie conhecida. Micro-organismos que apresentaram seqüências com similaridade menor ou igual a 98% na região do DNA analisada foram designados com o termo “similar”, e podem representar uma nova espécie. O poder discriminatório das seqüências da região D1/D2 da subunidade maior do gene do rRNA é considerado suficiente para descrever novas espécies de leveduras, pois isolados da mesma espécie apresentam no máximo de duas a três bases diferentes não-contíguas em uma região de cerca de 600 nucleotídeos (KURTZMAN & ROBNETT, 1998).

3.2.7 Elaboração da cultura iniciadora

Após a identificação dos isolados do grão de kefir, selecionou-se a cultura iniciadora para ser aplicada na fabricação do kefir com base em alguns critérios:

- A cultura deve possuir pelo menos uma bactéria de cada gênero identificada no grão de kefir;
- A cultura deve ter micro-organismos homo e heterofermentadores;
- Os micro-organismos devem ser predominantes no grão;
- A cultura deve possuir no mínimo uma levedura;
- A cultura deve possuir uma diversidade de micro-organismos que represente as características do kefir tradicional;

- Os isolados devem ter alta similaridade de identificação.

A formulação da cultura iniciadora por diferentes micro-organismos isolados do grão de kefir provavelmente pode ser facilitada devido a relação simbiótica bem estabelecida entre esses micro-organismos no grão (WITTHUHN et al., 2005).

3.2.8 Determinação da fase logarítmica (fase log)

A fim de padronizar o número de células presentes na cultura iniciadora, fez-se o cultivo de cada linhagem selecionada para se obter a curva de crescimento e determinar o tempo final da fase log..

Os micro-organismos isolados foram ativados em meios adequados a 22 °C por 48 h. O pré-inóculo foi obtido inoculando-se 1% (v/v) de cada linhagem em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 40,0 mL do meio adequado. Após 24 h de crescimento a 22°C, fez-se a leitura da densidade óptica (DO) da suspensão celular. Calculou-se o volume (mL) necessário do pré-inóculo para obter uma DO_{600nm} inicial próxima de 0,05 em 300 mL de meio de cultura. Uma alíquota foi retirada após a inoculação, tempo zero do ensaio, e determinou-se a absorbância a 600 nm em espectrofotômetro UV-160A da FEMTO e a contagem de células viáveis por plaqueamento. As placas foram incubadas em aerobiose por 72h a 22°C. O cultivo foi mantido a 22°C e o crescimento celular foi monitorado periodicamente em intervalos de 2 horas fazendo-se a leitura da absorbância e a contagem de células (UFC/mL) até alcançar um valor máximo estável, representando a fase de crescimento estacionária (SOUZA, 2008).

3.3 Elaboração do kefir

3.3.1 Padronização do inóculo da cultura iniciadora

As linhagens isoladas foram ativadas em meio líquido apropriado a 22°C por 48h seguido de um novo repique por mais 24h. Após ativação das culturas, padronizou-se o número de células do inóculo. Cada cultura foi obtida de crescimento de 24h ou 12 h, de acordo com o tempo final da fase log. Após o crescimento, as mesmas foram centrifugadas a 1710 xg por 15 min, lavadas e resuspendidas duas vezes em água peptonada 0,1%.

3.3.2 Métodos de obtenção do kefir

Foram usados três métodos de fermentação para a obtenção das amostras de kefir, em um dos métodos utilizou-se o grão de kefir, e nos dois outros a cultura de bactérias e leveduras isoladas do grão de kefir (cultura iniciadora), por fermentação sucessiva e simultânea. Foram realizadas três repetições de cada tratamento.

3.3.2.1 Produção do kefir pelo método tradicional

O leite UHT integral foi resfriado até 22°C em estufa BOD, adicionado de xarope de sacarose (20,7 mL de xarope/L de kefir) e inoculado com 5% (m/v) de grãos de kefir. A fermentação foi conduzida a 22°C por 12 h até pH 4,7. O leite fermentado formado foi resfriado lentamente a 10°C por 12 h até pH 4,5. Os grãos de kefir foram separados do leite fermentado por peneiramento, lavados com água destilada e mantidos em leite sob refrigeração (4-8°C). O kefir foi distribuído em frascos de vidro de 300 mL, adoçado levemente (5% m/v), homogeneizado e armazenado sob refrigeração a 4°C em BOD (Figura 8).

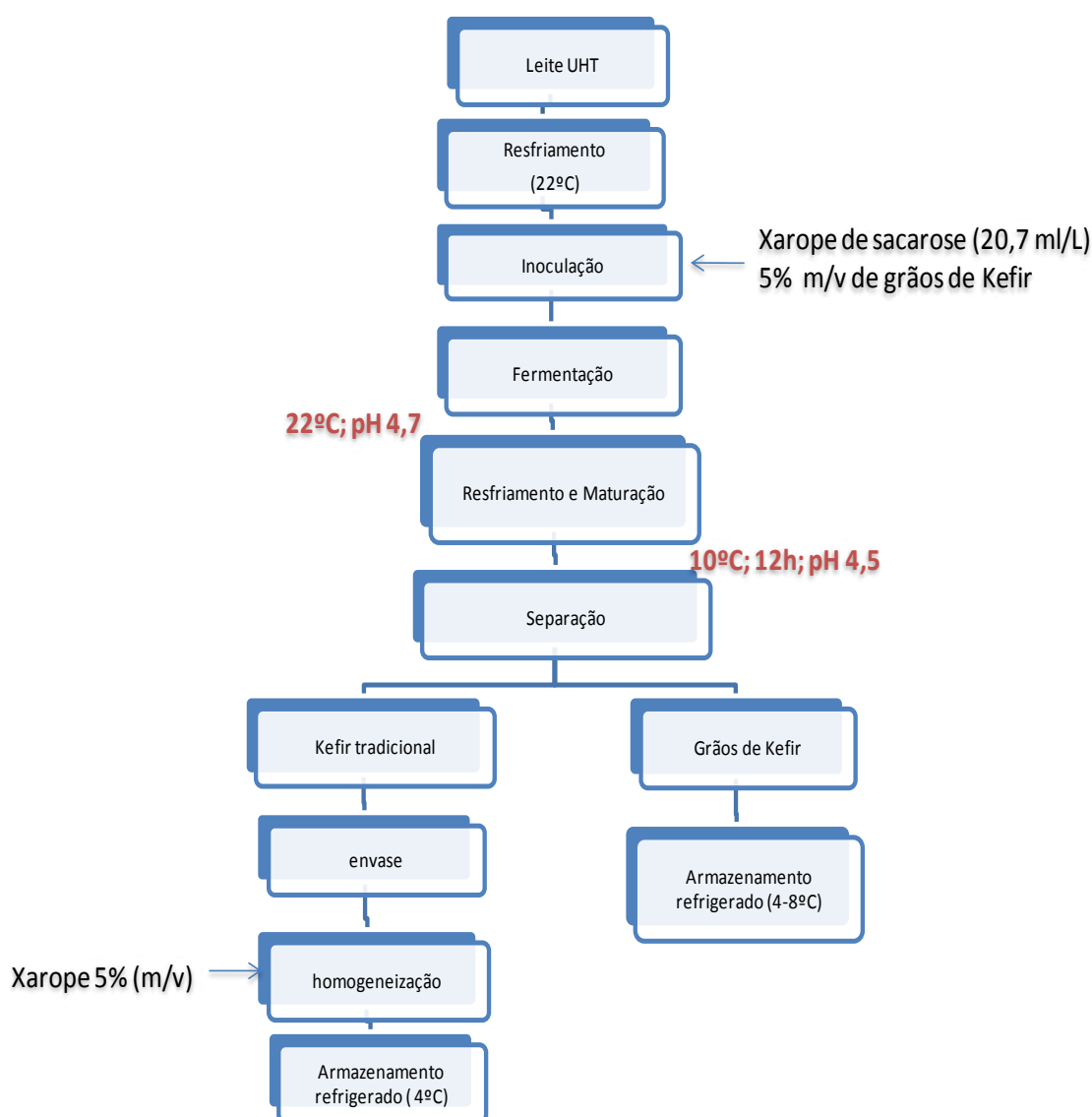


Figura 8: Fluxograma do método tradicional de produção do kefir usando grãos de kefir (adaptado de BESHKOVA et al., 2002).

3.3.2.2 Método com culturas puras por fermentação sucessiva

Para a elaboração do kefir, realizou-se uma fermentação láctica acarretada pelas BAL (*Lactobacillus casei*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* e *Leuconostoc mesenteroides*) seguida de uma fermentação alcoólica pelas leveduras (*Torulaspora delbrueckii* e *Kazachstania unispora*). A metodologia para o preparo seguiu as etapas descritas no fluxograma apresentado na Figura 9, baseado no método de BESHKOVA et al. (2002), sendo utilizados iniciadores predominantes no grão.

O leite UHT integral foi aquecido até a temperatura de 28°C em banho-maria (modelo 314, Nova Ética) e inoculado com as linhagens das BAL na concentração de

4% v/v. A fermentação foi conduzida em estufa incubadora BOD até que o meio atingisse pH 4,7 (aproximadamente 5,5 h). O leite fermentado foi então resfriado até 20°C em BOD por 30min-1h e adicionado de xarope de sacarose (20,7 mL de xarope/L de kefir). O teor de sacarose adicionado foi calculado de acordo com a reação estequiométrica de fermentação alcoólica para obter uma concentração máxima de 1,5% (m/v), como descrito no Apêndice B. Após a fermentação láctica, adicionou-se o inóculo contendo as leveduras na concentração 2% v/v, homogeneizou-se, distribuiu-se em frascos de vidro de 300 mL e incubou-se a 20°C por 12 h até pH 4,5. Em seguida, a bebida foi levemente adoçada com xarope de sacarose 5% (m/v), homogeneizada e armazenada sob refrigeração a 4°C.

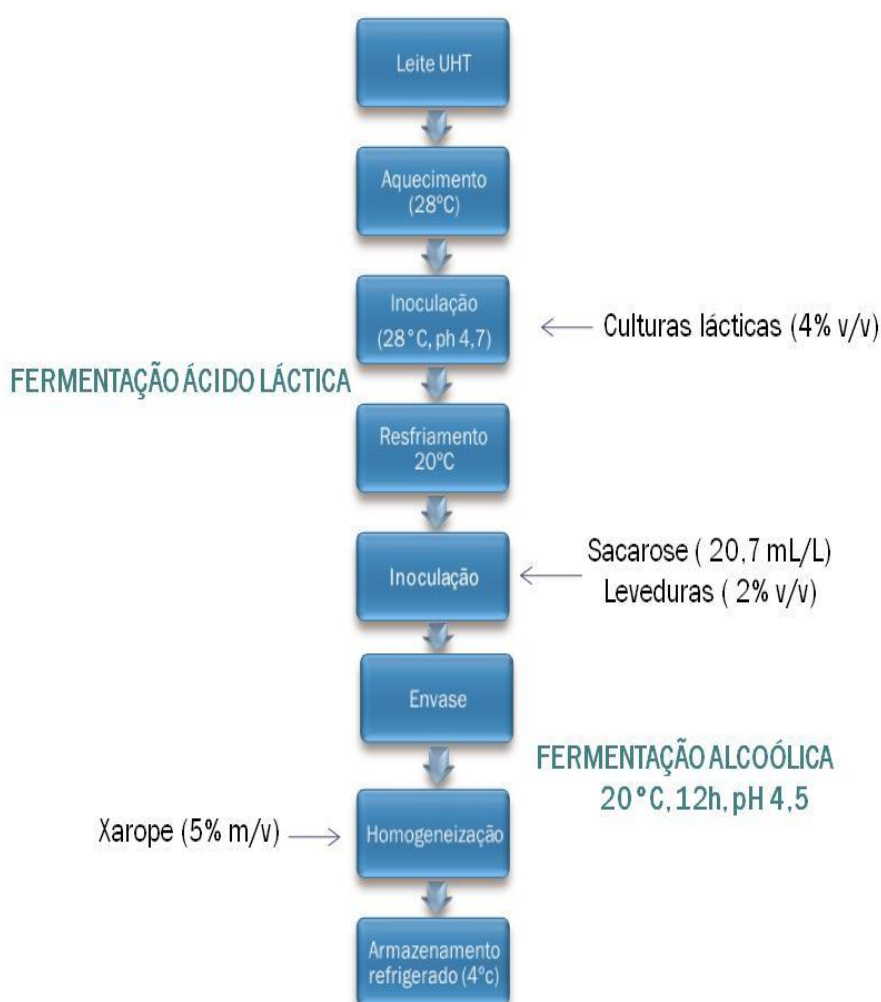


Figura 9: Fluxograma de produção do kefir utilizando cultura iniciadora por fermentação láctica e alcoólica sucessiva (adaptado de BESHKOVA et al., 2002).

3.3.2.3 Método com culturas puras por fermentação simultânea

O leite inoculado com a cultura *starter* composta por bactérias e leveduras foi submetido às fermentações láctica e alcoólica simultaneamente. O processamento da bebida seguiu as etapas descritas no fluxograma apresentado na Figura 10.

O leite foi resfriado até 22°C em estufa incubadora BOD, adicionado de xarope de sacarose (20,7 mL de xarope/L de kefir) e inoculado com a cultura iniciadora de BAL e leveduras nas concentrações de 4% v/v e 2% v/v, respectivamente. Em seguida, foi distribuído em frascos de vidro de 300 mL contendo 200 mL e incubado a 22°C até atingir pH 4,7 (aproximadamente 9h). O leite fermentado foi resfriado lentamente a 10°C por 10h até pH 4,5. Posteriormente, o kefir foi levemente adoçado (5% m/v), homogeneizado e armazenado sob refrigeração a 4°C em BOD.

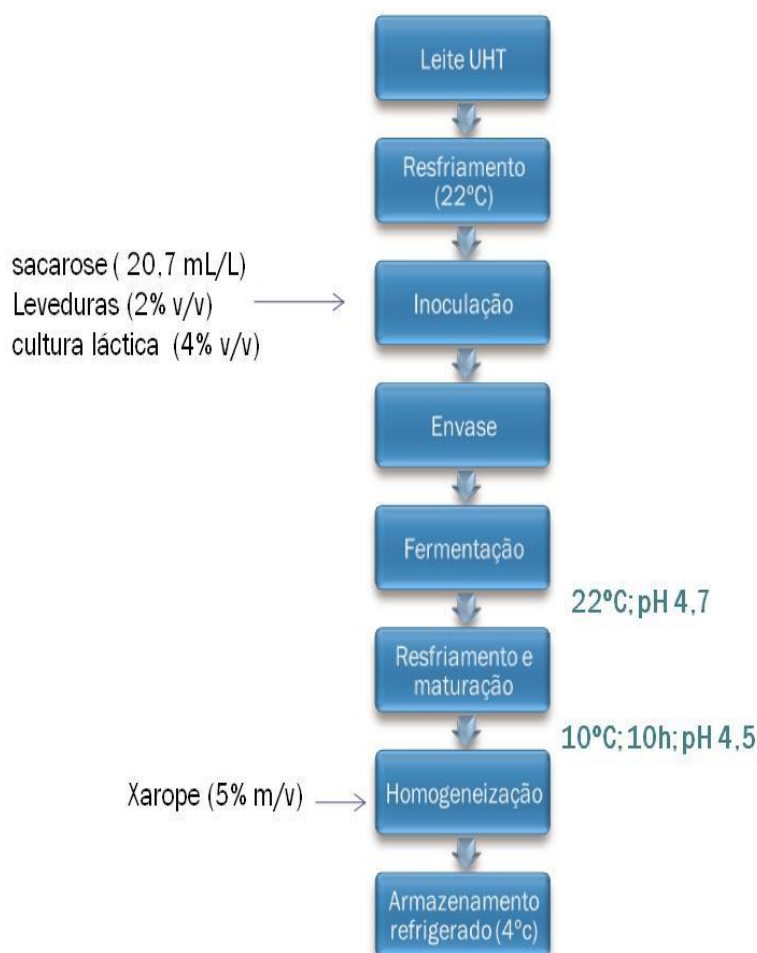


Figura 10: Fluxograma de produção do kefir utilizando cultura iniciadora por fermentação simultânea (adaptado de BESHKOVA et al., 2002).

Devido à produção de CO₂ pelas leveduras, um espaço-livre (“headspace”) de 100 mL foi deixado nos frascos entre o produto e a tampa para garantir que um possível aumento de pressão no interior destas não fosse capaz de provocar a expulsão das tampas nem a quebra dos frascos.

3.4 Análises físico-químicas

Cada um dos três tratamentos (métodos de produção do kefir) foi feito com três repetições e todas as análises foram realizadas em triplicatas após três dias de acondicionamento a 4°C em BOD.

3.4.1 pH

O pH das amostras foi medido diretamente pela introdução do eletrodo do potenciômetro METROHM modelo pH METER 780 em alíquotas de 10 mL do produto, à temperatura ambiente (IAL, 2005).

3.4.2 Acidez em ácido láctico

A acidez foi determinada por titulação potenciométrica. Dez gramas do kefir foram transferidos para um béquer contendo 10 mL de água isenta de gás carbônico, adicionado de cinco gotas de fenolftaleína e titulado, sob agitação, com solução de hidróxido de sódio 0,1 M até pH 8,3 (IAL, 2005).

3.4.3 Viscosidade

As análises de viscosidade foram feitas no viscosímetro de rotina Cannon-Fenske da marca “Schott” (GmbH, Germany) usando capilar 300, tipo 520 23 de 1,26 mm de diâmetro, por determinação do tempo de escoamento do fluido a 25°C.

A viscosidade das amostras de kefir foi calculada pela relação:

$$\eta_1 = \eta_2 \frac{t_1 \rho_1}{t_2 \rho_2}$$

Sendo η_2 , t_2 e ρ_2 correspondentes à viscosidade, tempo e densidade do líquido de referência, respectivamente;

η_1 , t_1 e ρ_1 correspondentes à viscosidade, tempo e densidade das amostras de kefir.

3.4.4 Etanol

O teor de etanol foi determinado pelo método utilizado para dosagem de etanol em cerveja (IAL, 2005). A densidade relativa da amostra destilada foi determinada utilizando densímetro digital automático e a graduação alcoólica foi obtida por meio da tabela de conversão de densidade relativa a 20°C/20°C em porcentagem de álcool em volume. Posteriormente, os dados foram corrigidos para porcentagem volume por massa (%v/m).

3.4.5 Sinérese

O teor de sinérese foi determinado segundo MUGOCHA et al. (2000). As amostras de kefir foram resfriadas a 4°C por 24 h e então centrifugadas a 1710 xg por 20 min. O volume de soro (cm³) foi expresso em % (m/m) de leite fermentado.

3.4.6 Densidade

A densidade das amostras foi determinada pesando-se volumes das amostras de kefir contidos em picnômetros de 25 mL, por meio da equação:

$$\rho = \frac{m_{am} - m_p}{m_{H2O} - m_p}$$

sendo:

m_{am} : massa da amostra a 25°C

m_p : massa do picnômetro a 25°C

m_{H2O} : massa da água a 25°C

3.5 Análises microbiológicas

3.5.1 Contagem de bactérias ácido lácticas

A contagem de bactérias lácticas foi realizada pelo método de plaqueamento em superfície a partir das diluições decimais seriadas. Na superfície de cada placa contendo Agar De Man, Rogosa e Sharpe (MRS, Acumedia, Michigan, EUA) acrescido de cicloheximida (Sigma, St. Louis, EUA) na concentração de 100 mg/L foi inoculado 0,1 mL das diluições decimais (10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7}). As placas foram incubadas invertidas em estufa BOD a 22°C por 72 h em condições de aerobiose (adaptado de SILVA et al., 1997).

3.5.2 Contagem de leveduras

A contagem de leveduras foi realizada pelo método de plaqueamento em superfície a partir de diluições decimais seriadas. Na superfície de cada placa contendo 15 a 20 mL do meio ágar extrato de malte-extrato de levedura (YM, Difco) suplementado com cloranfenicol (INLAB) na concentração de 200 mg/L foi inoculado 0,1 mL das diluições decimais (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}). As placas foram incubadas em aerobiose por 72-96h em estufa BOD a 22°C (adaptado de SILVA et al., 1997).

3.6 Análise sensorial

A realização das análises sensoriais do presente trabalho foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da UFMG, parecer número ETIC 298/10.

Os testes sensoriais foram realizados no Laboratório de Análise Sensorial e Estudos de Consumidor (LASEC), localizado no Departamento de Alimentos da Faculdade de Farmácia no Campus Pampulha da UFMG.

A avaliação sensorial das três formulações de kefir foi realizada por meio da aplicação dos testes de aceitação e intenção de compra em uma única sessão. As três amostras de kefir preparadas pelos três diferentes métodos de processamento (descritos na metodologia) foram analisadas pelos consumidores de acordo com a metodologia sensorial tradicional (teste cego – ausência de informações a respeito das amostras).

Foi utilizada uma equipe de provadores não treinados, composta por 63 consumidores (alunos, funcionários e professores da Escola de Farmácia da UFMG) recrutados de acordo com a disponibilidade, interesse e frequência de consumo de leites fermentados. Todos os consumidores convidados a participar do experimento preencheram o TCLE, apresentado no Apêndice C. Dados demográficos dos participantes e de sua frequência de consumo de leites fermentados foram coletados por meio de questionário (Apêndice D). As amostras, mantidas sob refrigeração (4-8°C) foram apresentadas em copos plásticos descartáveis transparentes de 50 mL, codificadas com números aleatórios de três dígitos, em porções de 30 mL e servidas gelada, para reproduzir a maneira usual de consumo de leites fermentados. O teste sensorial foi realizado em cabines individuais de prova do LASEC sob iluminação branca. Foi adotada a técnica de apresentação monádica das amostras, sendo que a ordem de apresentação das mesmas seguiu o delineamento de blocos completos

casualizados, eliminando-se, assim, o efeito da ordem de apresentação e o efeito residual, ou seja, a influência de uma amostra na avaliação da próxima (MacFIE et al., 1989). Nos intervalos das avaliações foram oferecidos aos provadores água mineral a temperatura ambiente e torrada para a limpeza do palato.

Na avaliação da aceitação foi empregada a escala hedônica de 7 pontos na qual 1 correspondia a “desgostei extremamente”, 7 a “gostei extremamente” e o ponto central neutro 4 a “não gostei nem desgostei” (Apêndice E). Cada provador indicou o quanto gostou ou desgostou de cada amostra em relação aos atributos aroma, efervescência, acidez e consistência e à impressão global (aparência, aroma, sabor e textura). Estes atributos foram definidos baseados em estudos preliminares (pesquisa exploratória qualitativa: grupo focal de leites fermentados comerciais).

A atitude dos provadores com relação à compra do produto também foi avaliada, por meio de uma escala de cinco pontos, na qual 1 correspondia a “certamente não compraria”, 5 a “certamente compraria” e o ponto neutro central 3 a “talvez comprasse, talvez não comprasse” (Apêndice E).

As notas de aceitação e de intenção de compra atribuída às três amostras de kefir pelos 63 consumidores foram submetidas à Análise de Variância Univariada (ANOVA), ao teste de Comparação de Médias de Tukey e à Análise de Distribuição dos Histogramas de Frequência para verificar se havia diferença significativa entre as médias de aceitação e de intenção de compra das amostras para um determinado nível de confiança, usualmente de 95% (MEILGAARD et al., 1991; STONE & SIDEL, 2004).

Quando os dados de aceitação e/ou de intenção de compra são analisados por técnicas estatísticas univariadas médias são obtidas, assumindo-se que o comportamento dos consumidores seja homogêneo, o que não é verdade para a maioria dos casos, gerando resultados que podem não ser representativos da realidade. Por essa razão, a variabilidade individual dos consumidores também deve ser considerada por meio da aplicação de técnicas estatísticas multivariadas, como o Mapa Interno da Preferência (MIP), por exemplo (GREENHOFF & MacFIE, 1994).

O MIP consiste numa representação gráfica das notas individuais de aceitação atribuídas as amostras pelos consumidores, obtida a partir da Análise de Componentes Principais (ACP) e da Análise de Conglomerados ou *Clusters Analysis*, que permite a identificação de cada indivíduo e suas preferências em relação às amostras avaliadas. A aceitação ou rejeição de um determinado produto pelo consumidor é representada no MIP, podendo-se relacionar essa aceitação/rejeição com características sensoriais e/ou

físico-químicas do produto se for construído o Mapa Externo de Preferência (PREFMAP) (BEHRENS et al., 1999; MINIM, 2006; DIAS, 2009).

A ferramenta estatística do Mapa Interno da Preferência pode ser muito útil no desenvolvimento de novos produtos, pois permite avaliar a aceitação dos produtos e estabelecer quais deles se encaixam nos segmentos-alvo no mercado consumidor (HELGESEN et al., 1997; DIAS, 2009).

3.6.1 Perfil do consumidor

Na Figura 11 é apresentado o perfil dos consumidores que participaram da avaliação sensorial das três formulações de kefir. Os testes sensoriais foram realizados com 63 consumidores, sendo 85,7% do gênero feminino e 14,3% do gênero masculino, com idade entre 18 e 65 anos, predominando a faixa etária de 18 a 25 anos de idade (58,7%), seguida pela faixa de 26 a 35 anos (24%). Praticamente todos os provadores (96,8%) apresentavam o terceiro grau (completo ou em andamento); sendo que 39,7% eram mestres ou doutores e apenas 3,2% tinham o ensino médio completo. A maior parte dos provadores (30,2%) declarou possuir renda familiar variando de 5 a 10 salários mínimos.

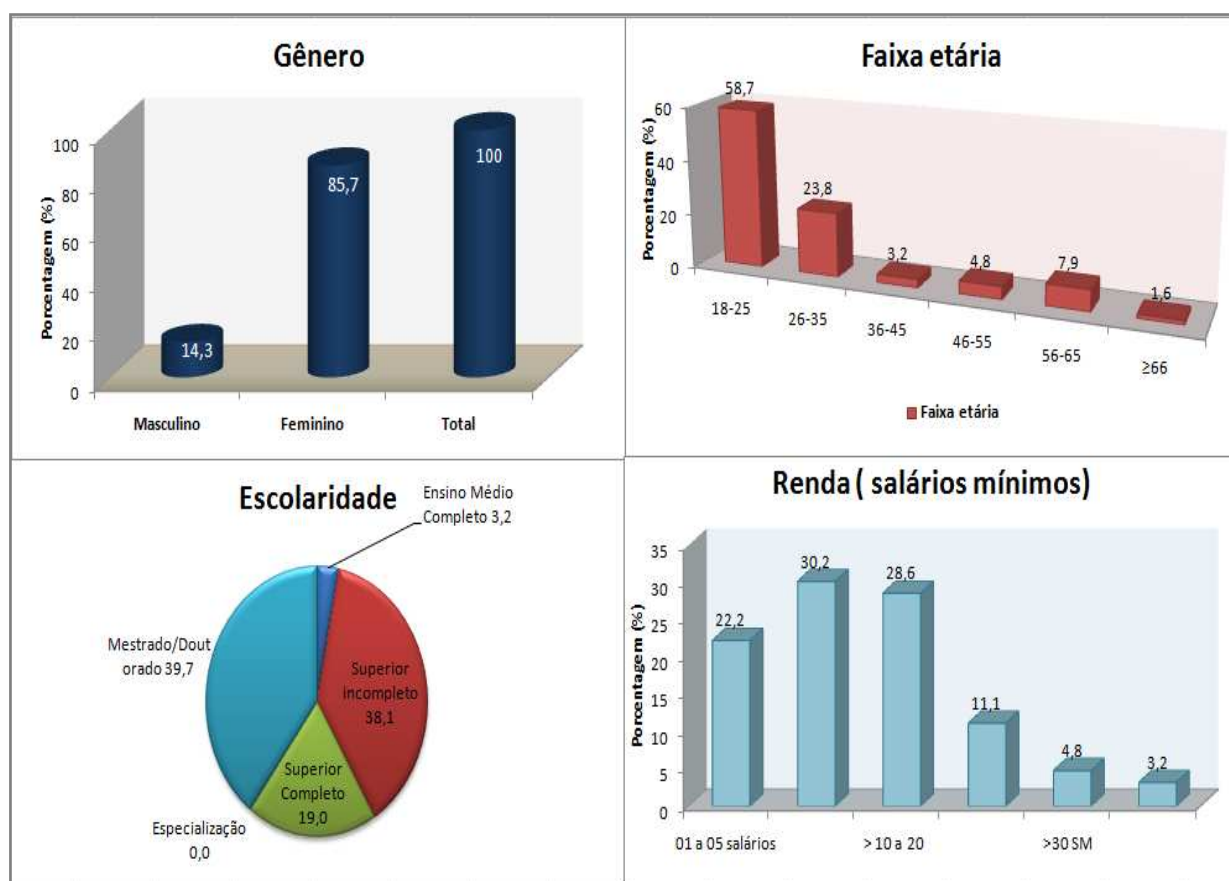


Figura 11: Perfil sócio- demográfico dos consumidores

Dentre os provadores participantes do estudo, 73% apresentavam frequência de consumo diária de leites fermentados e apenas 27% consumiam este tipo de produto eventualmente. Adicionalmente, a maioria dos consumidores (90,5%) declarou conhecer o significado do termo “probiótico”, sendo que 67% eram consumidores habituais de leites fermentados probióticos, o que sugere que a maior parte dos provadores recrutados para o experimento parece ter cuidados com a saúde (Figura 12).

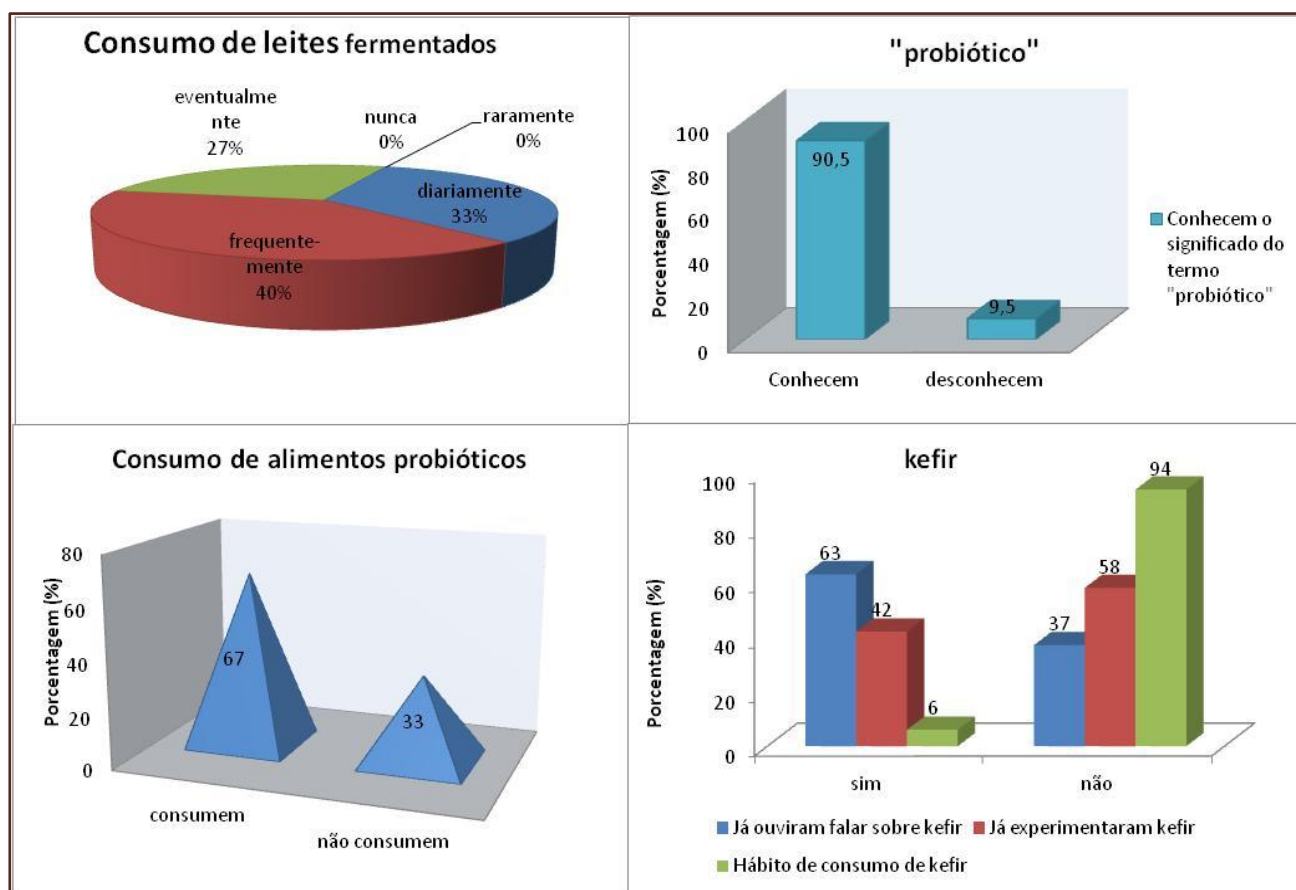


Figura 12: Informações sobre leites fermentados e kefir pelos consumidores.

Curiosamente, 63% dos provadores já tinham ouvido falar sobre o kefir, sendo que deste percentual 42% já haviam experimentado o produto, mas apenas 6% possuíam o hábito de consumo do kefir (Figura 12). A não disponibilidade do produto no mercado e os cuidados diários exigidos no cultivo dos grãos foram apontados como motivos pelo baixo consumo de kefir, apesar do reconhecimento de suas propriedades nutritivas e funcionais.

3.7 Análises da composição centesimal

As amostras de kefir desenvolvidas também foram caracterizadas por meio da determinação da composição centesimal. As análises foram realizadas em triplicatas.

3.7.1 Umidade

A umidade foi obtida pelo método de secagem direta em estufa a 105°C, que consiste na perda de umidade por dessecação e pesagem do extrato seco total de uma determinada quantidade de amostra, até que a diferença entre duas pesagens consecutivas seja menor ou igual a 0,1 mg (SILVA et al., 1997).

3.7.2 Resíduo mineral fixo (cinzas)

O teor de cinzas foi determinado por secagem da amostra em banho-maria seguida pela incineração em mufla (540±10°C) até coloração branca ou ligeiramente acinzentada e estabilização do peso (IAL, 2005).

3.7.3 Proteínas

A determinação de proteína foi realizada pelo método de Micro-Kjeldahl conforme Instrução Normativa (IN) 68, Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos para Leite e Produtos Lácteos (BRASIL, 2006), pesando-se 1,5 g da amostra para a digestão e utilizando o fator 6,38 para conversão de nitrogênio em proteína.

3.7.4 Gordura

O teor de gordura das amostras de kefir foi determinado pelo método de Gerber, diluindo-se 10 g da amostra em 100 mL de água. Os resultados foram obtidos pela equação (SILVA et al., 1997) :

$$\% G = V \times 10$$

Sendo:

%G: teor de gordura da amostra, em % (m/v);

V: valor lido na escala do butirômetro.

3.7.5 Lactose

A determinação de glicídios redutores em lactose foi realizada segundo metodologia do IAL (2005), pesando aproximadamente 5 g da amostra e utilizando o fator 1,39 para conversão da glicose em lactose.

3.7.6 Carboidratos totais

Os valores de carboidratos totais foram obtidos por diferença.

O valor calórico foi calculado baseado nos fatores de Atwater, proteína igual a 4,0 (Kcal/g); carboidratos 4,0 (Kcal/g) e lipídeos 9,0 (Kcal/g) (DE ANGELIS, 1977).

3.8 Análises estatísticas

Os resultados das análises físico-químicas, microbiológicas e da composição centesimal foram submetidos à ANOVA, pelo teste F a 5% de significância. As interações nas quais os efeitos principais não foram significativos foram interpretadas diretamente, já os valores médios obtidos que apresentaram diferenças significativas entre si foram analisados por meio do Teste de Comparação de Médias de Tukey também a 5% de significância ($p \leq 0,05$).

Os dados referentes à avaliação sensorial das três amostras foram primeiramente submetidos à ANOVA, seguida do Teste de Comparação de Médias de Tukey a 5% de significância ($p \leq 0,05$) e da Análise de Distribuição de Frequência, adotando-se como fontes de variação amostras e provadores.

Para obtenção do MIP, também denominado de Análise de Preferência Multidimensional (MDPREF), os dados do teste de aceitação referentes à impressão global (aparência, aroma, sabor e textura) foram organizados numa matriz de amostras (em linhas) e de consumidores (em colunas), sendo esta submetida à ACP (MINIM, 2006).

Os resultados foram expressos num gráfico de dispersão das amostras (tratamentos) em relação aos dois primeiros componentes principais e em outro gráfico que representa os *loadings* (cargas) da ACP, ou seja, as correlações dos dados de cada consumidor com os dois primeiros componentes principais (MINIM, 2006).

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa Statistica 7.0 (STATSOFT, 2005) e o programa XLSTAT-MX (2010).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Quantificação e identificação das BAL e leveduras

Totalizaram-se 22 isolados bacterianos (10 provenientes do MRS e 12 do M17) e cinco leveduras. A identificação presuntiva das bactérias deu-se por testes morfológicos e fisiológicos. Das colônias isoladas, nove caracterizaram-se nos testes de seleção presuntiva como bastonetes Gram positivo (sete no MRS e dois no M17) e catalase negativo e 13 colônias foram caracterizadas como cocos Gram positivo e catalase negativo (três no MRS e 10 no M17). Todas as bactérias isoladas cresceram em três atmosferas de cultivo, ou seja, em ambiente aeróbio, microaerófilo e anaeróbio a 22°C. Entretanto, o melhor crescimento bacteriano pôde ser observado em microaerofilia, confirmando as características das BAL como micro-organismos anaeróbios aerotolerantes segundo MADIGAN (1997) e JAY (2005). A Tabela 8 mostra a frequência e níveis populacionais médios dos micro-organismos isolados do grão do kefir. Os morfotipos bacterianos isolados dos três lotes de grãos de kefir e suas características microbianas são apresentados no Apêndice I.

Dentre as 22 culturas isoladas, sete bactérias revelaram-se como produtoras de gás em presença de glicose conforme teste presuntivo utilizado para diferenciar micro-organismos homo e heterofermentadores. A Figura 13 ilustra a presença e ausência de gás nos tubos de MRS contendo glicose.

As leveduras também foram identificadas presuntivamente por testes bioquímicos e fisiológicos que compreenderam assimilação de fontes C e N, crescimento em meio mínimo de fermentação (MMF), crescimento a 37°C e 40°C, crescimento em meio de alta pressão osmótica, produção e resistência a ácidos e resistência a antimicrobianos (YARROW, 1998). Todas as leveduras cresceram a 37°C em 24h, mas nenhuma cresceu a 40°C em 48h. As cinco leveduras cresceram em MMF em 24h, como pode ser verificado no Apêndice J.

Os níveis populacionais totais de bactérias nos dois meios foram similares (8,88 e 8,69 log UFC/ml no MRS e M17, respectivamente) e superiores ao nível total de leveduras (6,98 log UFC/ml) conforme mostra Tabela 8.

Tabela 8: Frequência e níveis populacionais médios de bactérias e leveduras isoladas dos grãos de kefir.

Meio	Número de isolados totais	Número de cocos	Número de bastonetes	Log ₁₀ UFC/ml médio	Número produtores de gás
MRS	10	3	7	8,88	3
M17	12	10	2	8,69	4
YM	5	-	-	6,98	-



Figura 13: Teste presuntivo para diferenciar micro-organismos produtores de gás.

As quantificações obtidas dos isolados de BAL e leveduras estão acima ou iguais a outros trabalhos da literatura que enumeraram BAL e leveduras presentes em grãos de kefir (MARSHALL & COLE, 1985; GARROTE et al., 1997; MOTAGHI et al., 1997; GARROTE et al., 2001; SIMOVA et al., 2002; WITTHUHN et al., 2005).

Não foi possível a quantificação de leveduras no segundo lote devido à ausência de crescimento nas placas. Isto, possivelmente, ocorreu devido ao tempo de cultivo dos grãos. Este lote foi produzido após seis dias de cultivo. Já os outros lotes tinham no mínimo 30 dias de cultivo. Um estudo realizado por WITTHUHN et al. (2005) também relatou ausência de crescimento de leveduras no kefir produzido após três dias de ativação e o kefir produzido após 20 dias de cultivo, apresentou $4,3 \times 10^4$ UFC/g.

A média da frequência de distribuição dos isolados obtida nos lotes analisados foi: 48% de cocos, 33% de bacilos e 19% de leveduras (Figura 14). SIMOVA et al., (2002) também obtiveram 83-90% da microbiota do grão de kefir representada por BAL e espécies de *Lactococcus* (*L. lactis*) prevaleceram no grão e em duas amostras de kefir, kefir produzido com grão e kefir produzido com inóculo do leite fermentado (cultura mãe). Foi identificado *L. lactis* como principal organismo fermentador do grão analisado. Já GARROTE et al. (1997) encontraram uma microbiota composta por 78% de *Lactobacillus*, 1% de *Lactococcus* e 21% de leveduras.

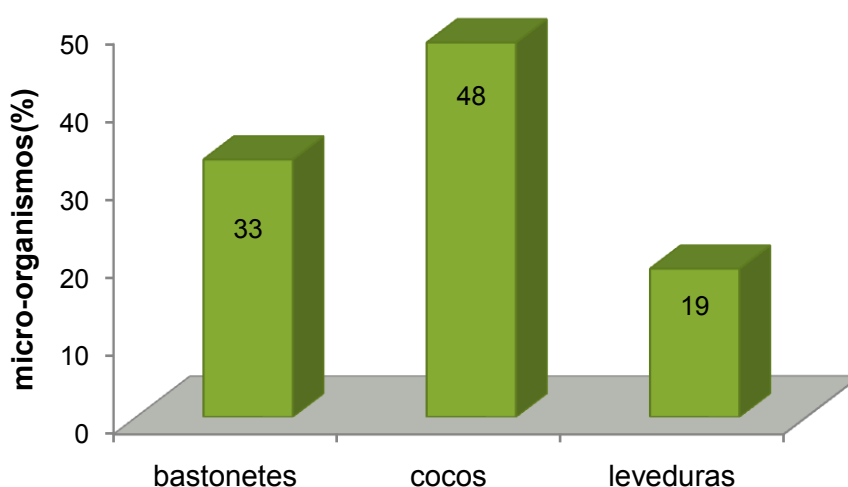


Figura 14: Média da frequência de distribuição dos isolados do grão de kefir.

4.1.1 Identificação das BAL

Após a caracterização microbiana dos isolados, dez bactérias foram selecionadas para serem identificadas com kit API 50 CHL utilizado para identificação de *Lactobacillus* e semelhantes, usando o software da companhia API LAB plus. A seleção das bactérias foi realizada considerando as diferentes características fenotípicas apresentadas e o número de células predominantes (10^9 - 10^8 UFC/ mL) destes isolados no grão conforme apresentado no Apêndice I. Foram então selecionadas seis bactérias do meio MRS e quatro do M17. A Tabela 9 apresenta o resultado da identificação das culturas selecionadas baseado no perfil bioquímico de 49 carboidratos (Figura 15).

Tabela 9: Identificação das BAL pelo kit API 50 CHL

Nº do isolado	Identificação	% ID
1MRSK2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides/dextranicum</i> 2	99,0
2MRSK2	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 1	89,2
1MRSK4	NI*	
2MRSK4	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> 3	69,4
3MRSK7	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> 1	99,9
5MRSK7	NI*	
2M17K3	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 2	73,7
3M17K3	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 2	95,5
4M17K5	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>delbrueckii</i>	96,5
3M17K9	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> 1	99,9

NI – não identificado; ID- porcentagem de probabilidade de acerto na identificação



Figura 15: Perfil bioquímico apresentado por dois isolados por meio do kit API 50 CHL. Leitura do teste: viragem da cor púrpura a preto, para o teste da esculina, e viragem da cor púrpura a amarelo, para os demais, são considerados como resultados positivos.

Das dez bactérias identificadas pelo kit API, quatro foram identificadas como pertencentes ao gênero dos *Lactobacillus*, sendo três espécies ou sub-espécies diferentes; um *Leuconostoc* e três *Lactococcus*, sendo duas sub-espécies diferentes, resultando em seis espécies ou sub-espécies bacterianas. As outras duas bactérias não foram identificadas (Tabela 9).

Estes resultados foram posteriormente comparados com aqueles obtidos por métodos de identificação molecular. A técnica PCR ARDRA 16S-23S rDNA permitiu a identificação, no nível de espécie, apenas de duas bactérias isoladas do grão de kefir. Estas bactérias revelaram na visualização do gel da amplificação por PCR a presença de três bandas correspondentes aos espaçadores curto, médio e longo do rDNA 16S, sugerindo tratar-se de *Lactobacillus* (Figura 16). A análise das restrições por endonucleases específicas para identificação de BAL mostrou que os dois isolados eram uma única espécie de *Lactobacillus casei*, conforme ilustra a Figura 17.

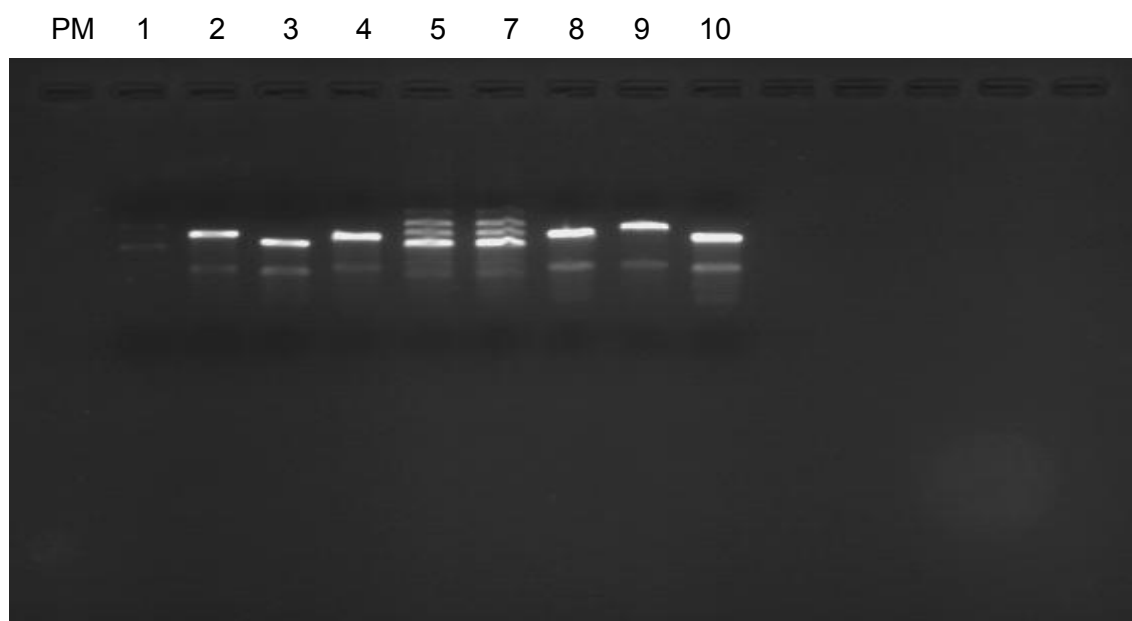
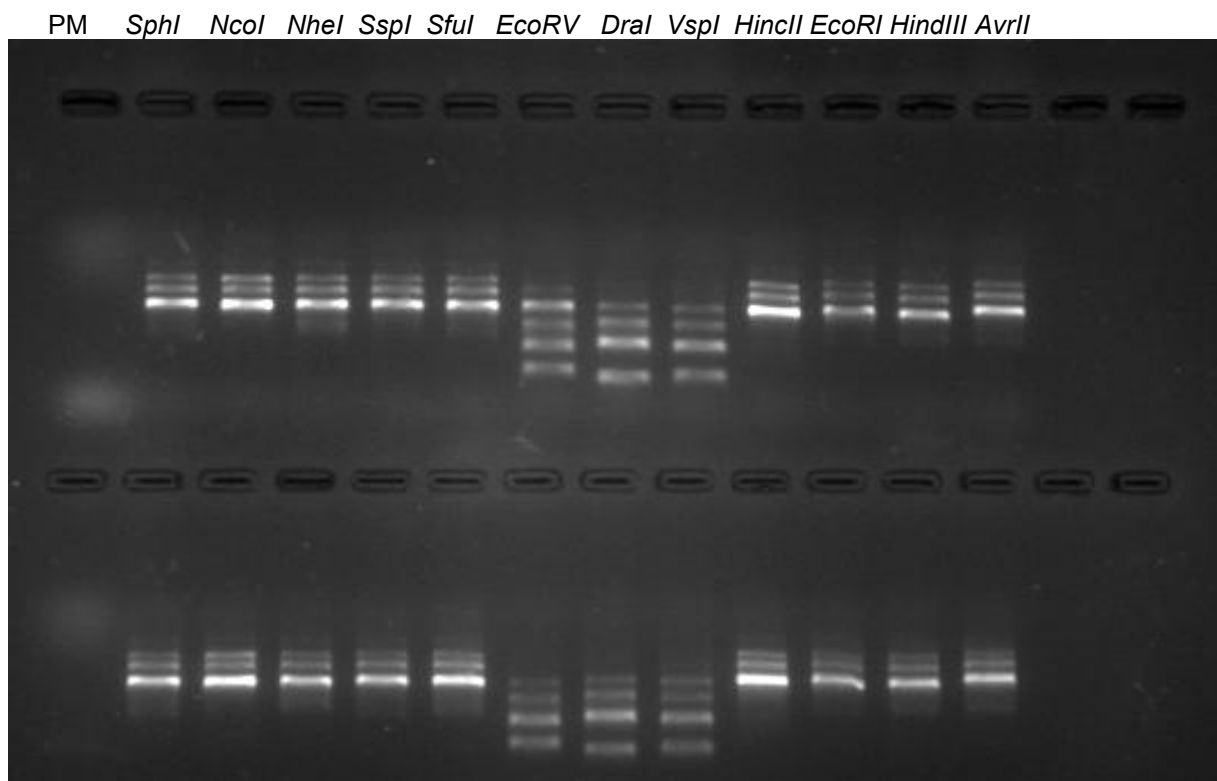


Figura 16: Foto do gel de agarose 1,4% mostrando o resultado da amplificação PCR correspondente à região intergênica 16S-23S rDNA de amostras de bactérias isoladas do grão de kefir; possível observar-se a presença das três bandas correspondentes aos espaçadores.

Esta figura não apresenta a amplificação da bactéria de nº 6 devido ao não crescimento durante a ativação das culturas. Mas foi, posteriormente, submetida às mesmas etapas do processo de identificação.



Longo	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-
Médio	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-
Curto	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-

Figura 17: Perfil de restrição dos espaçadores longo, médio e curto, amplificados, da região intergênica 16S-23S do rDNA de *Lactobacillus casei*, em gel de agarose 1,4%. PM: padrão de peso molecular 1Kb (Promega). +, ocorrência de digestão; -, ausência de digestão.

Foi realizado o seqüenciamento da região 16S do rDNA para as bactérias não identificadas pela PCR-ARDRA. Por esta metodologia, foram identificados quatro bactérias pertencentes ao gênero *Lactococcus*, sendo três *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* e um *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, e duas espécies de *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides*. Dois isolados ainda estão em processo de identificação (Tabela 10).

Tabela 10: Identificação das BAL pelo Kit API 50 CHL e PCR -ARDRA 16S-23S rDNA ou seqüenciamento

Nº do isolado	Log UFC/mL	Identificação	
		API	PCR- ARDRA 16S-23S rDNA ou sequenciamento
1MRSK2	8,26	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i> / <i>dextranicum</i> 2	EA*
2MRSK2	9,18	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 1	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>
1MRSK4	8,00	NI*	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i>
2MRSK4	9,23	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> 3	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>
3MRSK7	8,08	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> 1	<i>Lactobacillus casei</i>
5MRSK7	9,58	NI*	EA*
2M17K3	8,28	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i>
3M17K3	9,04	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 2	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>
4M17K5	9,41	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>delbrueckii</i>	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>
3M17K9	7,78	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> 1	<i>Lactobacillus casei</i>

*NI – não identificado; EA – em andamento

O seqüenciamento de DNA confirmou os resultados dos dois *Lactobacillus* identificados por PCR-ARDRA 16S-23S rDNA, comprovando a eficácia da técnica ARDRA para determinação de espécies do gênero *Lactobacillus* conforme demonstraram MOREIRA et al. (2005), CRISPIM (2008) e SANTOS (2008).

Então, de acordo com os resultados dos métodos moleculares obtidos até agora, pode-se afirmar que entre os oito micro-organismos isolados e definitivamente identificados dos grãos de kefir, 2 foram identificados como *Lactobacillus casei*, 3 como *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, 1 como *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* e 2 como *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides*, totalizando em quatro espécies diferentes (Tabela 10).

Como o objetivo da identificação dos micro-organismos no presente estudo consistia em denominar os componentes microbianos da cultura iniciadora formulada, este resultado não representa a microbiota total do grão de kefir e sim, parte dela, pois foram identificados apenas oito morfotipos bacterianos dentre os 22 isolados.

As duas bactérias identificadas como espécie *L. casei* pela técnica PCR-ARDRA 16S-23S rDNA foram as mesmas identificadas como *L. paracasei* pelo kit API (Tabela 10). Ambos os métodos bioquímico e molecular identificaram-nas como sendo do mesmo gênero, mas diferiram em relação à espécie identificada. Somente 29% dos resultados obtidos pelo kit API foram condizentes com os dados obtidos por métodos moleculares conforme mostra Tabela 10. Segundo CRISPIM (2008), alguns taxa gerados com base em características fenotípicas não correspondem às relações filogenéticas.

DE MARTINIS (2002) considerou insatisfatória a utilização do padrão de fermentação de carboidratos como único critério para identificação das bactérias acidoláticas (BAL) porque ocorrem frequentemente variações nas fermentações, e a interpretação pode ser subjetiva.

Diversos trabalhos da literatura apresentaram as linhagens *Lactococcus lactis* (ANGULO et al., 1993; PINTADO et al., 1996; MOTAGHI et al., 1997; GARROTE et al., 2001; SIMOVA et al., 2002; YÜKSEKDAG et al., 2004; WITTHUHN et al., 2005; ZHOU et al., 2007; MAGALHÃES et al., 2010) e *Leuconostoc mesenteroides* (MOTAGHI et al., 1997; GARROTE et al., 2001; WITTHUHN et al., 2005; ZHOU et al., 2007) como micro-organismos frequentemente isolados da população do grão de kefir, podendo ser considerados como espécies normais da microbiota dos grãos de kefir .

Segundo ANGULO et al. (1993), *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* foi a espécie predominante entre as BAL, constituindo 62% da população do grão. Enquanto as espécies *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* e *Leuconostoc* spp. apareceram em somente três dos oito grãos de kefir analisados. Diferentemente, GARROTE et al. (2001) isolaram a linhagem *L. lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* em somente um tipo de grão.

SIMOVA et al. (2002) encontraram duas espécies de estreptococos lácticos homofermentativos predominantes em todos os tipos de grãos e amostras de kefir analisados, sendo que a linhagem *L. lactis* ssp. *lactis* prevaleceu sobre o *S. thermophilus*.

Diferentemente dos outros autores, YÜKSEKDAG et al. (2004) isolaram 11 linhagens de *L. cremoris* e apenas quatro linhagens de *L. lactis* em amostras de kefir de origem Turca.

Lactobacillus casei está entre as espécies de *Lactobacillus* homofermentativas mais comumente isoladas dos grãos de kefir segundo BOSCH et al. (2006). Outros trabalhos também demonstraram a presença de *L. casei* (ANGULO et al., 1993;

MOTAGHI et al., 1997; SIMOVA et al., 2002; ZHOU et al., 2007), entretanto espécies de *Lactobacillus* heterofermentativas foram predominantes (ANGULO et al., 1993; MOTAGHI et al., 1997; SIMOVA et al., 2002).

Todas as bactérias isoladas dos grãos neste estudo foram anteriormente identificadas em populações microbianas de grãos de kefir.

4.1.2 Identificação das leveduras

Primeiramente, as cinco leveduras isoladas foram agrupadas de acordo com testes bioquímicos e fisiológicos, resultando em três espécies: 2YMK2 =1YMK9; 3YMK2=2YMK9 e 4YMK9 (Apêndice J). Estes resultados foram confirmados pelo seqüenciamento da região D1/D2 da subunidade maior do rDNA conforme apresentado na Tabela 11.

Tabela 11: Identificação molecular de leveduras isoladas do grão de kefir

Nº do isolado	Identificação
2YMK2	<i>Kazachstania unispora</i>
3YMK2	<i>Torulaspota delbrueckii</i>
1YMK9	<i>Kazachstania unispora</i>
2YMK9	<i>Torulaspota delbrueckii</i>
4YMK9	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

A espécie *Kazachstania unispora* também conhecida por *Saccharomyces unisporus* foi identificada em amostras de kefir e em alguns outros tipos de leite fermentado segundo dados da literatura (ENGEL et al., 1986; ANGULO et al., 1993; WYDER et al., 1997; MARQUINA et al., 2002; LATORRE-GARCIA et al., 2007; WATANABE et al., 2008).

Análises realizadas por LATORRE-GARCIA et al. (2007) em amostras de kefir disponível no comércio e artesanal apresentaram um amplo espectro de levedura, principalmente as amostras artesanais. O seqüenciamento do gene rRNA revelou a presença de *Issatchenkia orientalis*, *Saccharomyces unisporus*, *Saccharomyces exiguus* e *Saccharomyces humaticus* como espécies predominantes nas bebidas.

Outro estudo realizado por ENGEL et al. (1986) em 35 amostras de kefir, sendo 17 amostras produzidas com grãos domésticos, duas feitas com culturas iniciadoras industriais e 16 obtidas no comércio caracterizaram-se pela presença da espécie *S. unisporus* entre outras leveduras isoladas.

WATANABE et al. (2008) ao estudarem a população microbiana de dois tipos de leite fermentado tradicionais da Mongólia, “Airag” também conhecido por Koumiss (feito com leite de égua) e “Tarag” (feito com leite de vaca, cabra ou camela), documentaram a presença das leveduras *K. marxianus* e *K. unispora* como isolados predominantes em “Airag”. E as espécies *S. cerevisiae*, *K. unispora* e *I. orientalis* foram isoladas em alta frequência no leite fermentado “Tarag”. O leite fermentado de camela apresentou menor quantidade de leveduras em relação ao leite fermentado de vaca, reforçando a afirmativa de que a microbiota depende do substrato adicionado.

Já as espécies *T. delbrueckii* juntamente com a *S. cerevisiae* foram as leveduras mais frequentemente isoladas do kefir por ANGULO et al. (1993).

WYDER et al. (1997) estudaram a diversidade da população de leveduras presente em cinco grãos de kefir de diferentes origens. Um dos grãos, originário da Croácia, apresentou também *S. unisporus* e *T. delbrueckii* como espécies dominantes. Essas mesmas espécies também foram encontradas em dois dos sete grãos de kefir analisados por LORETAN et al. (2003). Porém, a espécie isolada predominante foi *K. marxianus*, dentre os quatro tipos de gêneros identificados, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Torulaspora* e *Debaryomyces*.

Entre as leveduras isoladas do kefir por MARQUINA et al. (2002) as espécies *S. cerevisiae* e *S. unisporus*, não fermentadoras de lactose, foram predominantes no produto, embora algumas leveduras fermentadoras de lactose (*K. marxianus*, *K. lactis* e *Candida kefir*) foram identificadas.

Alguns autores afirmam que somente leveduras lactose-positiva devem ser consideradas como espécies-específicas da microbiota do kefir devido aos produtos finais da fermentação alcoólica como, etanol e gás carbônico, que são responsáveis pelo aroma e refrescância do kefir. Entretanto, uma alta porcentagem de leveduras lactose-negativa tem sido encontrada no kefir (WYDER et al., 1997; MARQUINA et al., 2002; SIMOVA et al., 2002; MAGALHÃES et al., 2010).

Estudos preliminares sobre a formação da cultura iniciadora do kefir realizados por SIMOVA et al. (2002) revelaram que a atividade da produção de CO₂ por *K. marxianus var. lactis* foi insuficiente para produzir os efeitos da fermentação de leveduras sobre o sabor e aroma característicos. As leveduras lactose-negativa das espécies *S. cerevisiae* mostraram ser determinantes na formação de sabor e aroma típicos de levedura.

Como o grão em estudo não apresentou leveduras lactose-positiva em sua composição, provavelmente as leveduras *K. unispora* e *T. delbrueckii* foram

responsáveis pelo sabor típico do kefir devido a capacidade de fermentarem glicose e galactose. Essas leveduras possuem uma relação dependente das BAL capazes de hidrolisarem a lactose.

De acordo com os dados da literatura, pode-se observar que a espécie *K. unispora* (sinônimo de *S. unisporus*) é mais frequentemente isolada do kefir em relação a espécie *T. delbrueckii*.

4.2 Elaboração da cultura iniciadora

4.2.1 Determinação da fase log

A Figura 18 e a Figura 19 ilustram o crescimento microbiano das espécies que constituíram a cultura iniciadora deste estudo.

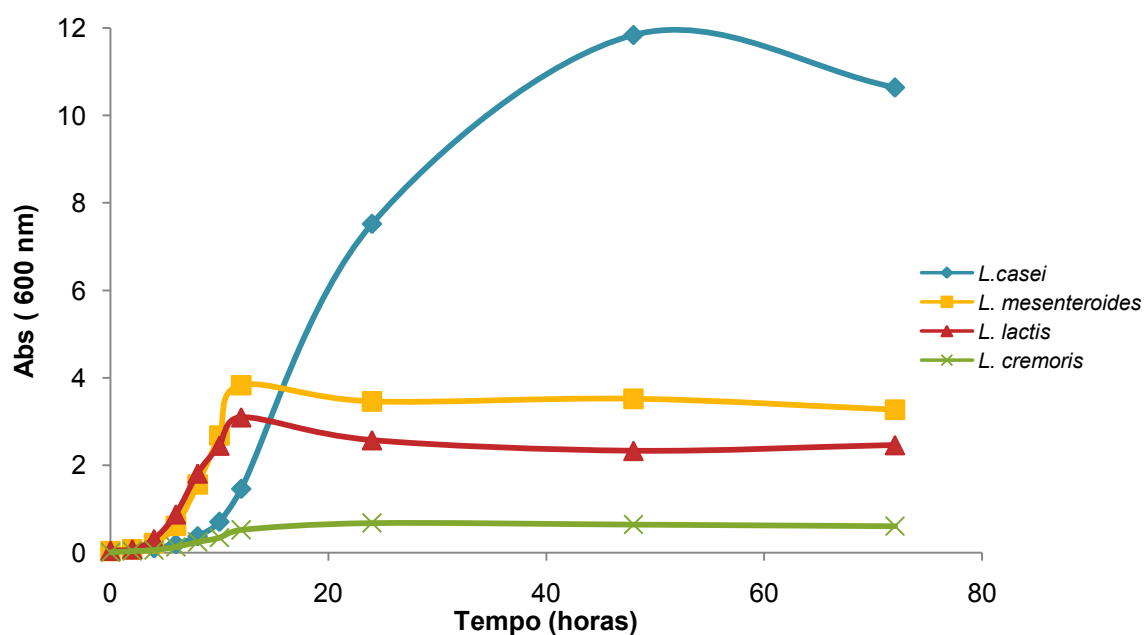


Figura 18: Características do crescimento das BAL em caldo M17 (*L. cremoris*) e MRS (*L. mesenteroides*, *L. lactis*, *L. casei*) a 22°C em condições de aerobiose durante 72 horas.

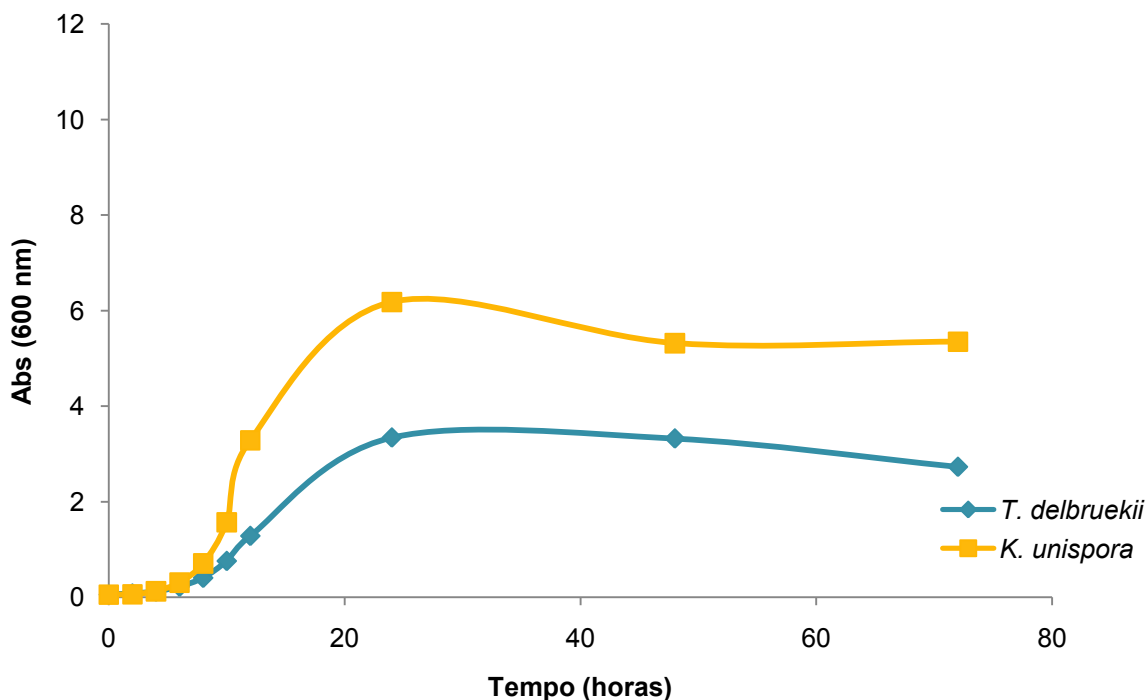


Figura 19: Características do crescimento das leveduras em caldo YM a 22°C em condições de aerobiose no intervalo de 72 horas.

As diferenças da medida de densidade óptica (D.O) obtida entre os micro-organismos podem ser explicadas pelas diferentes características morfológicas apresentadas pelas espécies. *L. casei* obteve uma D.O máxima de 11,8 e caracterizou-se por bastonetes compridos enquanto as outras bactérias atingiram D.O entre 3,0 e 3,5 e se mostraram como cocos pequenos. A exceção foi de *L. cremoris*, que também foi descrito como cocos pequenos, mas D.O não atingiu 1,0 (Figura 18).

As leveduras também tiveram diferentes medidas de densidade óptica. *K. unispora* apresentou uma D.O praticamente o dobro da D.O apresentada por *T. delbrueckii* (Figura 19).

A curva de crescimento (Figura 20) permitiu observar que as bactérias *L. cremoris*, *L. mesenteroides* e *L. lactis* atingiram a fase final log com 12 horas de cultivo. *L. casei* e as leveduras atingiram a fase final log no intervalo de 24 horas.

Embora as espécies da cultura iniciadora tenham apresentado diferentes densidades ópticas, a contagem de células quase não variou. As BAL atingiram 10^8 - 10^9 UFC/mL, exceto *L. casei* que atingiu 10^{10} UFC/mL e as leveduras chegaram a 10^8 UFC/mL no final da fase log (Figura 20).

Para a padronização do número de células da cultura iniciadora, levando em consideração a possível perda de células durante o preparo da cultura e a diluição no leite, as BAL foram concentradas 10X, visto que o objetivo era produzir uma bebida com 10^8 e 10^6 UFC/mL de BAL e leveduras, respectivamente.

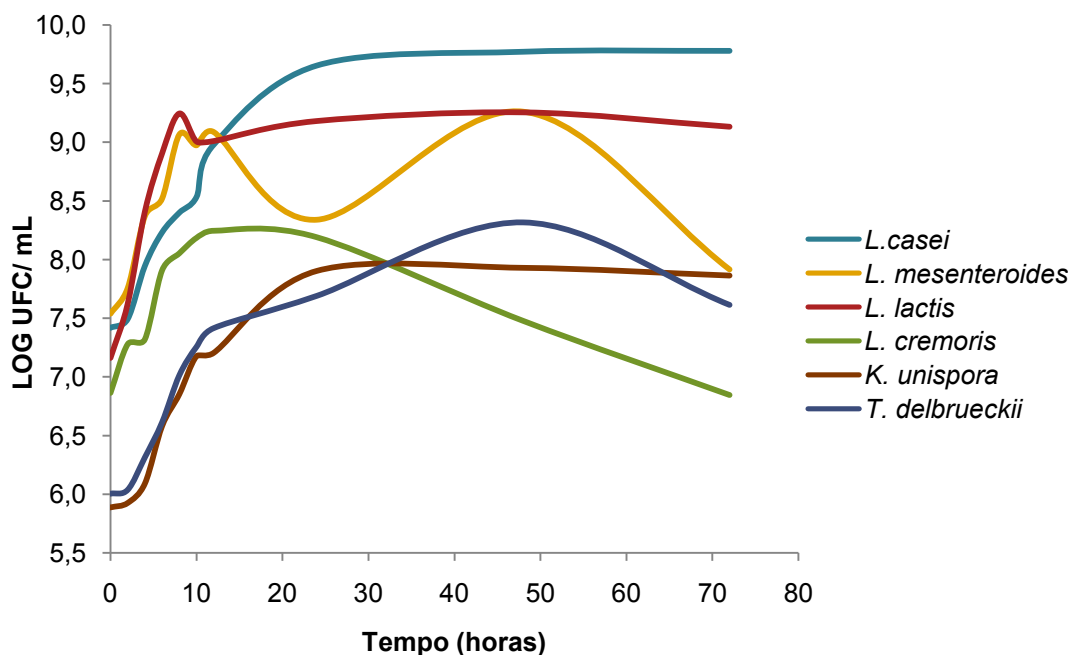


Figura 20: Contagem (log UFC/mL) das espécies *L. casei*, *L. cremoris*, *L. mesenteroides*, *L. lactis*, *K. unispora* e *T. delbrueckii* versus o tempo de crescimento em meio apropriado.

4.3 Avaliação físico-química das formulações do kefir

A Tabela 12 mostra os resultados das características físico-químicas (pH, acidez, viscosidade, etanol, sinérese e densidade) realizadas nas amostras de kefir obtidas pelos métodos tradicional (kefir TRAD), por fermentação simultânea (kefir SIM) e por fermentação sucessiva (kefir SUC).

Tabela 12: Média dos valores das características físico-químicas de kefir produzido por três métodos diferentes após três dias de acondicionamento a 4°C

parâmetros	kefir TRAD	kefir SIM	kefir SUC
pH	4,44 ± 0,00 ^a	4,32 ± 0,01 ^a	4,24 ± 0,02 ^a
acidez* (g/100g)	0,82 ± 0,02 ^b	0,92 ± 0,01 ^a	0,94 ± 0,02 ^a
viscosidade (mPa.s)	17,7 ± 1,4 ^{ab}	35,3 ± 4,5 ^a	5,6 ± 0,3 ^b
etanol (%v/m)	1,6 ± 0,2 ^a	1,6 ± 0,1 ^a	1,6 ± 0,1 ^a
sinérese (% m/m)	41,34 ± 1,29 ^{ab}	35,07 ± 1,53 ^b	62,82 ± 1,37 ^a
densidade (g/cm ³)	0,9975 ± 0,0002 ^a	0,9977 ± 0,0001 ^a	0,9976 ± 0,0000 ^a

*expressa em ácido láctico (g de ácido láctico/100g do produto)

Dados representam o valor médio de três experimentos independentes (n=9) e seu desvio padrão

a, b Médias seguidas de mesma letra na mesma linha não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os valores de pH das diferentes formulações de kefir não foram significativamente diferentes. Os valores do presente estudo aproximam-se bastante dos encontrados na literatura (MARSHALL & COLE, 1985; DITSCHAEVER et al., 1987 e 1988; MOTAGHI et al., 1997; MESQUIARI 1999; BESHKOVA et al., 2002; SIMOVA et al., 2002; MITUNIEWICZ-MAŁEK et al. , 2009).

Observou-se um pequeno decréscimo do pH em todas as amostras após três dias de acondicionamento, já que os valores de pH encontravam-se entre 4,5-4,4 antes do armazenamento. Valores semelhantes (4,46 para 4,37) foram encontrados por MITUNIEWICZ-MAŁEK et al. (2009) em kefir após o mesmo período de armazenamento. BESHKOVA et al. (2002) também observaram pequena diminuição do valor de pH do kefir obtido por fermentação sucessiva (4,40 para 4,35) e com grãos (4,50 para 4,45) após sete dias de armazenamento.

Não houve diferença significativa entre a acidez das bebidas produzidas com cultura iniciadora pelos dois métodos que, no entanto diferenciaram significativamente da amostra de kefir obtida pelo método tradicional que apresentou menor acidez.

A diferença entre a acidez das amostras provavelmente foi influenciada pelo tipo de inóculo utilizado e não pelo processo de fabricação, pois as amostras de kefir SUC e SIM, considerados iguais (p>0,05), foram produzidos utilizando a mesma cultura iniciadora e processos de fermentação diferente. Já o kefir TRAD, considerado

diferente ($p < 0,05$) dos demais, foi obtido por meio dos grãos de kefir que possui uma microbiota mais complexa e diversificada.

A influência do tipo de cultura nas características físico-químicas do produto também foi relatada por VIEGAS (2008). A autora desenvolveu leites fermentados a partir de diferentes BAL isoladas de queijo coalho e mostrou que os leites fermentados por *L. acidophilus*, quando comparados aos outros leites fermentados, por exemplo, leite fermentado por *Weissella confusa*, apresentaram valores de acidez titulável (%) mais altos, assim como valores de pH mais baixos no final da fermentação.

Resultados similares de acidez foram encontrados por MESQUIARI, 1999 (0,82-0,99 g/100g), BESHKOVA et al., 2002 (0,82-0,84 g/100g) e SIMOVA et al., 2002 (0,82 g/100g).

ASSADI et al. (2000) também obtiveram valores de acidez relativamente próximos em kefir produzidos com cultura iniciadora em diferentes proporções (0,70-0,77%), entretanto o kefir feito com grãos apresentou 1,5%.

DUITSCHAEVER et al. (1988) ao caracterizar amostras de kefir produzidos por cinco diferentes métodos encontraram valores entre 0,78-0,94 g/100g equivalentes ao presente estudo, com exceção do kefir produzido com iniciadora e fermentação sucessiva que apresentou 1,26 g/100g.

Paralelamente, estudo realizado por TERRA (2007) mostrou que o iogurte natural apresentou porcentagem de acidez mais elevada (1,04%; 0,72%) e valor de pH inferior (4,3; 4,5) em relação ao kefir tradicional fermentado por 12 h.

Em adição, MERIN & ROSENTHAL (1986) e TERRA (2007) avaliaram kefir produzido por dois tipos de leite (com 1% e 3% de gordura) e reportaram que os produtos apresentaram praticamente os mesmos valores de acidez e pH.

Embora exista diferença entre a acidez das amostras de kefir obtidas pelo método tradicional e produzidas com cultura iniciadora, todas as bebidas deste estudo estão de acordo com o padrão de acidez estabelecido pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de leites fermentados, Instrução Normativa nº46/2007 (BRASIL, 2007), menor que 1,0g/100g do produto.

As amostras de kefir SIM e SUC foram consideradas diferentes entre si em relação à viscosidade de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade (Tabela 12), mas estas não diferenciaram do kefir TRAD. Este comportamento variado pode ser atribuído as diferenças de velocidade de metabolização das bactérias e leveduras do cultivo iniciador em função do processamento empregado.

Os valores de viscosidade obtidos nas amostras TRAD e SUC foram similares aos obtidos por GARROTE et al. (2001) que avaliaram a viscosidade de quatro amostras de kefir tradicional obtidas de grãos de diferentes origens. As amostras também não apresentaram diferenças significativas entre elas (7,5 – 15,4 mPa.s). DITSCHAEVER et al. (1987 e 1988) e MOTAGHI et al. (1997) também apresentaram valores bem próximos ao do kefir TRAD e SUC.

Já a viscosidade obtida pelo kefir SIM foi comparável aos valores das amostras de kefir tradicional elaborados com grãos na proporção de (10 e 50 g/L) determinado por GARROTE et al. (1997) e amostras desenvolvidas com cultura iniciadora por MITUNIEWICZ-MAŁEK et al. (2009). A viscosidade do kefir SIM aproxima-se mais dos valores encontrados nos iogurtes naturais batidos (35-56 cP) (NETO et al., 2005).

O kefir SUC caracterizou-se por uma bebida mais fluida diferente do kefir obtido por BESHKOVA et al. (2002), em que o produto de maior valor de viscosidade foi o obtido da fermentação sucessiva, embora os autores afirmaram não terem encontrado diferenças significativas entre as amostras de kefir obtidas pelos mesmos processos de fermentação utilizados neste estudo.

Não foram constatadas diferenças significativas nos teores médios de etanol entre as amostras. As amostras apresentaram graduação alcoólica de 1,6%, o que permite dizer que todo xarope de sacarose adicionado conforme o cálculo estimado da reação estequiométrica de fermentação alcoólica foi consumido pela cultura iniciadora e pelo grão para a produção de 1,5% de álcool. Porém, uma pequena porcentagem de álcool ($\pm 0,1\%$) foi detectada além do esperado. Isto indica que, provavelmente, ao adoçar as amostras no final do processamento, as leveduras continuaram metabolizando o açúcar disponível, mesmo sob refrigeração entre 4-8°C.

KWAK et al. (1996) avaliaram a percentagem de glicose ideal a ser adicionada no kefir durante o armazenamento e relataram que foram produzidos etanol nas amostras adicionadas com 0,5 e 1,0% de glicose armazenadas a 25°C por 7 dias e 5°C por 14 dias. Os autores consideraram o kefir adicionado com 0,4% de glicose como o produto mais estável por não ter encontrado etanol durante o acondicionamento, no entanto a concentração de etanol produzida por este kefir foi apenas 0,07%.

A adição de sacarose durante a fermentação para produção do kefir foi necessária para formação de etanol uma vez que não foram identificadas neste estudo leveduras lactose-positiva, tanto na cultura iniciadora quanto no grão.

Os resultados das amostras estão um pouco acima dos valores requeridos pela legislação vigente (BRASIL, 2007) que estabelece graduação alcoólica entre 0,5%-

1,5% (m/v). Diferentemente da legislação brasileira, a porcentagem de etanol não é mencionada para os padrões de kefir estabelecidos pela FAO/WHO (2003).

BESHKOVA et al. (2002) obtiveram 0,25%, 0,36% e 0,48 % para amostras de kefir obtidas de grãos, por fermentação simultânea e por fermentação sucessiva, respectivamente diferente dos valores encontrados no presente estudo.

O teor de etanol encontrado na literatura varia amplamente. DUITSCHAEVER et al. (1987) encontraram (0,12-0,13)% em kefir produzido por fermentação sucessiva. Já MOTAGHI et al. (1997) encontraram valores entre 0,10-0,20% em kefir obtido de grãos com diferente tempos de fermentação. ASSADI et al. (2000) obtiveram concentrações entre (0,33-0,53)% de kefir produzido por culturas iniciadoras e 0,15% de kefir feito com grãos.

LIBUDZISZ & PIATKIEWICZ (1990) reportaram que foram encontradas concentrações de 0,035% a 2,0% de etanol em kefir polonês. Outro autor afirmou ter encontrado etanol acima de 2,0% como também 0,01 a 0,05% em kefir obtido de cultura iniciadora (KOROLEVA, 1988).

Outros estudos mostraram que kefir obtido utilizando-se como inóculo “cultura mãe” apresentaram baixo teor alcoólico (MARSHALL & COLE, 1985; SIMOVA et al., 2002) (0,06 e 0,09%), não sendo considerado um método interessante, pois o etanol tem importante papel na formação do sabor e aroma do kefir.

A grande diferença existente entre as porcentagens de etanol encontradas no kefir relatadas na literatura deve-se ao tipo de cultura iniciadora, tempo e temperatura de fermentação (KOROLEVA, 1988).

MESQUIARI (1999) desenvolveu um sucedâneo do kefir com culturas do iogurte (*L. delbrueckii bulgaricus* e *S. salivarius thermophilus*) e cultura liofilizada de *S. cerevisiae*. A autora relatou que o teor de etanol do leite fermentado foi evidente somente após 24h de incubação (0,85%) e se manteve constante após 2-3 dias de incubação (1,33-1,79%), atingindo 1,97 % com dez dias de incubação. Já neste estudo, o teor de etanol desejado foi atingido com 19h e 24h de fermentação para kefir produzido com cultura iniciadora e com grãos, respectivamente.

Pode-se notar, então, que os leites fermentados produzidos por cultura iniciadora no presente estudo atingiram o grau alcoólico com um período menor de fermentação, o que pode ser considerado vantajoso para a produção em escala industrial.

A suscetibilidade à sinérese das amostras de kefir SIM e SUC obtidos com cultura iniciadora foi considerada diferente ($p < 0,05$). O menor valor de dessoragem

(35,07%) foi apresentado pela amostra SIM, indicando que para estudos futuros, possivelmente uma menor quantidade de aditivos deverá ser adicionada a esta formulação para melhorar a estabilidade do produto.

Por outro lado, o maior teor de sinérese (62,82%) encontrado foi da amostra SUC que por sua vez obteve o menor valor de viscosidade (5,6 mPa.s), podendo ser considerada de acordo com as características físico-químicas apresentadas como a amostra mais fluida. A relação entre viscosidade e sinérese pode ser verificada na Figura 21.

Apesar do grau de dessoragem intermediário apresentado pelo kefir TRAD, não foram constatadas diferenças significativas entre as amostras TRAD e amostras SIM e SUC. Isto mostra que as bebidas desenvolvidas com cultura iniciadora apresentaram o mesmo perfil de sinérese, característico do kefir tradicional.

A diferença encontrada em relação ao teor médio de sinérese das amostras de kefir desenvolvidas com cultura iniciadora também pode ser explicada pela diferença de velocidade de metabolização da cultura devido aos diferentes processos de fermentação utilizados. Neste caso, a sinérese não foi influenciada pela variação do teor de sólidos entre as amostras porque todos os leites fermentados foram produzidos com o mesmo tipo de leite.

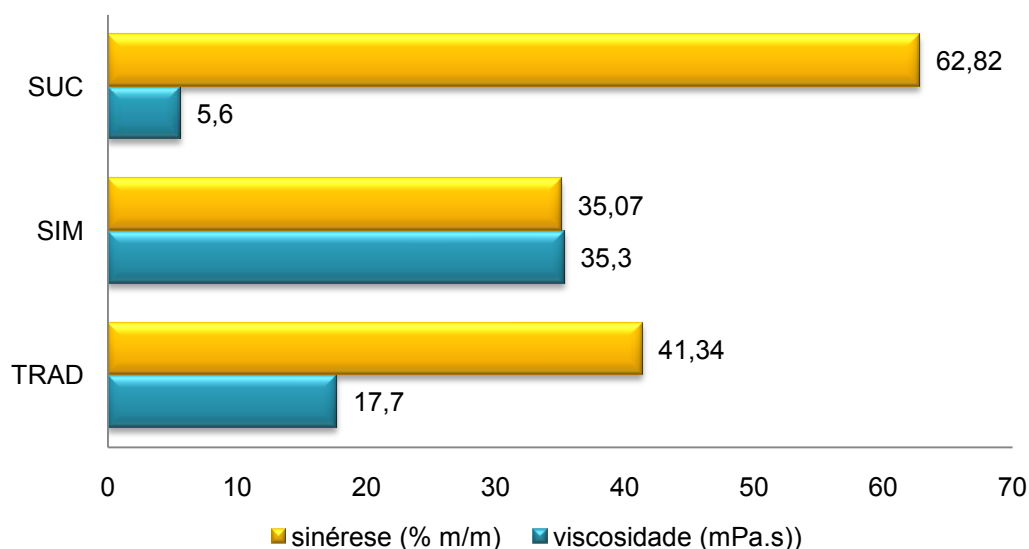


Figura 21: Valores médios de sinérese e viscosidade encontrados nas amostras de kefir tradicional (TRAD), kefir simultâneo (SIM) e kefir sucessivo (SUC).

Apesar de se encontrar na literatura poucos trabalhos com relação a porcentagem de sinérese presente neste tipo de leite fermentado, os dados obtidos aproximam-se dos valores encontrados nos produtos desenvolvidos por MESQUIARI (1999) (41%) e MARTÍN-DIANA et al. (2003) (57%).

As amostras de kefir não indicaram diferença significativa entre si em relação a densidade. Os resultados indicam que provavelmente também não existe diferença significativa em relação ao teor de sólidos entre as amostras.

Valores similares de massa específica foram obtidos por ASSADI et al. (2000), embora os autores tenham considerado que as bebidas produzidas com cultura iniciadora em diferentes proporções apresentaram valores superiores ao kefir produzido com grão.

4.4 Análise microbiológica

Não foi constatada diferença significativa em relação ao número total de BAL entre os dois tipos de fermentação, simultânea e sucessiva, conforme ilustra a Figura 22. No entanto, as amostras de kefir SIM e SUC apresentaram diferenças significativas em relação aos parâmetros de viscosidade e sinérese e que foram justificados possivelmente devido a uma diferença de velocidade de multiplicação das culturas em função processo de fermentação.

Já as amostras TRAD e SUC foram consideradas estatisticamente diferentes, sendo que o kefir TRAD mostrou maior número de BAL. Este dado está de acordo com o esperado, pois o kefir TRAD foi elaborado com grãos de kefir, uma cultura mais diversificada que a cultura iniciadora formulada.

Outro fator que pode ter favorecido o maior número de BAL presente no kefir TRAD é a acidez. Segundo GARROTE et al. (1998), o gênero *Lactococcus* é mais sensível a baixos valores de pH do que os *Lactobacillus*, e portanto mais sensível a altos valores de acidez. Como o kefir TRAD apresentou menor acidez, possivelmente um grande número de *Lactococcus* foi enumerado juntamente com as outras BAL (Tabela 12).

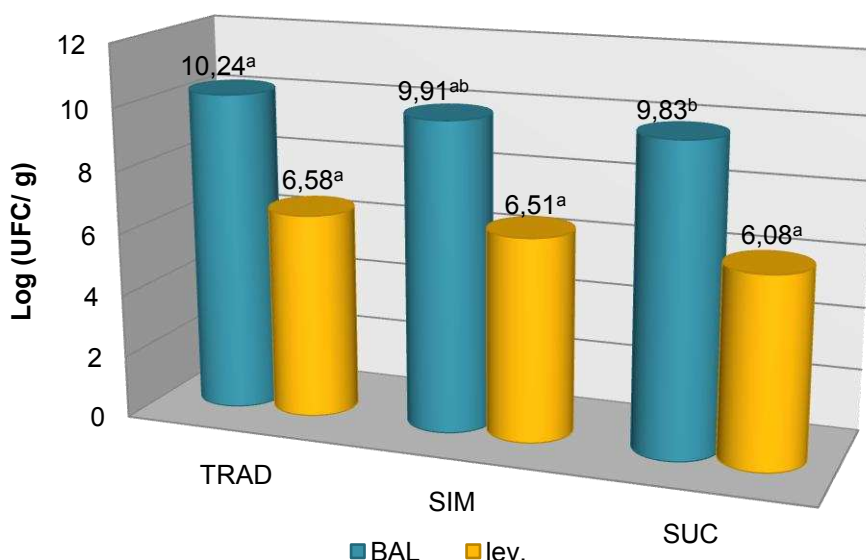


Figura 22: Contagem total (expresso em $\log_{10}$ UFC/g) de bactérias do ácido láctico (BAL) e leveduras presentes nas amostras de kefir TRAD, SIM e SUC após três dias de armazenamento a 4°C.

^{a,b} Médias seguidas de mesma letra, para o mesmo tipo de micro-organismo, não diferem a 5% de significância.

Vários trabalhos apresentaram números de BAL bastante próximos do presente estudo. Alguns autores (GARROTE et al., 1998; BESHKOVA et al., 2002 e SIMOVA et al., 2002) enumeraram *Lactobacillus* e *Lactococcus* separadamente e, em quase todos, *Lactococcus* foram predominantes no kefir. Isto foi também encontrado no presente trabalho com os isolados identificados como *Lactococcus* (2MRSK2, 2MRSK4, 3M17K3 e 4M17K5) em populações mais elevadas (9,18; 9,23; 9,04 e 9,41 $\log$ UFC/ml, respectivamente) quando comparados com os dois *Lactobacillus* (3MRSK7 e 3M17K9, com 8,08 e 7,78 $\log$ UFC/ml, respectivamente) (Tabela 10).

Não houve diferença significativa em relação às contagens médias totais de leveduras encontradas entre as três amostras (Figura 22). Este resultado parece estar relacionado com a pequena diferença encontrada entre a riqueza de leveduras presentes no grão e na cultura iniciadora. Foram encontradas três espécies no grão e a cultura iniciadora é constituída por duas delas.

Resultados similares de contagens de leveduras foram encontrados na literatura (SIMOVA et al., 2002; DITSCHAEVER et al., 1987 e GARROTE et al., 2001). Diferentemente do presente estudo, BESHKOVA et al. (2002) encontraram 10^6

UFC/mL em kefir produzidos com cultura iniciadora e 10^5 UFC/ mL em kefir tradicional. Os autores atribuíram a menor contagem obtida ao fato de que as leveduras podem não ter migrado totalmente do grão para o leite durante a incubação.

DUITSCHAEVER et al. (1988) também encontraram valores entre 10^5 - 10^6 UFC/mL em quatro tipos de kefir. Apenas um kefir produzido com cultura DVS apresentou 10^3 UFC/mL e foi considerado como uma bebida atípica. Notoriamente, a presença de leveduras em certo número é essencial para o desenvolvimento das características sensoriais do kefir.

De acordo com a Figura 22, pode-se considerar que o kefir SIM e kefir TRAD foram semelhantes em relação às contagens microbiológicas encontradas. Embora exista diferença significativa na contagem total de BAL entre as amostras TRAD e SUC, todas as amostras apresentaram contagens superiores ao mínimo estabelecido no RTIQ de leites fermentados (BRASIL, 2007).

A legislação estabelece contagens mínimas durante toda a vida de prateleira do produto igual a 10^7 UFC/g de bactérias lácticas totais e 10^4 UFC/g de leveduras específicas. Contagens mais elevadas de micro-organismos probióticos nos produtos finais são desejáveis para garantir que contagens ideais sejam mantidas nos produtos fermentados estocados sob refrigeração durante todo o período de validade (VIEGAS, 2008).

Os valores 10^9 - 10^{10} UFC/g e 10^6 - 10^7 UFC/g sugerem que mesmo se houver uma redução dessas contagens durante o armazenamento sob refrigeração, essas ainda provavelmente permanecerão adequadas para os efeitos probióticos.

4.5 Avaliação sensorial

4.5.1 Teste de Aceitação

Na Tabela 13, são apresentados os resultados do teste de aceitação das amostras de kefir obtidas pelo método tradicional (TRAD) e por fermentações simultânea (SIM) e sucessiva (SUC). Estes resultados revelaram que houve diferença ($p \leq 0,05$) entre as amostras em relação a três dos quatro atributos avaliados (efervescência, acidez e consistência), bem como quanto à impressão global. Pode-se notar que sempre que as amostras foram consideradas estatisticamente diferentes, o kefir TRAD recebeu a menor média, sendo, portanto, o menos aceito pelos provadores.

Tabela 13: Médias das notas de aceitação para as três formulações de kefir

Parâmetros avaliados*	amostras		
	TRAD**	SIM***	SUC****
aroma	3,98 ^a	4,35 ^a	4,21 ^a
efervescência	4,24 ^b	4,83 ^a	4,73 ^a
acidez	4,05 ^b	4,63 ^a	4,52 ^{ab}
consistência	4,27 ^c	5,54 ^a	4,98 ^b
Impressão global	3,73 ^b	4,65 ^a	4,48 ^a

a, b, c Médias na mesma linha acompanhadas de mesma letra não diferem entre si a 5% de significância pelo teste de Tukey.

*Parâmetros avaliados por meio de escala hedônica de sete pontos na qual 1 = desgostei extremamente, 4 = não gostei, nem desgostei e 7 = gostei extremamente.

**TRAD= kefir obtido pelo método tradicional (grão).

***SIM= kefir obtido pelo método com cultura iniciadora por fermentação simultânea.

****SUC= kefir obtido pelo método com cultura iniciadora por fermentação sucessiva.

Não foi encontrada diferença ($p \geq 0,05$) entre as três amostras de kefir em relação ao aroma, o que pode significar que os três diferentes processos tecnológicos empregados neste estudo não exerceram influência sobre o aroma do produto ou que os consumidores não foram capazes de avaliar a característica aroma, que trata-se de uma característica sensorial difícil de ser analisada pelo consumidor. Outra possibilidade seria que os micro-organismos selecionados do grão de kefir para constituir a cultura iniciadora foram capazes de produzir aroma semelhante ao produto fermentado pelo grão pelo fato de predominarem no grão.

Entretanto, estudos realizados por BESHKOVA et al. (2003) apresentaram diferenças significativas na produção de compostos carbonílicos, acetaldeído e diacetil, entre as amostras de kefir produzidas com cultura iniciadora (isolada do grão) e produzida com grão, sendo estes dois compostos aromáticos encontrados em maiores concentrações no kefir obtido de cultura iniciadora.

Em relação aos outros três atributos e à impressão global, pode-se dizer que o método tradicional e os métodos com cultura iniciadora (fermentações simultânea e sucessiva) resultaram em produtos com características sensoriais diferentes ($p \leq 0,05$), com exceção da acidez da amostra SUC que foi considerada estatisticamente igual à das amostras TRAD e SIM, sendo, portanto, os produtos processados pelos métodos

de obtenção do kefir com cultura iniciadora os que receberam as maiores médias de aceitação.

Foi atribuída à amostra TRAD menor média em relação à acidez no teste de aceitação (Tabela 13) e também menor acidez expressa em ácido láctico (Tabela 12). Este fato parece sugerir que os consumidores direcionaram uma maior aceitação para os produtos mais ácidos (SIM e SUC), evidenciando que a acidez constitui um atributo significativo para a aceitação do produto. Resultados similares foram encontrados por DUTSCHAEVER et al. (1988).

Observando a Tabela 13, nota-se que não houve diferença ($p \geq 0,05$) entre as amostras SIM e SUC, exceto para o atributo consistência. Isto parece sugerir que os dois diferentes processos de fermentação utilizados na fabricação do kefir influenciaram pouco nas características sensoriais das duas amostras, a não ser quanto ao atributo consistência, sendo atribuída à amostra SIM a maior média. Estes resultados se correlacionam com os resultados de viscosidade e sinérese obtidos neste estudo (a amostra SIM apresentou maior viscosidade e menor sinérese em relação às demais), evidenciando uma maior aceitação dos consumidores (97%) por uma bebida mais consistente e homogênea, como representado na Figura 23.

BESHKOVA et al. (2002) relataram que não foi encontrada diferença significativa entre as características sensoriais das amostras de kefir obtido por fermentação simultânea (SIM) e por fermentação sucessiva (SUC), embora o kefir SUC tenha recebido notas maiores por parte dos provadores. Diferentemente do presente estudo, o kefir SIM apresentou-se menos viscoso que o kefir SUC, segundo os autores. DUTSCHAEVER et al. (1988), no entanto, não encontraram diferença significativa na consistência entre as amostras de kefir SIM e SUC.

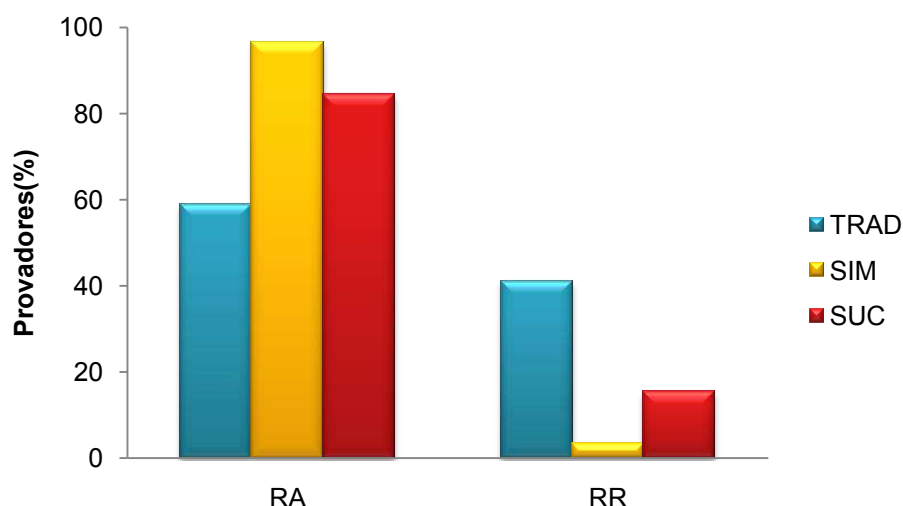


Figura 23: Histograma de freqüência das porcentagens de aprovação e rejeição em relação ao atributo consistência das três amostras de kefir. RR: região de rejeição (notas de 1 a 3); RA: região de aceitação (notas de 5 a 7). Parâmetros avaliados por meio de escala hedônica de sete pontos na qual 1 = desgostei extremamente, 4 = não gostei, nem desgostei e 7 = gostei extremamente. TRAD= kefir obtido pelo método tradicional (grão); SIM= kefir obtido pelo método com cultura iniciadora por fermentação simultânea; SUC= kefir obtido pelo método com cultura iniciadora por fermentação sucessiva.

Na Figura 24 encontram-se representadas as distribuições de freqüência das notas de aceitação atribuídas às três formulações de kefir. É possível observar que as distribuições de freqüência dos valores hedônicos de aceitação atribuídos às amostras SIM e SUC, elaboradas com cultura iniciadora, ficaram concentradas na região de aceitação, em torno das notas 5 e 6 (gostei ligeiramente e gostei moderadamente), enquanto que as distribuições de freqüência da amostra TRAD concentraram-se em torno dos valores 2 e 3 (rejeição) e do 5 (aceitação), o que parece sugerir que um segmento dos consumidores gostou da amostra, mas outro grupo não.

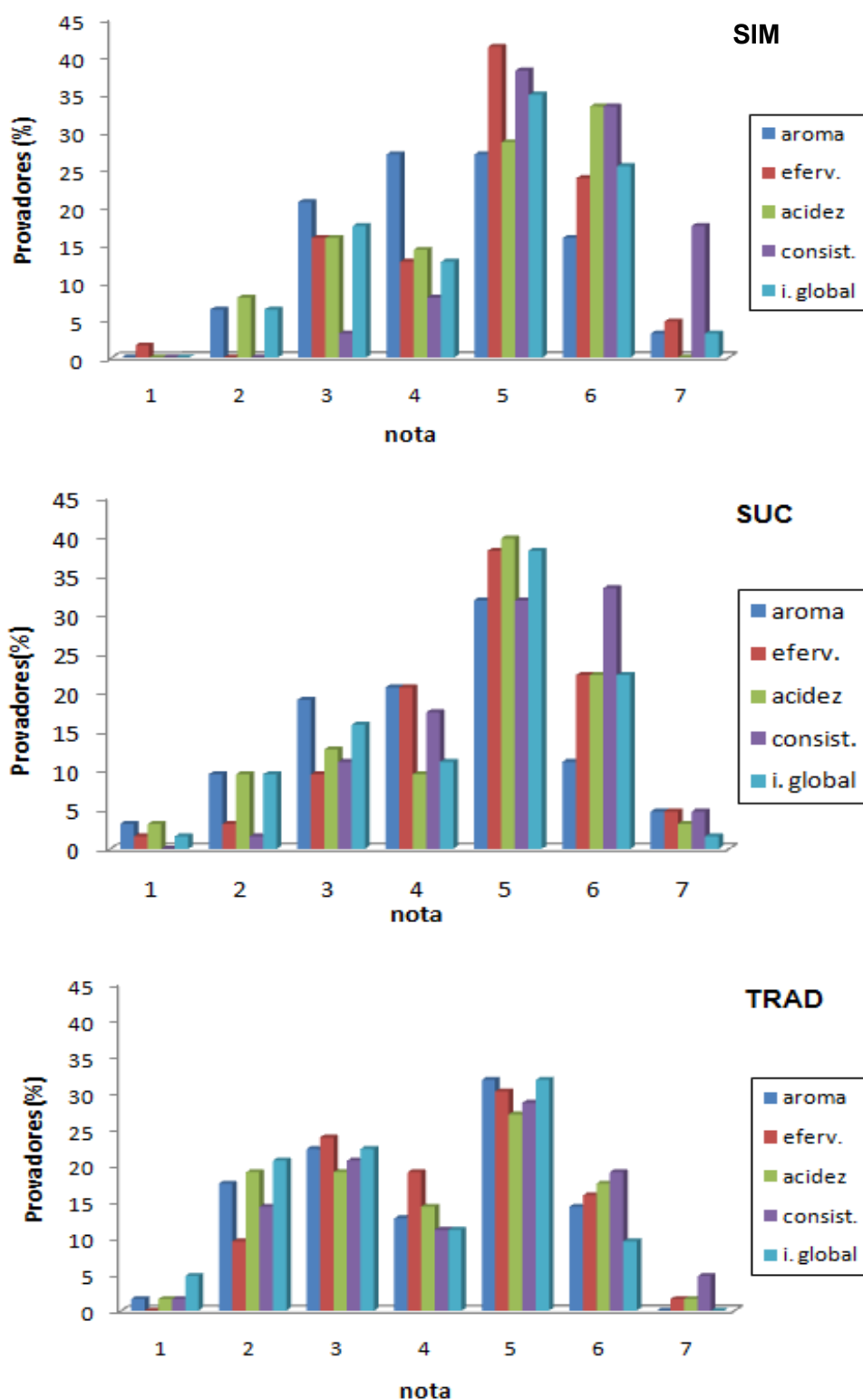


Figura 24: Histograma de frequência de notas para os atributos aroma, efervescência, acidez e consistência e para a impressão global referente às amostras de kefir SIM, SUC e TRAD, respectivamente. Parâmetros avaliados por meio de escala hedônica de sete pontos na qual 1 = desgostei extremamente, 4 = não gostei, nem desgostei e 7 = gostei extremamente. TRAD= kefir obtido pelo método tradicional (grão); SIM= kefir

obtido pelo método com cultura iniciadora por fermentação simultânea; SUC= kefir obtido pelo método com cultura iniciadora por fermentação sucessiva.

Para facilitar a interpretação desses resultados, foram somadas as frequências dos valores hedônicos quanto à impressão global das três formulações de kefir das regiões de rejeição (notas de 1 a 3) e de aceitação (notas de 5 a 7), excluindo-se a região de indiferença (nota 4). Novas variáveis foram geradas e denominadas percentual de rejeição (%R) e percentual de aprovação (%A), respectivamente, as quais são apresentadas na Figura 25. A análise dessa figura evidencia a segmentação dos provadores em dois grupos em relação à amostra TRAD, sendo o percentual de notas de aceitação e rejeição atribuídas a esta amostra muito semelhante. Contudo, observa-se uma maior porcentagem de rejeição (54%) desta amostra por parte dos consumidores.

As amostras SIM e SUC foram as mais aceitas com percentuais de 73% e 70%, respectivamente, de acordo com o representado na Figura 25, o que parece sugerir uma maior aceitação pelos consumidores das amostras de kefir produzidas com a cultura iniciadora.

Estes resultados são concordantes com aqueles apresentados por DUTSCHAEVER et al. (1988). Em seu estudo, no entanto, o kefir SUC foi o mais aceito pelos provadores, sendo descrito como a amostra de sabor mais próximo do kefir produzido pelo método tradicional (grãos). No presente estudo, o sabor não foi avaliado isoladamente pelos consumidores e sim em conjunto com as outras características sensoriais de aparência, aroma e textura no parâmetro impressão global, enquanto os atributos aroma, efervescência, acidez e consistência foram analisados separadamente pelos consumidores.

Pode-se considerar que o produto teve uma boa aceitação pelos consumidores, uma vez que mais da metade dos provadores nunca havia experimentado kefir anteriormente, aliado ao fato desse produto ser diferente dos demais leites fermentados disponíveis no mercado brasileiro por conter gás carbônico e etanol.

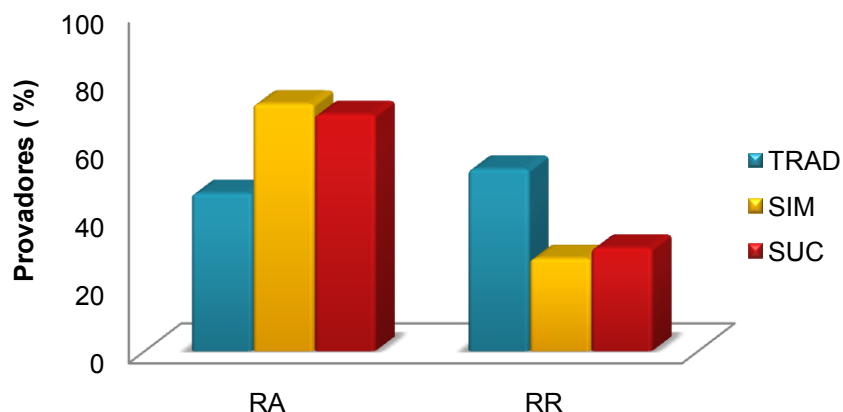


Figura 25: Histograma de freqüência das porcentagens de aprovação e rejeição quanto à aceitação global das três amostras de kefir. RR: região de rejeição (notas de 1 a 3); RA: região de aceitação (notas de 5 a 7). Parâmetros avaliados por meio de escala hedônica de sete pontos na qual 1 = desgostei extremamente, 4 = não gostei, nem desgostei e 7 = gostei extremamente. TRAD= kefir obtido pelo método tradicional (grão); SIM= kefir obtido pelo método com cultura iniciadora por fermentação simultânea; SUC= kefir obtido pelo método com cultura iniciadora por fermentação sucessiva.

As amostras SIM e SUC também foram as mais aceitas pelos consumidores em relação ao atributo efervescência com porcentagens de aceitação de 80% e 82%, respectivamente, de acordo com o representado na Figura 26. DUITSCHAEVER et al. (1988) e BESHKOVA et al. (2002) também caracterizaram as amostras de kefir SIM e SUC como contendo boa efervescência e o kefir TRAD como menos efervescente.

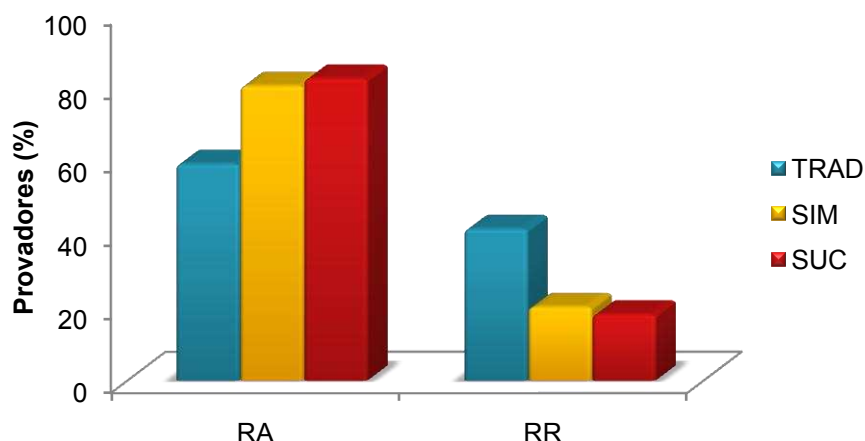


Figura 26: Histograma de freqüência das porcentagens de aprovação e rejeição em relação ao atributo efervescência das três amostras de kefir. RR: região de rejeição (notas de 1 a 3); RA: região de aceitação (notas de 5 a 7). Parâmetros avaliados por meio de escala hedônica de sete pontos na qual 1 = desgostei extremamente, 4 = não gostei, nem desgostei e 7 = gostei extremamente. TRAD= kefir obtido pelo método tradicional (grão); SIM= kefir obtido pelo método com cultura iniciadora por fermentação simultânea; SUC= kefir obtido pelo método com cultura iniciadora por fermentação sucessiva.

Diferenças encontradas entre os dados do presente estudo e aqueles conduzidos por DUITSCHAEVER et al. (1988) e BESHKOVA et al. (2002) podem ser explicadas pelo fato de as culturas iniciadoras utilizadas na produção das amostras de kefir não serem formadas pelos mesmos micro-organismos, resultando em produtos com propriedades sensoriais diferentes, bem como pelo fato dos provadores possuírem hábitos alimentares diferentes dos consumidores brasileiros.

A análise estatística dos dados oriundos de testes afetivos é, tradicionalmente, feita por meio de ANOVA e Testes de Comparação de Médias. Quando existem grupos de consumidores com comportamento diferenciado no teste de aceitação as médias obtidas, muitas vezes, não apresentam diferença ($p \geq 0,05$) entre si. Uma vez que foi considerado que o critério de aceitação dos consumidores era homogêneo, os valores obtidos desta forma muito provavelmente podem não refletir a média real. Por esta razão, a variabilidade individual dos dados deve também ser considerada e a estrutura dos dados analisada. Tais análises podem ser realizadas pela ferramenta estatística

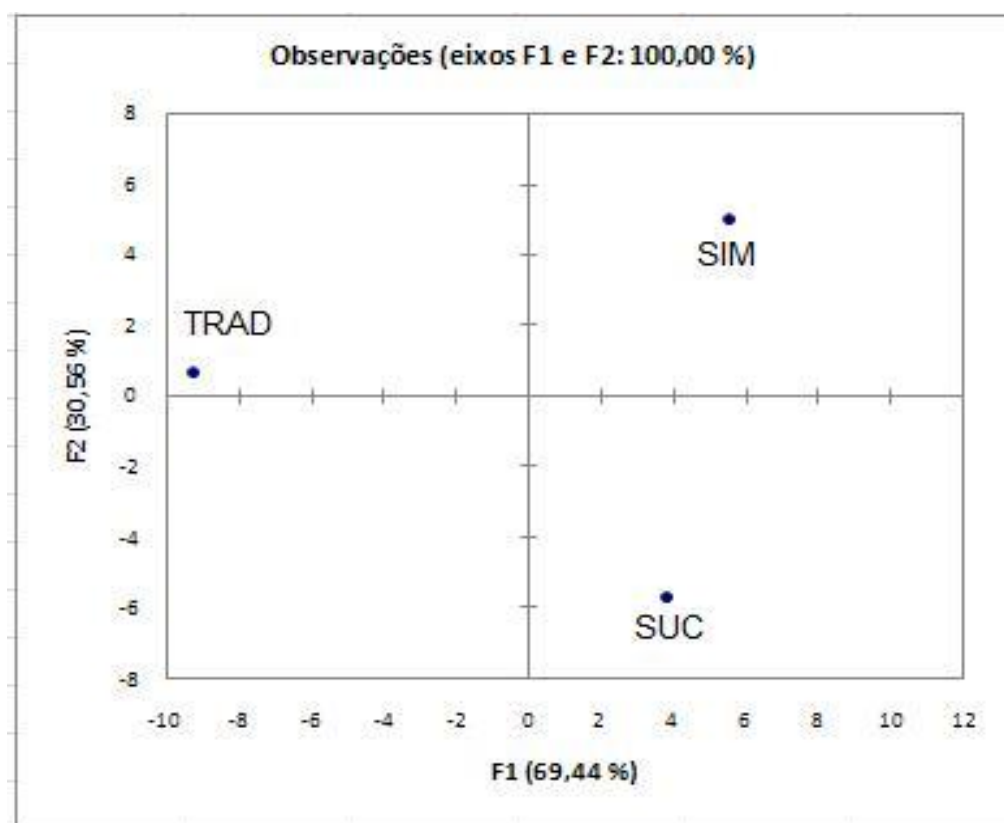
multivariada denominada Mapa Interno da Preferência (GREENHOFF & MacFIE, 1994; CARDELO & FARIA, 2000).

O Mapa Interno da Preferência mostrado na Figura 27 apresenta a posição das amostras de kefir em relação à impressão global pelos consumidores (A) e a posição dos consumidores que avaliaram as três amostras quanto à impressão global (B).

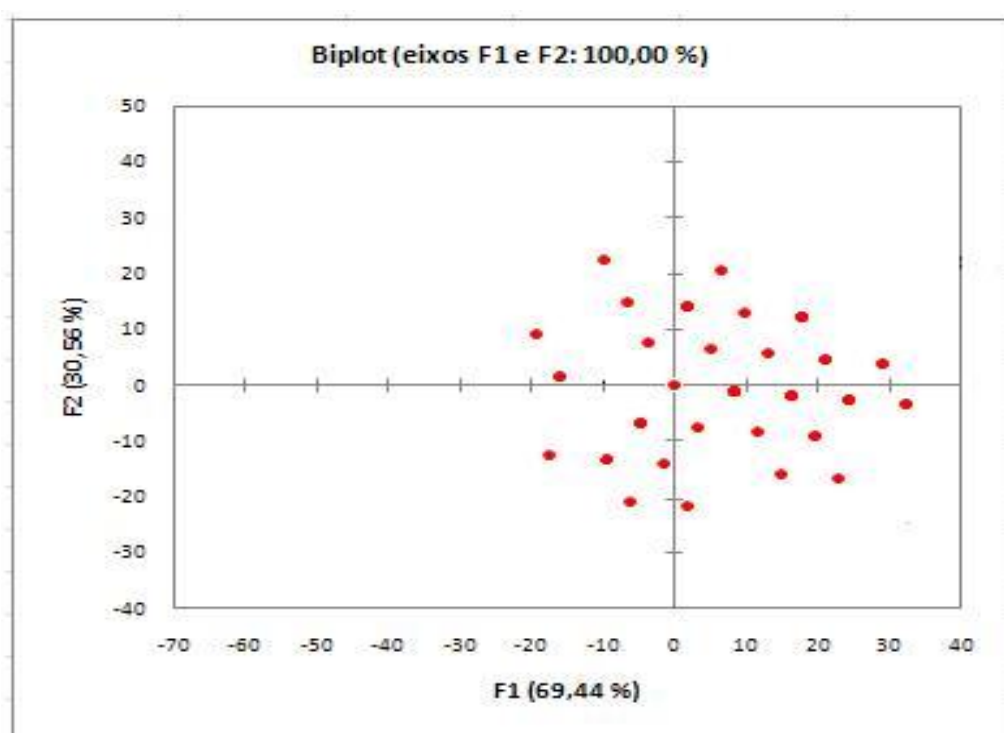
A primeira dimensão explica 69,44% da variabilidade total dos dados e a segunda, 30,56%, portanto as duas explicam 100% da variância total dos dados de aceitação quanto à impressão global.

A separação espacial das amostras de kefir representada na Figura 27A evidencia que as três amostras encontram-se bem separadas no espaço delimitado pelas duas dimensões, sugerindo aceitação distinta por parte dos consumidores. A primeira dimensão separou as amostras SIM e SUC do kefir TRAD, enquanto a segunda separou as amostras TRAD e SIM do kefir SUC. Na Figura 27B cada um dos consumidores é representado por um ponto. É possível observar que houve maior concentração de consumidores nos quadrantes superior e inferior direitos do MIP, o que indica que as amostras de kefir SIM e SUC foram aceitas por um maior número de indivíduos, provavelmente devido ao fato de serem as amostras mais ácidas.

Os resultados obtidos pelo emprego da ferramenta estatística do Mapa Interno da Preferência reforçam aqueles originados do tratamento estatístico dos dados de aceitação por ANOVA, Teste de Comparação de Médias de Tukey e Histograma de frequência.



A – Posição das amostras de kefir



B – Posição dos consumidores.

Figura 27: Representação gráfica das dimensões 1 e 2 do Mapa Interno da Preferência para as três amostras de kefir em relação à impressão global.

4.5.2 Teste de Intenção de compra

Na Tabela 14 são apresentados os resultados do teste de intenção de compra das amostras de kefir obtidas por três diferentes métodos de produção. Os resultados revelaram que as amostras SIM e SUC não apresentaram diferença ($p \leq 0,05$) entre si, mas diferiram da amostra TRAD. As médias de intenção de compra encontraram-se no intervalo entre “talvez comprasse, talvez não comprasse” (nota 3) e “possivelmente compraria” (nota 4) para as amostras SIM e SUC e no intervalo entre “possivelmente não compraria” (nota 2) e “talvez comprasse, talvez não comprasse” (nota 3) para a amostra TRAD.

Tabela 14: Médias das notas de intenção de compra para as três formulações de kefir.

amostras	Intenção de compra*
TRAD**	2,51 ^b
SIM***	3,17 ^a
SUC****	3,06 ^a

^{a,b} Médias com letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

*Parâmetro avaliado por meio de escala de cinco pontos na qual 1 = certamente não compraria, 3 = talvez comprasse, talvez não comprasse e 5 = certamente compraria.

**TRAD= kefir obtido pelo método tradicional (grão).

***SIM= kefir obtido pelo método com cultura iniciadora por fermentação simultânea.

****SUC= kefir obtido pelo método com cultura iniciadora por fermentação sucessiva.

Observando-se a Figura 28, é possível verificar que os percentuais de intenção de compra positiva das duas amostras SIM (59%) e SUC (58%) foram muito semelhantes, ratificando os resultados observados no teste de aceitação no qual não foram encontradas diferenças significativas ($p \geq 0,05$) na aceitação quanto ao aroma, à efervescência, à acidez e à impressão global das amostras produzidas pelas fermentações simultânea e sucessiva. O kefir TRAD foi o que recebeu maior porcentagem de intenção de compra negativa (73%), sendo também o menos aceito em relação à efervescência, consistência e impressão global.

A atitude dos consumidores observada neste estudo indica que, se os produtos fossem comercializados, a maioria dos consumidores seria favorável à aquisição do kefir SIM e do kefir SUC, conforme mostra Figura 28.

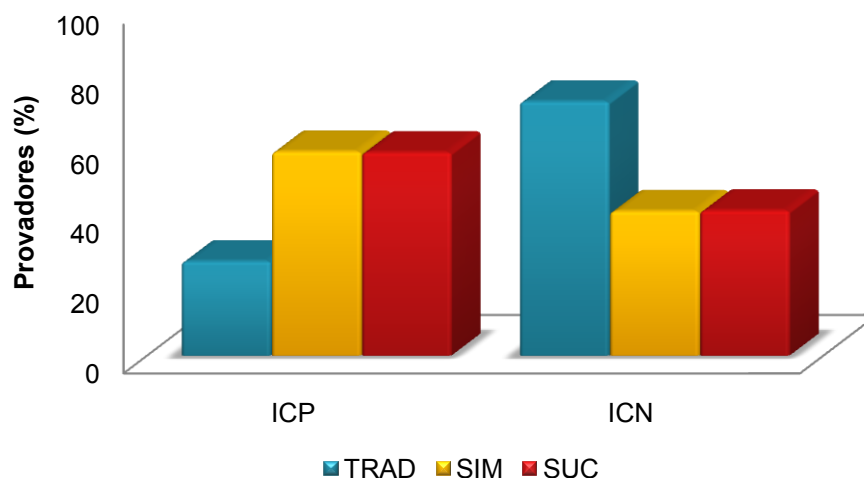


Figura 28: Porcentagens de intenção de compra positiva e negativa no teste de intenção de compra para as três amostras de kefir. ICP: intenção de compra positiva (notas 4 e 5); ICN: intenção de compra negativa (notas 1 e 2). TRAD= kefir obtido pelo método tradicional (grão); SIM= kefir obtido pelo método com cultura iniciadora por fermentação simultânea; SUC= kefir obtido pelo método com cultura iniciadora por fermentação sucessiva.

Como um dos objetivos do presente estudo era avaliar o melhor método de processamento do kefir, não foram adicionados nenhum tipo de aromatizante, espessante ou conservante às formulações para que estes aditivos não interferissem na avaliação do consumidor.

Estudos realizados por MARSHALL & COLE (1985), entretanto, mostraram que a adição do sabor morango ao kefir natural elevou a média de intenção de compra de 3,4 (escala 1-6) para 5,3 (escala 2-7) possivelmente porque os leites fermentados são freqüentemente adoçados e/ou saborizados com morango na Inglaterra.

A adição de frutas, açúcar em maiores concentrações ou aromatizantes provavelmente elevaria as notas de intenção de compra das amostras de kefir conforme dados coletados nos questionários respondidos pelos consumidores, mostrado na

Figura 29. A adição de gelatina, leite em pó, concentrado protéico de soro (CPS) ou polióis (matodextrina, sorbitol) foi sugerida para aumentar a consistência das amostras SUC e TRAD.

Ainda que o teste afetivo de intenção de compra realizado em laboratório limite a significância dos resultados apenas aos consumidores participantes do teste, a análise dos resultados sugere que as amostras SIM e SUC, obtidas por cultura iniciadora podem ser comercialmente viáveis, uma vez que a ambas foram atribuídos percentuais de intenção de compra positiva significativos.

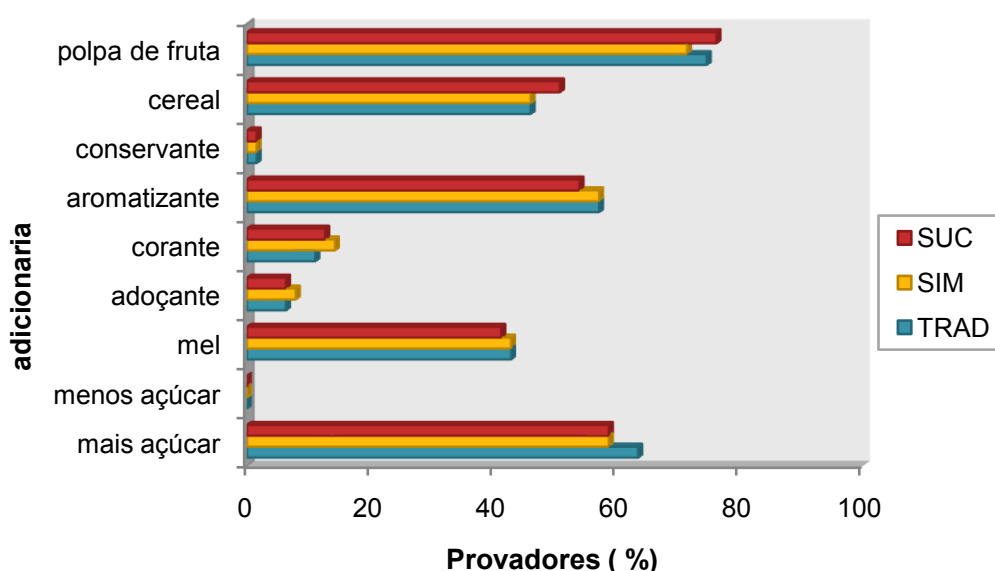


Figura 29: Modificações sugeridas às três formulações de kefir pelos consumidores.

4.6 Avaliação da composição centesimal das amostras de kefir

A composição centesimal das amostras de kefir obtidos pelos três métodos de produção é apresentada na Tabela 15. Observa-se diferença significativa entre as amostras de kefir com relação ao teor de umidade, proteínas, lactose e valor calórico.

Não foi encontrada diferença significativa entre o teor de umidade das amostras TRAD e SIM, as quais diferenciaram significativamente da amostra SUC que apresentou maior teor de umidade. Estes resultados corroboram com os dados de sinérese e viscosidade obtidos no presente estudo, sendo a amostra SUC a de maior umidade, menor viscosidade e maior sinérese.

Os teores de umidade obtidos nas três formulações do kefir ficaram próximos dos valores encontrados por GARROTE et al. (2001) (79,3 a 83,8%) e OTLES & CAGINDI (2003) (87,5%).

Tabela 15: Composição centesimal e valor calórico das amostras de kefir obtida pelos três métodos de produção.

Amostras	composição centesimal (g/100g)						Kcal (g/100g)
	umidade	cinzas	lipídios	proteínas	carboidratos	lactose	
kefir TRAD	85,39 ^b	0,72 ^a	3,0 ^a	2,77 ^a	8,12 ^a	ND*	70,56 ^a
kefir SIM	85,52 ^b	0,69 ^a	3,0 ^a	1,95 ^b	8,84 ^a	3,97 ^a	70,17 ^a
kefir SUC	86,55 ^a	0,72 ^a	3,0 ^a	2,06 ^b	7,67 ^a	2,84 ^b	65,92 ^b

^{a, b} Médias na mesma coluna seguidas pela mesma letra não são significativamente diferentes (Tukey $p \leq 0,05$).

*ND, não determinado.

Não houve diferença significativa entre as três amostras de kefir em relação ao teor de cinzas e lipídios, indicando possivelmente que os diferentes métodos empregados na fabricação do kefir não influenciaram as porcentagens de sais minerais totais e gordura do produto.

O teor de gordura encontrado em todas as amostras foi 3,0% como esperado, por se tratar de produtos preparados com matéria-prima integral. Resultados semelhantes foram obtidos por MERIN & ROSENTHAL (1986) (3,13 a 3,19%), OTLES & CADINGI (2003) (3,5%) e TERRA (2007) (3,2%) que também utilizaram leite UHT integral como matéria-prima para produzir kefir.

Os teores de cinzas obtidos estão próximos dos valores encontrados em kefir obtido de grão como de cultura iniciadora por ASSADI et al. (2000) (0,75 a 0,86%) e por SARKAR (2007) (0,7%). Estes resultados também foram semelhantes aos valores apresentados por RODAS et al. (2001) (0,60 a 0,77%) que analisaram oito marcas comerciais de iogurte com frutas e ligeiramente superior aos teores encontrados na bebida láctea (0,65%) e no leite fermentado (0,60%), adicionado de probióticos, desenvolvidos por CUNHA et al. (2008).

Analisando os teores de proteínas, pode-se notar que a amostra TRAD, obtida do grão de kefir, diferenciou estatisticamente das amostras obtidas por cultura iniciadora e apresentou maior teor de proteínas. A composição do grão de kefir justificaria este resultado, pois segundo SARKAR (2007) o grão é composto por 4,5% de proteína.

Embora os teores de proteínas obtidos por ASSADI et al. (2000) foram inferiores aos valores do presente estudo (1,36 a 1,66%), os autores também encontraram maior valor protéico no kefir obtido do grão de kefir. Outros autores encontraram valores entre 2,9 e 3,3% de proteína (MERIN & ROSENTHAL, 1986; OTLES & CAGINDI, 2003; SARKAR, 2007; TERRA, 2007).

Apesar de os valores protéicos obtidos neste estudo estarem dentro da variação permitida pela literatura, o teor de proteínas das amostras de kefir encontra-se em um patamar inferior ao limite mínimo de 2,9 g/100g estabelecido pela legislação de leites fermentados (BRASIL, 2007). Porém, a simples adição de leite em pó a formulação corrigiria tal fato.

Na análise de carboidratos totais, não foi observada diferença entre as amostras obtidas por cultura iniciadora e pelo grão. Podendo inferir que os métodos de fabricação do kefir não tiveram efeitos sobre o percentual de carboidratos nas amostras. Os valores obtidos foram semelhantes aos encontrados por GARROTE et al. (2001) (7,8 a 8,9%) e inferior aos obtidos nas bebida láctea (13,29%) e leite fermentado (13,00%) por CUNHA et al. (2008).

Em relação ao teor de lactose, as amostras SIM e SUC foram consideradas estatisticamente diferentes entre si. A amostra SUC foi a que apresentou menor percentual de lactose. Isto indica que os processos tecnológicos de obtenção do kefir foram determinantes no teor de lactose dos produtos. Verifica-se também que o método com cultura iniciadora por fermentação sucessiva resultou em um leite fermentado com menor teor de lactose, o que pode ser mais indicado para pessoas com má absorção de lactose.

Provavelmente, o processo por fermentação sucessiva, fermentação láctica seguida pela fermentação alcoólica, favoreceu uma maior atividade da enzima β -galactosidase no kefir em relação ao processo simultâneo.

Produtos lácteos fermentados e leite com baixo teor de lactose têm sido recomendados para pessoas com intolerância à lactose. FERRONATO et al. (2004) avaliaram os teores de lactose em iogurtes e leites fermentados comerciais como subsídio para orientação nutricional de pacientes com intolerância à lactose e constataram que esses produtos apresentaram em média 30% menos lactose que o leite. Eles indicaram que iogurtes e leites fermentados podem ser tolerados por pessoas que possuem má absorção de lactose, mas não pelos intolerantes à lactose.

Em adição, HOLSINGER e KLIGERMAN (1991) afirmaram que os sintomas da intolerância podem ser eliminados quando a lactose é reduzida em 70%, chegando-se

a um valor calculado em aproximadamente 1,23% de lactose quando 220 mL de produto lácteo é consumido.

Estudos realizados por HERTZLER et al. (1996) mostraram que indivíduos maldisgestores de lactose podem ser capazes de tolerar alimentos contendo até 6g de lactose ou menos por porção. Sendo assim, todas as formulações de kefir seriam indicadas para indivíduos com má absorção de lactose, porém em proporções diferentes. Então, segundo estes autores seria recomendado até 150g de kefir SIM e 211g de kefir SUC para esses indivíduos.

Os resultados obtidos nas amostras SIM e SUC foram próximos dos valores de 3,02 a 4,75 % encontrados pela maioria dos autores (MERIN & ROSENTHAL, 1986; OTLES & CAGINDI, 2003; IRIGOYEN et al., 2005; TERRA, 2007), exceto ASSADI et al. (2000) que encontraram valores inferiores ao do presente estudo (1,10 a 1,45%).

Os teores de lactose das amostras obtidas por cultura iniciadora foram inferiores ao teor de lactose presente em leite UHT integral (WALSTRA & JENNESS, 1984) (4,60%) e próximo ou inferior ao teor de lactose presente em iogurte natural (LONGO, 2006) (3,69%), sendo, portanto, produtos apropriados para indivíduos com má absorção de lactose.

Quanto ao valor calórico, não houve diferença entre as amostras TRAD e SIM que por sua vez diferenciaram significativamente da amostra SUC. O menor valor calórico atribuído a amostra SUC possivelmente deve-se ao maior valor de umidade juntamente com o menor teor de carboidratos encontrado nesta amostra, já que o teor de gordura obtido nas três formulações foram os mesmos.

Os valores calóricos obtidos estão de acordo com o valor médio encontrado por OTLES & CAGINDI (2003) (65Kcal/100g) em kefir e também dentro dos limites verificado por MUSAIGER et al. (1998) (55 a 106Kcal/100 g) em iogurtes comerciais integrais.

5 RESUMO DOS RESULTADOS E CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho podem ser resumidos como a seguir:

- Nas três amostras de kefir tradicional utilizadas, as BAL apresentaram níveis populacionais médio variando de 8,69 a 8,88 log UFC/mL (mínimo de 7,30 e máximo de 9,48 log UFC/mL) dependendo do meio de enumeração (MRS ou M17), enquanto as leveduras apresentaram níveis de 6,98 log UFC/mL.
- Das três amostras de kefir tradicional utilizadas, foram isoladas 22 linhagens de BAL e cinco linhagens de leveduras. Dentro das BAL, os cocos foram mais frequentemente isolados no M17 e os bastonetes no MRS.
- As identificações das BAL por kit API, PCR-ARDRA e seqüenciamento deram resultados relativamente conflitantes e os dados do seqüenciamento, considerados como os mais confiáveis, mostraram a presença de quatro linhagens de *Lactococcus lactis* (três sub-espécies *lactis* e uma sub-espécie *cremoris*), duas linhagens de *Lactobacillus casei* e duas linhagens de *Leuconostoc mesenteroides*. Os níveis populacionais de *Lactococcus* (9,21 log UFC/ml) foram mais elevados do que de *Lactobacillus* (7,93 log UFC/ml) e *Leuconostoc* (8,14 log UFC/ml).
- A identificação molecular das leveduras mostrou a presença de duas linhagens de *Kazachstania unispora*, duas linhagens de *Torulaspora delbrueckii* e uma linhagem de *Sacharomyces cerevisae*.
- Uma cultura iniciadora foi desenvolvida na base dos dados microbiológicos apresentados acima, que continha seis micro-organismos (*Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, *Lactobacillus casei*, *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides*, *Kazachstania unispora* e *Torulaspora delbrueckii*) para ser inoculada em dois processos de fermentação simultânea (SIM) e sucessiva (SUC) que foram comparados com um processo tradicional (TRAD) de produção de kefir.

- A comparação das determinações físico-químicas entre os três produtos (TRAD, SIM, SUC) mostrou variações, com maior viscosidade e menor sinérese para o produto SIM.
- A comparação das determinações microbiológicas entre os três produtos (TRAD, SIM, SUC) mostrou níveis populacionais de BAL e leveduras basicamente similares entre os três produtos.
- A comparação das determinações de composição centesimal entre os três produtos (TRAD, SIM, SUC) mostrou variações, com maior quantidade de proteínas no produto TRAD e menor teor de lactose no produto SUC.
- A avaliação sensorial dos três produtos (TRAD, SIM, SUC) mostrou variações, com maior aceitação para os produtos SIM e SUC, em particular para o kefir SIM.

O método de produção de kefir com cultura iniciadora por fermentação simultânea é o mais indicado para a fabricação do produto, uma vez que à amostra de kefir SIM foram atribuídas médias de aceitação elevadas em relação ao aroma, efervescência, acidez e impressão global, a maior média ($p \leq 0,05$) quanto à consistência, percentual elevado de intenção de compra positiva e observada menor sinérese.

Os resultados apresentados acima permitem concluir que a produção de kefir com cultura iniciadora apresenta-se como uma possibilidade para as indústrias lácteas de produzir um novo leite fermentado com melhor controle e regularidade na produção e, conseqüentemente, a introdução desse produto na alimentação dos brasileiros. Dentro dessa possibilidade de uso de cultura iniciadora, o produto SIM mostrou-se o mais adequado.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar efeito probiótico da cultura iniciadora formulada.
- Validar métodos analíticos para determinação de etanol e CO₂ em leites fermentados.
- Analisar os compostos voláteis e determinar o teor de vitaminas do produto.
- Estudar a adição de espessantes e aromas à formulação.
- Estudar a vida -de -prateleira do kefir.
- Determinar os custos de fabricação e teste do kefir em escala piloto.
- Realizar estudo de embalagem.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM, A.G.; DE ANTONI, G.L. Characterization of kefir grains in cow's milk and in soya milk. *Journal of Dairy Research*, v. 66, p. 327-333, 1999.
- ALANDER, M.; SATOKARI, R.; KORPELA, R.; SAXELIN, M.; VILPPONEN-SALMELA, T.; MATTILA-SANDHOLM, T.; VON WRIGHT, A. Persistence of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG, after oral consumption. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, p. 351-354, 1999.
- ALM, L. Effect of fermentation on lactose, glucose, and galactose content in milk and suitability of fermented milk products for lactose intolerant individuals. *Journal of Dairy Science*, v. 65, p. 346-352, 1982.
- ALM, L. The effect of fermentation on the biological value of milk proteins evaluated using rats. A study on Swedish fermented milk products. *Journal of Science of Food and Agriculture*, v. 32, p. 1247-1253, 1981.
- AMPE, F.; BEN OMAR, N.; MOIZAN, C.; WACHER, C.; GUYOT, J-P. Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in Mexican Pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 65, p. 5464-5473, 1999.
- ANGULO, L.; LOPEZ, E.; LEMA, C. Microflora present in kefir grains of the Galician region (North-West of Spain). *Journal of Dairy Research*, v.60, p-263-267, 1993.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). *Official methods of analysis of the Association Official Analytical Chemists*. v. 2. 16th ed. Arlington: A.O.A.C., 1995.
- AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A. *Biotechnologia industrial*. São Paulo: Ed.Blücher, 2001. v. 4, 523 p.
- ASSADI, M.M.; POURAHMAD, R.; MOAZAMI, N. Use of isolated kefir starter cultures in kefir production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 16, p. 541-543, 2000.
- BARROS, M. R., Identificação e avaliação in vitro da atividade inibitória de *Lactobacillus spp.*, isolados do ingluvío e cecos de aves (*Gallus gallus*, Linnaeus, 1758), em relação a sorotipos de *Salmonella*. Dissertação. UNESP. Botucatu, SP. 2003.

- BEHRENS, J. H.; SILVA, M. A. P.; WAKELING, I. N. Avaliação da aceitação de vinhos brancos varietais brasileiros através de testes sensoriais afetivos e técnica multivariada de mapa de preferência interno. *Ciênc. Tecnol. Alimentos*, Campinas, v.19, n. 2, mai/ago. 1999.
- BESHKOVA, D. M.; SIMOVA, E. D.; FRENGOVA, G. I.; SIMOV, Z. I.; DIMITROV, Zh. P. Production of volatile aroma compounds by kefir starter cultures. *International Dairy Journal*, v.13, p. 529-535, 2003.
- BESHKOVA, D.M.; SIMOVA, E.D.; SIMOV, Z.I.; FRENGOVA, G.I.; SPASOV, Z.N. Pure cultures for making kefir. *Food Microbiology*, v. 19, p. 537-544, 2002.
- BOSCH, A.; GOLOWCZYC, M. A.; ABRAHAM, A. G.; GARROTE, G. L.; ANTONI, G. L. D.; YANTORNO, O. Rapid discrimination of lactobacilli isolated from kefir grains by FT-IR spectroscopy. *International Journal of Food Microbiology*, v. 111, p. 280-287, 2006.
- BRANDÃO, S.C.C. Novas gerações de produtos lácteos funcionais. *Indústria de Laticínios*, São Paulo, v. 6,n. 37, p. 64-66, 2002.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 68 de 12/12/2006. Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos para Controle de Leite e Produtos Lácteos. Brasília, 2006.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa n.46, 23 de Outubro de 2007. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. *Diário Oficial*, Brasília, 24 Outubro 2007, seção 1, p. 5.
- CARDELLO, H. M. A. B.; FARIA, J. B. Análise da aceitação de aguardentes de cana por testes afetivos e mapa de preferência interno. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 20, n.1, p. 32-36, 2000.
- CERNA, J.; HRABOVA, H. Possibilities of biological enrichment of fermented milk beverage with vitamins. *XXI Int. Dairy Congr.*, 1, Book-1, Mir Pub., Moscow, p. 278-279, 1982 apud SARKAR, S. Potencial of kefir as a dietetic beverage – a review. *British Food Journal*, v. 109, p. 280-290, 2007.
- CHEN, S.L.; CHIGER, M. Production of baker's yeast. In: Comprehensive biotechnology: the principles, applications and regulations of biotechnology in industry, agriculture and medicine. New York: Pergamon Press, 1985. v. 3: *The practice of biotechnology: current commodity products*, p.429-461.

- CHEN, T.-H.; WANG, S.-Y.; CHEN, K.-N.; LIU, J.-R.; CHEN, M.-J. Microbiological and chemical properties of kefir manufactured by entrapped microorganisms isolated from kefir grains. *Journal of Dairy Science*, v. 92, p. 3002-3013, 2009.
- CHR. HANSEN. A utilização de culturas probióticas em produtos lácteos. *Informativo HA-LA Biotec*, 2007.
- CLEMENTI, F.; GOBBETTI, M.; ROSSI, J. Carbon dioxide synthesis by immobilized yeast cells in kefir production. *Milchwissenschaft*, v. 44, p. 70-74, 1989.
- CRISPIM, S. M. Bactérias do ácido láctico recuperadas de “massa de puba”: quantificação, isolamento, identificação molecular e pesquisa de substâncias antagonistas. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. 2008. 64 p. (Dissertação, Mestrado em Microbiologia).
- CRUEGER, W.; CRUEGER, A. *Biotecnologia: manual de microbiologia industrial*. Zaragoza: Acribia, 1993, 392 p.
- CUNHA, T. M.; CASTRO, F. P.; BARRETO, P. L. M.; BENEDET, H. D.; PRUDENCIO, E.S. Avaliação físico-química, microbiológica e reológica de bebida láctea e leite fermentado adicionados de probióticos. *Ciências Agrárias*, Londrina, v. 29, n. 1, p. 103-116, jan./mar. 2008.
- CZAMANSKI, R.T.; GRECO, D.P.; WIEST, J.M. Evaluation of antibiotic activity in filtrates of traditional kefir. *Higiene Alimentar*, v.18, p. 75-77, 2004.
- DE ANGELIS, R. C. *Fisiologia da nutrição: fundamentos para nutrição e desnutrição*. São Paulo: EDART/EDUSP, 1977, v. 1.
- DE MARTINIS, E.C.P. Identification of meat isolated bacteriocin- producing lactic acid bacteria using biotyping and ribotyping. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 54, p. 659-661, 2002.
- DE VRESE, M.; KELLER, B.; BARTH, C.A. Enhancement of intestinal hydrolysis of lactose by microbial β -galactosidase (EC 3.2.1.23) of kefir. *British Journal of Nutrition*, v. 67, p. 67-75, 1992.
- DELLAGLIO, F.; FELIS, G.E. Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria. *Current Issue in Intestinal Microbiology*, v. 8, p. 44-61, 2007.
- DIAS, M. M. S. Leite de cabra fermentado adicionado de prebiótico, probiótico e compostos bioativos destinados a idosos. Universidade Federal de Viçosa. 2009. 141 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos).

- DUITSCHAEVER, C.L. What is kefir and how can it be made? *Modern Dairy*, v. 68, p. 18-19, 1989.
- DUITSCHAEVER, C.L.; KEMP, N.; EMMONS, D. Comparative evaluation of five procedures for making kefir. *Milchwissenschaft*, v. 43, p. 343-345, 1988.
- DUITSCHAEVER, C.L.; KEMP, N.; EMMONS, D. Pure culture formulation and procedure for the production of kefir. *Milchwissenschaft*, v. 42, p. 80-82, 1987.
- ENGEL, G.; KRUSCH, U.; TEUBER, M. Microbiological composition of kefir. I. yeasts. *Milchwissenschaft*, v. 41, p. 418-421, 1986.
- FAO/WHO Expert Consultation: "Guidelines for the evaluation of probiotics in food". London, Ontario (Canada), 2002.
- FAO/WHO. Codex Standard for Fermented Milks #243. 2003.
- FARNWORTH, E.R. kefir- a complex probiotic. *Food Science and Technology Bulletin*, v. 2, p. 1-17, 2005.
- FARNWORTH, E.R. The evidence to support health claims for probiotics. *The Journal of Nutrition*, v. 138, p. 1250-1254, 2008.
- FERREIRA, C.L.F. Prebióticos e Probióticos atualização e prospecção. Viçosa, 2003. 206 p.
- FERREIRA, C.L.L. *Produtos lácteos fermentados: aspectos bioquímicos e tecnológicos*. Viçosa: Imprensa Universitária da Universidade Federal de Viçosa, 1987, 94p.
- FERRONATO, D. D. Z.; FARINÃ, L. O.; JORGE, A. S.; COSTA, M. C. D. Avaliação dos teores de lactose em iogurtes e leites fermentados produzidos no Paraná como subsídio para orientação nutricional de pacientes com intolerância à lactose. In: XXI CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 2004, Juiz de Fora. *Anais. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, Juiz de Fora, v. 59, p. 156-159, 2004.
- FIL'CHAKOVA, S.A; KOROLEVA, N.S. The influence of culturing conditions on the composition and microflora of kefir grains. *Mol. Prom.*, v. 5, p. 37, 1997.
- FLEET, G. H. Yeasts in dairy products. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 68, p. 199-211, 1990.
- FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. *Microbiologia dos Alimentos*. São Paulo: Atheneu, 2005.

- FURUKAWA, N.; IYAMA, R.; TAKAHASHI, T.; YAMANAKA, Y. Effect of oral administration of water soluble fraction from kefir grain on antibody production in mice. *Animal Science Technology*, v. 63, p. 428-436, 1992.
- FURUKAWA, N.; MATSUOKA, A.; YAMANAKA, Y. Effects of orally administered yoghurt and kefir on tumor growth in mice. *Journal of the Japanese Society of Nutrition and Food Science*, v. 43, p. 450-453, 1990.
- GARCIA, S.; SOUZA, G.; VALLE, J.L. E. Quefir e sua tecnologia - aspectos gerais. *Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos*, v. 21, n. 2, p. 137-155, 1984.
- GARROTE, G. L.; ABRAHAM, A. G.; DE ANTONI, G. L. Characteristics of kefir prepared with different grain: milk ratios. *Journal of Dairy Research*, v. 65, p. 149-154, 1998.
- GARROTE, G. L.; ABRAHAM, A. G.; DE ANTONI, G. L. Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. *Journal of Dairy Research*, v. 68, p. 639-652, 2001.
- GARROTE, G. L.; ABRAHAM, A. G.; DE ANTONI, G. L. Inhibitory power of kefir: the role of organic acids. *Journal of Food Protection*, v. 63, p. 364-369, 2000.
- GARROTE, G. L.; ABRAHAM, A. G.; DE ANTONI, G. L. Preservation of kefir grains, a comparative study. *Lebensm.-Wiss. u-Technol.*, v. 30, p. 77-84, 1997.
- GOBBETTI, M.; ROSSI, J.; TOBA, T. Batch production of kefir. Analysis of the relationships among the biological components of the system. *Brief Communications and Abstracts of the XXIII International Dairy Congress*, Montreal, Abstract # p740 391, 1990 apud FARNWORTH, E.R. kefir- a complex probiotic. *Food Science and Technology Bulletin*, v. 2, p. 1-17, 2005.
- GOMES, F.P. *Curso de estatística experimental*. 13.Ed. Piracicaba: Universidade de São Paulo, 1990. 468 p.
- GORSKI, D. kefir, 21st century yogurt? *Dairy Foods*, v. 95, p. 49, 1994.
- GREENHOFF, K.; MacFie, H. J. H. Preference mapping in practice. In *Measurement of Food Preferences*, eds. H. J. H. MacFie and D. M. H. Thomson, p. 137-166. Blackie Academic and Professional, Glasgow, 1994.
- GÜVEN, A.; GÜVEN, A.; GÜLMEZ, M. The effect of kefir on the activities of GSH-Px, GST, CAT, GSH and LPO levels in carbon tetrachloride-induced mice tissues. *Journal of Veterinary Medicine*, v. 50, p. 412-416, 2003.

- GUZEL-SEYDIM, Z. B.; SEYDIM, A. C.; GREENE, A. K. Comparison of amino acid profiles of milk, yoghurt and Turkish kefir, *Milchwissenschaft*, v. 58, p. 158-160, 2003.
- GUZEL-SEYDIM, Z. B.; SEYDIM, A. C.; GREENE, A. K. Organic acids and volatile flavor components evolved during refrigerated storage of kefir. *Journal of Dairy Science*, v. 83, p. 275-277, 2000.
- HELGESEN, H.; SOLHEIM, R.; NAES, T. Consumer preference mapping of dry fermented lamb sausages. *Food Quality and Preference*, v. 8, n. 2, p. 97-109, 1997.
- HELLER, K. J. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 73, p. 374-379, 2001.
- HERTZLER, S. R.; HUYNH, B-C. L.; SAVAIANO, D. A. How much lactose is low lactose? *Journal of the American Dietetic Association*, v. 96, n. 3, p. 243-246, 1996.
- HERTZLER, S.R.; CLANCY, S.M. kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. *Journal of the American Dietetic Association*, v. 103, p. 582-587, 2003.
- HOLSINGER, V. H.; KILGERMAN, K. H. Application of lactose in dairy foods and other foods containing lactose. *Food Technology*, v. 45, n. 1, p. 94-95, 1991.
- IAL (Instituto Adolfo Lutz). *Métodos físico-químicos para análise de alimentos*. 4.ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2005. 1018 p.
- IRIGOYEN, A.; ARANA, I.; CASTIELLA, M.; TORRE, P.; IBANEZ, F.C. Microbiological, physicochemical and sensory characteristics of kefir during storage. *Food Chemistry*, v. 90, p. 613-620, 2005.
- IVANOVA, L. N.; BULATSKAYA, A. N.; SILAEV, A. E. Industrial production of kefir for children. *Mol. Prom.*, v. 3, p. 15-17, 1980.
- JAY, J. M. Fermentação e produtos lácteos fermentados. In: JAY, J. M. (6.ed) *Microbiologia de Alimentos*. Porto Alegre: Artmed, 2005. p.131-147.
- KEMP, N. kefir, the champagne of cultured dairy products. *Cultured Dairy Products Journal*, v. 19, p. 29-30, 1984.
- KHAMNAEVA, N. I.; TSYRENOV, V.; GONGOROVA, V. S.; SHALYGINA, A. M. Biosynthesis of biologically active substances in kefir grains. *Mol. Prom.*, v. 4, p. 49, 2000 apud SARKAR, S. Potencial of kefir as a dietetic beverage – a review. *British Food Journal*, v. 109, p. 280-290, 2007.

- KLYAVINYA, L. R. Department for dairy products for children. *Mol. Prom.*, v. 3, p. 11-12, 1980 apud SARKAR, S. Potencial of kefir as a dietetic beverage – a review. *British Food Journal*, v. 109, p. 280-290, 2007.
- KNEATING, K. The role of cultured dairy products in the prevention of stomach cancer. *Culture Dairy Production Journal*, v. 20, p. 13-14, 1985 apud SARKAR, S. Potencial of kefir as a dietetic beverage – a review. *British Food Journal*, v. 109, p. 280-290, 2007.
- KNEIFEL, W.; MAYER, H. K. Vitamin profiles of kefir made from milks of different species. *International Journal of Food Science Technology*, v. 66, p. 423-428, 1991.
- KOROLEVA, N. S. 1988. Technology of kefir and kumys. Page 96 in Bull. 227. *International Dairy Federation*, Brussels, Belgium.
- KOROLEVA, N. S. Products prepared with lactic acid bacteria and yeasts. In: Robinson, R.K (Ed) *Therapeutic properties of fermented milks*. London, UK: Elsevier Applied Sciences Publishers, 1991, p.159-179.
- KOROLEVA, N. S. Special products (kefir, koumiss etc.). *Proceedings of the XXI International Dairy Congress 2*, MirKasra Publication, Moscow, p. 146-152, 1982.
- KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, C. J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 73, p. 331-371, 1998.
- KWAK, H. S.; PARK, S. K.; KIM, D. S. Biostabilization of kefir with a nonlactose-fermenting yeast. *Journal of Dairy Science*, v. 79, p. 937-942, 1996.
- KWAK, N. S.; JUKES, D. J. Functional foods. Part 2: the impact on current regulatory terminology. *Food Control*, v. 12, p. 109-117, 2001.
- LA RIVIÉRE, J. W. M.; KOOIMAN, P.; SCHMIDT, K. kefiran, a novel polysaccharide produced in the kefir grain by *Lactobacillus brevis*. *Archiv fur Mikrobiologie*, v. 59, p. 269-278, 1967.
- LABROPOULOS, A. E.; PALMER, J. K.; LOPEZ, A. Whey protein denaturation of UHT processed milk and its effect on rheology of yogurt. *Journal of Texture Studies*, v. 12, p. 365-374, 1981.
- LACHANCE, M. A.; BOWLES, J. M.; STARMER, W. T.; BARKER, J. S. F. *Kodamaea kakaduensis* and *Candida tolerans*, two new yeast species from Australian *Hibiscus* flowers. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 45, p. 172-177, 1999.

- LATORRE-GARCÍA L., DEL CASTILLO-AGUDO L., POLAINA J. Taxonomical classification of yeasts isolated from kefir based on the sequence of their ribosomal RNA genes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 23, p. 785–791, 2007.
- LEISNER, J.J.; VANCANNEYT, M.; GORIS, J.; CHRISTENSEN, H.; RUSUL, G. Description of *Paralactobacillus selangorensis* gen. nov., sp. nov., a new lactic acid bacterium isolated from chili bo, a Malaysian food ingredient. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. v.50, p. 19-24, 2000.
- LIBUDZISZ, Z.; PIATKIEWICZ, A. kefir production in Poland. *Dairy Industries International*, v. 55, p. 31-33, 1990.
- LIU, J. R.; WANG, S. Y.; LIN, Y. Y.; LIN, C. W. Antitumour activity of milk kefir and soya milk kefir in tumour-bearing mice. *Nutrition and Cancer*, v. 44, p. 183-187, 2002.
- LIUT KEVICIUS, A.; SARKINAS, A. Studies on the growth conditions and composition of kefir grains – as a food and forage biomass. *Dairy Science Abstracts*, v. 66, p. 903, 2004.
- LONGO, G. Influência da adição de lactase na produção de iogurtes. Curitiba: Universidade Federal do Paraná. 2006. 109p. (Dissertação, Mestrado em Tecnologia de Alimentos).
- LORETAN, T.; MOSTERT, J. F.; VILJEON, B. C. Microbial flora associated with South African household kefir. *South African Journal of Science*, v. 99, p. 92-94, 2003.
- MacFIE, H. J. H.; BRATCHELL, N.; GREENHOFF, K. G.; VALLIS, L. V. Designs to balance the effect of order of presentation and first-order carry-over effects in hall tests. *Journal of Sensory Studies*, v. 4, p. 129-148, 1989.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. *Brock Biology of Microorganisms*. 8^o ed. Prentice Hall International, 1997. 986 p.
- MAGALHÃES, K.T.; PEREIRA, G. V.; DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F. Microbial communities and chemical changes during fermentation of sugary Brazilian kefir. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, doi: 10.1007/s11274-009-0294-x, 2010.
- MANUS, L. J. Liquid cultured dairy products. *Cultured Dairy Products Journal*, v. 14, p. 9-14, 1979.

- MARQUINA, D.; SANTOS, A.; CORPAS, I.; MUNOZ, J.; ZAZO, J.; PIENADO, J. M. Dietary influence of kefir on microbial activities in the mouse bowel. *Letters in Applied Microbiology*, v. 35, p.136-140, 2002.
- MARSHALL, V. M.; COLE, W. M. Methods for making kefir and fermented milks based on kefir. *Journal of Dairy Research*, v. 52, p. 451-456, 1985.
- MARTÍN-DIANA, A. B.; JANER, C.; PELÁEZ, C.; REQUENA, T. Development of a fermented goat's milk containing probiotic bacteria. *International Dairy Journal*. v. 13, p. 827-833, 2003.
- MARTINS, F. S.; TIAGO, F. C. P.; BARBOSA, F. H. F.; PENNA, F. J.; ROSA, C. A.; NARDI, R. M. D.; NEVES, M. J.; NICOLI, J. R. Utilização de leveduras como probióticos. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, v. 5, n. 2, 2005.
- MEILGAARD, M.; CIVILLE, G.V.; CARR, B.T. *Sensory evaluation techniques*. 2. ed. Boca Raton, FL: The CRC Press, 1991. P. 174-175.
- MERENSTEIN, D. J.; FOSTER, J.; D'AMICO, F. A randomized clinical trial measuring the influence of kefir on antibiotic-associated diarrhea. *Archives of Pediatric and Adolescent Medicine*, v.163 (8), p. 750-754, 2009.
- MERIN, U.; ROSENTHAL, I. Production of kefir from UHT milk. *Milchwissenschaft*, v. 41, p. 395-396, 1986.
- MESQUIARI, M. Desenvolvimento tecnológico de um sucedâneo de quefir - Iofir®. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. 1999. 142 p. (Dissertação, Mestrado em Ciências de Alimentos).
- MINIM, V. P. R. *Análise Sensorial: Estudos com consumidores*. 1ed. Viçosa: UFV, 2006, 225 p.
- MITUNIEWICZ-MAŁEK A., Dmytrów I. , Jasińska M .Quality of kefir produced using activeflora probiotic. *EJPAU* 12(3), n.05, 2009. Disponível em: <http://www.ejpau.media.pl/volume12/issue3/art-05.html>>. Acesso em: 04 Mai.2010.
- MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v. 3, n.2, p. 99-112, 2006.
- MOREIRA J. L. S.; MOTA R. M.; HORTA M. F. M.; TEIXEIRA S. M. R.; NEUMANN, E.; NICOLI, J. R.; NUNES, A. C. Identification to the species level of *Lactobacillus*

- isolated in probiotic prospecting studies of human, animals or food origin by 16S-23S rDNA restriction profiling. *BMC. Microbiology*, v. 5, p. 5-15, 2005.
- MOTAGHI, M.; MAZAHARI, M.; MOAZAMI, N.; FARKHONDEH, A.; FOOLADI, M.H.; GOLTAPPEH, E. M. kefir production in Iran. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 13, p. 579-581, 1997.
- MUGOCHA, P. T.; TAYLOR, J. R. N.; BESTER, B. H. Fermentation of a composite finger millet-dairy beverage. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 16, p. 341-344, 2000.
- MURASHOVA, A. O.; NOVAKSHONOV, A. A.; UCHAIKIN, U. F. The effectiveness of using bifidokefir for the treatment of severe intestinal infections and the connection of dysbiosis in children. *Dairy of Science Abstracts*, v. 59, p. 42, 1997.
- MUROFUSHI, M., SHIOMI, M.; AIBARA, K. Effect of orally administered polysaccharide from kefir grain on delayed-type hypersensitivity and tumor growth in mice. *Japanese Journal of Medical Science and Biology*, v. 36, p. 49-53, 1983 apud FARNWORTH, E.R. kefir- a complex probiotic. *Food Science and Technology Bulletin*, v. 2, p.1-17, 2005.
- MUROFUSHI, M.; MIZUGUCHI, J.; AIBARA, K.; MATUHASI, T. Immunopotentiative effect of polysaccharide from kefir grain, KGF-C, administered orally in mice. *Immunopharmacology*, v.12, p. 29-35, 1986 apud FARNWORTH, E.R. kefir- a complex probiotic. *Food Science and Technology Bulletin*, v. 2, p.1-17, 2005.
- MUSAIGER, A. O.; AL-SAAD, J. A.; AL-HOOTI, D. S.; KHUNJI, Z. A. Chemical composition of fermented dairy products consumed in Bahrain. *Food Chemistry*, London, v. 61, n. 1/2, p. 49-52, 1998.
- NETO, O. C. C.; OLIVEIRA, C. A. F.; HOTTA, R. M.; SOBRAL, P. J. A. Avaliação físico-química e sensorial do iogurte natural produzido com leite de búfala contendo diferentes níveis de gordura. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 25, p. 448-453, 2005.
- NOMURA, M.; KOBAYASHI, M.; NARITA, T.; KIMOTO-NIRA, H.; OKAMOTO, T. Phenotypic and molecular characterization of *Lactococcus lactis* from milk and plants. *Journal of Applied Microbiology*, v. 101, p. 396-405, 2006.
- OTLES, S.; CAGINDI, O. kefir: a probiotic dairy-composition, nutritional and therapeutic aspects. *Pakistan Journal of Nutrition*, v. 2, p. 54-59, 2003.

- OUWEHAND, A. C.; SALMINEN, S. J. The health effects of cultured milk products with viable and non-viable bacteria. *International Dairy Journal*, v. 8, p. 749-758, 1998.
- OUWEHAND, A.C; SALMINEN, S.; ISOLAURI, E. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 82, p. 279-289, 2002.
- OZER, D.; OZER, B. H. Product of Eastern Europe and Asia. In: ROBINSON, R. K. (Ed.). *Encyclopedia of Food Microbiology*. London: Academic Press, 1999. p. 798-805.
- PARVEZ, S.; MALIK, K. A.; KANG, AH.; KIM, H. Y. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of Applied Microbiology*, v. 100, p. 1171-1185, 2006.
- PETERSSON, H. E.; CHRISTIANSSON, A.; EKElund, K. Making kefir without grains. *Scandinavian Journal of Dairy Technology and Know How*, v. 2, p. 58-60, 1985.
- REA, M.C.; LENNARTSSON, T.; DILLON, P.; DRINAN, F. D.; REVILLE, W. J.; HEAPES, M.; COGAN, M. Irish kefir – like grains: their structure, microbial composition and fermentation kinetics. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 81, p. 83-94, 1996.
- ROBINSON, R. K.; TAMINE, A.Y. Microbiology of fermented milks. In:ROBINSON, R.K. (Ed.) *Dairy Microbiology*. London: Elsevier Applied Science, 1990. p. 291-343.
- ROCZNIAKOVA, B.; KORNACKA, D.; BIELECKA, M. Stimulatory effect of the microflora of kefir grains on the biochemical activity of propionic acid bacteria. *XIX Int. Dairy Congr.*, 1E, p-287-388, 1974 apud SARKAR, S. Potencial of kefir as a dietetic beverage – a review. *British Food Journal*, v. 109, p. 280-290, 2007.
- RODAS, M. A. B.; RODRIGUES, R. M. M. S.; SAKUMA, H.; TAVARES, L. Z.; SGARBI, C. R., LOPES, W. C. C. Caracterização físico-química, histológica e viabilidade de bactérias lácticas em iogurtes com frutas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 21, p. 304-309, 2001.
- ROGINSKI, H. Fermented milks. *The Australian Journal of Dairy Technology*, v. 43, p. 37-46, 1988.
- SALMINEN, S.; OUWEHAND, A.; BENNO, Y.; LEE, Y. K. Probiotics: how should they be defined? *Trends in Food Science and Technology*, v. 10, p. 107-110, 1999.
- SALOFF-COSTE, C.J. kefir. *Danone World Newsletter*, n. 11, 1996.

- SANTOS, A.; SAN MAURO, A.; SANCHEZ, J.; TORRES, M.; MARQUINA, D. The antimicrobial properties of different strains of *Lactobacillus* spp. isolated from kefir. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 26, p. 434-437, 2003.
- SANTOS, P. R. Q. Influência do estado imunológico e da ocorrência de cárie na colonização por espécies e linhagens de *Lactobacillus* da cavidade oral de crianças infectadas pelo HIV. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. 2008. 150 p. (Dissertação, Mestrado em Microbiologia).
- SARKAR, S. Biotechnological innovations in kefir production: a review. *British Food Journal*, v. 110, n. 3, p. 283-295, 2008.
- SARKAR, S. Potencial of kefir as a dietetic beverage – a review. *British Food Journal*, v. 109, p. 280-290, 2007.
- SCHLEIFER, K. H.; LUDWIG, W. Phylogeny of the genus *Lactobacillus* and related genera. *Syst. Appl. Microbiol.*, v.14, p. 461-467, 1995.
- SHOEVEERS, A.; BRITZ, T. J. Influence of different culturing conditions on kefir grain increase. *International Journal of Dairy Technology*, v. 56, p. 183–187, 2003.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C. A.; SILVEIRA, N. F. A. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos, São Paulo: Livraria Varela, 1997. 295 p.
- SILVA, P. H. F.; PEREIRA, D. B. C; OLIVEIRA, L. L; COSTA Jr., L.C.G. *Físico-química do leite e derivados – métodos analíticos*. Juiz de Fora: Oficina de Impressão Gráfica e Editora Ltda, 1997. 190p.
- SIMOVA, E.; BESHKOVA, D.; ANGELOV, A.; HRISTOZOVA, TS.; FRENGOVA, G.; SPASOV, Z. Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 28, p. 1-6, 2002.
- SNEATH, P. H. A.; MAIR, N. S.; SHARPE, M. E.; HOLT, J.G. *Bergey's Manual of systematic bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986. v. 2, p. 1239. In: BARROS, M. R., Identificação e avaliação in vitro da atividade inibitória de *Lactobacillus* spp., isolados do ingluvío e cecos de aves (*Gallus gallus*, Linnaeus, 1758), em relação a sorotipos de *Salmonella*. Dissertação. UNESP. Botucatu, SP. 2003.
- SOUZA, T. C. Produção *in vitro* e *in vivo* de poliaminas por *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2b20 e *Saccharomyces cerevisiae* UFMG 905 em camundongos

- gnotobióticos. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. 2008. 73 p. (Dissertação, Mestrado em Microbiologia).
- STATSOFT STATISTICA FOR WINDOWS. *Computer programa manual*: versão 7.0. Tulsa: Statsoft Inc, 2005.
- STONE, H.; SIDEL, J. L. *Sensory evaluation practices*. 3 ed. San Diego: Academic Press Inc., 2004. 338 p.
- TAMINE, A.Y. Fermented milks: a historical food with modern applications – a review. *European Journal of Clinical Nutrition*. v. 56, p. 2-15, 2002.
- TAMINE, A.Y.; MARSHALL, V. M. E. Microbiology and technology of fermented milks. In: BA Law (Ed.) *Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk*. London: Blackie Academic & Professional, 1997. p. 57-152.
- TAMINE, A.Y.; ROBINSON, R. K. *Yogur: ciência y tecnologia*. Zaragoza: Acribia, 1991, 368 p.
- TANNOCK, G. W.; TILSALA-TIMISJARVI, A.; RODTONG, S.; NG, J.; MUNRO, K.; ALATOSSAVA, T. Identification of *Lactobacillus* isolates from the gastrointestinal tract, silage, and yoghurt by 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region sequence comparisons. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, n. 9, p. 4264-4267, 1999.
- TERRA, F. M. Teor de lactose em leites fermentados por grãos de kefir. Brasília: Centro de Excelência em Turismo da Universidade de Brasília- UnB. 2007. 62 p. (Monografia, Especialidade em Tecnologia de Alimentos).
- THAMER, K. G.; PENNA, Al. B. Caracterização de bebidas lácteas funcionais fermentadas por probióticos e acrescidas de prebiótico. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 26, n. 3, p. 589- 595, 2006.
- TILSALA-TIMISJARVI, A.; ALATOSSAVA, T. Development of oligonucleotide primers from the 16S-23S rRNA intergenic sequences for identifying different dairy and probiotic lactic acid bacteria by PCR. *International Journal of Food Microbiology*, v. 35, p. 49-56, 1997.
- VASELJEVIC, T.; SHAH, N. P. Probiotics – from *Metchnikoff* to bioactives. *International Dairy Journal*, v.18, p. 714-728, 2008.
- VIEGAS, R. P. Leites fermentados probióticos produzidos a partir de bactérias ácido-lácticas e adicionados de concentrado protéico de soro lácteo: características

- físico-químicas, microbiológicas e sensoriais. Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG. 2008. 70p. (Dissertação, Mestrado em Ciência Animal).
- VILJOEN, B. C. The interaction between yeasts and bacteria in dairy environments. *International Journal of Food Microbiology*, v. 69, p. 37-44, 2001.
- VINDEROLA, G.; PERDIGON, G.; DUARTE, J.; FARNWORTH, E.; MATAR, C. Effects of the oral administration of the products derived from milk fermentation by kefir microflora on immune stimulation. *Journal of Dairy Research*, v. 73, p. 472-479, 2006.
- WALSTRA, P.; JENNESS, R. *Química y física lactológica*. Zaragoza: Acribia, 1984. 423p.
- WANG, Y. F.; HUO, G. C.; LIU, L. B. Isolation and identification of the lactic acid bacteria from kefir grains. *China Dairy Industry*, v. 32, p. 17-19, 2004.
- WANG, Y.; XU, N.; XI, A.; AHMED, Z.; ZHANG, B.; BAI, X. Effects of *Lactobacillus plantarum* MA2 isolated from Tibet kefir on lipid metabolism and intestinal microflora of rats fed on high-cholesterol diet. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 84, p. 341-347, 2009.
- WATANABE, K., FUJIMOTO, J., SASAMOTO, M., DUGERSUREN, J., TUMURSUH, T., DEMBEREL, S. Diversity of lactic acid bacteria and yeasts in Airag and Tarag, traditional fermented milk products of Mongolia. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 24, p. 1313-1325, 2008.
- WEBB, B. H.; JOHNSON, A. H.; ALFORD, J. A. Composition of milk products. *Fundamentals of Dairy Chemistry*, CBS Publishers & Distributors, Delhi, p. 64, 1987.
- WITTHUHM, R. C.; CILLIERS, A.; BRITZ, T. J. Evaluation of different preservation techniques on the storage potential of kefir grains. *Journal Dairy Research*, v. 72, p. 125-128, 2005a.
- WITTHUHM, R. C.; SCHOEMAN, T.; BRITZ, T. J. Characterisation of the microbial population at different stages of kefir production and kefir grain mass cultivation. *Journal Dairy Journal*, v. 15, p. 383-389, 2005b.
- WITTHUHM, R.C.; SCHOEMAN, T.; BRITZ, T.J. Isolation and characterization of the microbial population of different South African kefir grains. *International Journal of Dairy Technology*, v. 57, p. 33-37, 2004.

- WYDER, MT., SPILMANN, H., PUHAN, Z. Investigation of the yeast flora in dairy products: a case study of kefir. *Food Technology and Biotechnology*, v. 35, p. 299-304, 1997.
- XLSTAT (2010). *XLSTAT-PRO User's Guide, version 7.5.3*. Addinsoft Inst Inc., NY, USA.
- YARROW, D. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeast. In: KURTZMAN, C.P. & FELL, J.W. (Ed.). *The yeasts: a taxonomic study*. Amsterdam: Elsevier Science B. v. p. 77-100, 1998.
- YÜKSEKDAG, Z.N.; BEYATLI, Y.; ASLIM, B. Determination of some characteristics coccoid forms of lactic acid bacteria isolated from Turkish kefir with natural probiotic. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, v. 37, p. 663–667, 2004.
- ZHOU, J. Z.; LIU, X. L.; HUANG, K. H.; DONG, M. S.; JIANG, H. H. Application of the mixture design to design the formulation of pure cultures in Tibetan kefir. *Agricultural Sciences in China*. v. 6, p. 1383-1389, 2007.

APÊNDICES

Apêndice A - Perfis de identificação para *Lactobacillus* por análise de restrição da região intergênica 16S-23S do rRNA

<i>Sph</i> I	<i>Nco</i> I	<i>Nhe</i> I	<i>Ssp</i> I	<i>Sfu</i> I	<i>Eco</i> RV	<i>Dra</i> I	<i>Vsp</i> I	<i>Hinc</i> II	<i>Eco</i> RI	<i>Hind</i> III	<i>Avr</i> II	IDENTIFICAÇÃO
---	+++	---	---	+-	---	---	---	---	+++	+++	+++	<i>L. acidophilus</i>
+++	---	+++	+++	---	---	---	+++	---	---	---	---	<i>L. agilis</i>
+++	---	---	---	---	---	+++	+++	+-	---	+++	---	<i>L. alimentarius</i>
+++	---	---	---	---	---	+++	+++	++	---	+++	---	<i>L. animalis</i>
+++	---	---	---	---	---	---	+++	---	---	+++	---	<i>L. brevis</i>
+++	---	---	---	+-	+++	+++	---	---	---	+++	---	<i>L. camelliae</i>
---	---	---	---	---	+++	+++	+++	---	---	+++	---	<i>L. casei</i>
+++	+++	---	+++	---	---	---	+++	---	---	---	---	<i>L. coleohominis</i>
---	+++	---	---	+-	+++	---	---	---	+++	+++	+++	<i>L. crispatus</i>
---	+++	---	---	+++	---	---	---	---	---	---	---	<i>L. delbrueckii</i>
+++	+-	---	---	---	---	+++	+++	+-	---	+++	---	<i>L. farciminis</i>
+++	---	---	+++	---	---	---	+++	+++	---	+++	---	<i>L. ferintoshensis</i>
+++	---	+-	---	---	---	---	+++	---	---	---	---	<i>L. fermentum</i>
+++	---	---	+++	---	---	+++	+++	+-	---	+++	---	<i>L. fructivorans</i>
+++	+++	---	---	---	---	---	+++	+-	---	---	---	<i>L. frumenti</i>
---	---	---	---	---	+++	---	---	---	---	+-	+++	<i>L. gasserii</i>
+++	---	---	+++	---	---	---	+++	+++	---	+++	---	<i>L. hilgardii A</i>
+++	---	---	+++	---	---	---	+++	---	---	+++	---	<i>L. hilgardii B</i>
---	---	---	---	---	+++	---	---	---	---	---	---	<i>L. jensenii</i>
---	---	---	---	---	+++	---	---	---	---	+-	---	<i>L. johnsonii</i>
+++	---	---	+++	---	---	---	+++	---	---	---	---	<i>L. mucosae</i>
---	---	---	---	---	---	+++	---	+-	---	+++	---	<i>L. murinus</i>
+++	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	<i>L. nagelli</i>
+++	+++	---	---	---	---	---	+++	---	---	---	---	<i>L. panis</i>
+++	+-	+++	---	+++	+++	+++	---	---	+++	---	---	<i>L. pantheris</i>
+++	---	---	---	---	---	+++	+++	+-	---	+++	---	<i>L. paralimentarius</i>
+++	---	---	+++	---	---	---	+++	+++	---	---	---	<i>L. paraplantarum</i>
+++	---	---	+++	---	---	---	+++	+++	---	---	---	<i>L. pentosus</i>
---	---	---	---	---	+++	---	---	+-	---	+++	---	<i>L. perolens</i>
+++	---	---	+++	+-	---	---	+++	+++	---	---	---	<i>L. plantarum A</i>
+++	---	---	+++	---	---	---	+++	+++	---	---	---	<i>L. plantarum B</i>
+++	+++	---	---	---	---	---	+++	---	---	---	---	<i>L. pontis</i>
+++	+++	---	---	---	---	---	+++	+-	---	---	---	<i>L. reuteri A</i>
+++	+++	---	---	---	---	---	+++	---	---	---	---	<i>L. reuteri B</i>
---	---	---	---	---	+++	+++	---	+-	---	+++	---	<i>L. rhamnosus</i>

<i>Sph</i> I	<i>Nco</i> I	<i>Nhe</i> I	<i>Ssp</i> I	<i>Sfu</i> I	<i>Eco</i> RV	<i>Dra</i> I	<i>Vsp</i> I	<i>Hind</i> II	<i>Eco</i> RI	<i>Hind</i> III	<i>Avr</i> II	IDENTIFICAÇÃO
---	---	---	+++	+++	---	+++	---	+-	---	---	---	<i>L. ruminis</i>
---	---	---	---	---	---	+++	---	---	---	+++	---	<i>L. sakei</i>
---	---	---	+++	---	---	+++	---	---	---	---	---	<i>L. salivarius</i>
+++	---	+++	---	---	---	+++	+++	---	---	+++	---	<i>L. sanfranciscensis</i>
+++	+++	---	---	---	---	---	+++	+-	---	--+	---	<i>L. vaginalis A</i>
+++	+++	---	---	---	---	---	+++	---	---	--+	---	<i>L. vaginalis B</i>

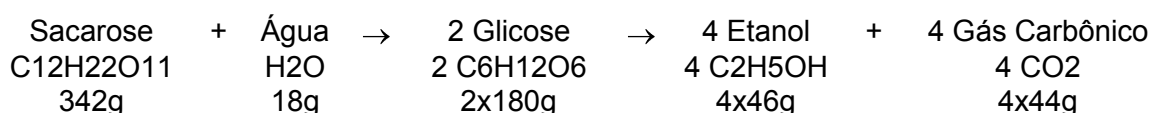
+, ocorrência de restrição; -, ausência de restrição. Para cada enzima, os símbolos indicam restrição dos espaçadores longo, médio e curto, respectivamente.

Apêndice B – Cálculo da quantidade de sacarose utilizada nas fermentações

Foi adicionada uma quantidade específica de sacarose ao leite com a finalidade de garantir uma produção de etanol, já que a sacarose é um açúcar metabolizado pela maioria das leveduras. A quantidade de sacarose adicionada foi calculada segundo a estequiometria de reação da fermentação alcoólica para se obter no produto final um teor de etanol em torno de 1,5% (v/m), conforme estabelecido pela IN 46 (BRASIL, 2007).

Considerando que a solubilidade da sacarose na água a 20°C é 204g/100mL, padronizou-se a produção do xarope de sacarose para o kefir como 150g de açúcar para 100 mL de água, segundo MESQUIARI (1999).

Reação global da fermentação alcoólica (Reação de Gay-Lussac):



Então:

342g de sacarose - 184g de etanol

x - 15g de etanol

x = 27,88 g de sacarose para 1,0L de kefir

Entretanto, o rendimento teórico em etanol nunca é obtido, já que parte de açúcar metabolizado é usado na produção de outros compostos durante a fermentação e também para crescimento da levedura, mas segundo Pasteur pode ser considerado como 90% do valor teórico. Logo, x = **31,0 g/L**.

Considerando que o xarope de sacarose possui concentração de 1,5Kg/L, é necessário adicionar 20,7 mL de xarope de sacarose em 1L de kefir para servir como substrato para as leveduras, visando a obtenção de 1,5% de etanol no produto final.

Preparo do xarope:

150g de açúcar refinado foram adicionados em 100 mL de água destilada. A solução foi homogeneizada, acondicionada em garrafa de vidro e pasteurizada. A pasteurização foi realizada a 70°C por 15 min em banho-maria. O xarope foi, então, resfriado a 22°C e empregado na produção das três formulações de kefir.

Apêndice C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido dos Provedores

Orientador: Profa Dra. Evelyn de Souza Oliveira Lopes (DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS/ FACULDADE DE FARMÁCIA/ UFMG)

Co-orientador: Prof Dr. Jacques Robert Nicoli (DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA/ INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS/ UFMG)

Colaborador: Profa Dra. Lúcia Helena Esteves dos Santos Laboissière (DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS/ FACULDADE DE FARMÁCIA/ UFMG)

Alunas de Pós-graduação: Raphaella Puccetti Carneiro/ Natália Caldeira de Carvalho (Mestrado em Ciência de Alimentos/PPGCA/Faculdade de Farmácia/UFMG)

O kefir é um leite fermentado de sabor ácido suave, efervescente e de baixo teor alcoólico. O objetivo deste trabalho é conhecer a opinião do consumidor sobre três amostras de kefir produzidas por diferentes métodos e sua percepção em relação aos produtos. Você será solicitado a responder a um questionário e uma ficha e a avaliar amostras de kefir em 1 (uma) sessão de teste sensorial.

Podem participar pessoas que tenham hábito de consumir kefir e/ou iogurte natural e/ou leites fermentados e que não apresentem nenhuma restrição à ingestão de açúcares, já que o kefir será adicionado de sacarose.

Todos os dados fornecidos são considerados confidenciais, sendo totalmente garantidos o sigilo das informações e a sua privacidade.

A sua participação no projeto tem caráter voluntário e não lhe trará nenhum tipo de ônus ou remuneração.

Desde já agradecemos sua colaboração.

Assinatura dos responsáveis:

1. Profa. Evelyn de Souza Oliveira Lopes Fones: (31) 3409-6914
2. Prof. Jacques Robert Nicoli Fones: (31) 3409-2737
3. Profa. Lúcia Helena Esteves dos Santos Laboissière Fones: (31) 3409-6908 / 6923
4. Raphaella Puccetti Carneiro Fones: (31) 3409-6925 / 6931
5. Natália Caldeira de Carvalho Fones: (31) 3409-6925 / 6931

Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP/UFMG): Avenida Antônio Carlos, 6627
Unidade Administrativa II 2º andar sala 2005 Campus Pampulha 31270-901 Belo Horizonte MG Brasil

Telefax: (31) 3499-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

Compreendi e concordo com as informações que me foram transmitidas e, portanto, aceito participar como voluntário neste projeto de pesquisa.

Belo Horizonte, ____ de _____ de _____

Nome: _____

Assinatura: _____

Telefone de contato: _____

E-mail: _____

Apêndice D – Questionário demográfico/ Informações gerais sobre leites fermentados

ESTUDO SOBRE KEFIR

Caso tenha concordado em participar deste projeto, por favor, complete o questionário com todas as informações solicitadas, as quais serão mantidas confidenciais. Desde já agradecemos sua colaboração.

Nome: _____

Telefone: _____ **E-mail:** _____

Gênero

☐ masculino

☐ feminino

Idade ☐ 15–25 ☐ 26–35 ☐ 36–45 ☐ 46–55 ☐ 56–65 ☐ ≥ 66 anos

Escolaridade

- ☐ Ensino Fundamental incompleto
- ☐ Ensino Fundamental completo
- ☐ Ensino Médio incompleto
- ☐ Ensino Médio completo
- ☐ Superior incompleto
- ☐ Superior completo
- ☐ Pós-graduação: Especialização
- ☐ Pós-graduação: Mestrado/Doutorado

Profissão:

Renda familiar mensal

- ☐ 01 a 05 salários mínimos
- ☐ > 05 a 10 salários mínimos
- ☐ > 10 a 20 salários mínimos
- ☐ > 20 a 30 salários mínimos
- ☐ > 30 salários mínimos

Com qual frequência você consome leites fermentados (iogurte, bebida láctea e outros)?

☐ diariamente ☐ freqüentemente ☐ eventualmente ☐ raramente ☐ nunca

Como você costuma consumir leites fermentados (Obs: você pode marcar mais de uma opção)?

☐ Natural ☐ Adicionado ☐ Adicionado ☐ Adicionado ☐ Adicionado de ☐ Outros:
de açúcar de frutas de mel cereais

Você sabe o que são alimentos probióticos?

☐ sim ☐ não

Você possui o hábito de consumir alimentos probióticos?

☐ sim ☐ não **Qual (is)?**

Com qual frequência você consome alimentos probióticos?

☐ diariamente ☐ freqüentemente ☐ eventualmente ☐ raramente ☐ nunca

Você já tinha ouvido falar sobre kefir?

☐ sim ☐ não

Alguma vez você já tinha experimentado kefir?

☐ sim ☐ não **Quando?**

Você tem o hábito de consumir kefir?(se a resposta for sim, por favor responda a próxima questão)

☐ sim ☐ não

Como você costuma consumir kefir? (Obs: você pode marcar mais de uma opção)

☐ Natural ☐ Adicionado ☐ Adicionado ☐ Adicionado ☐ Adicionado ☐ Outros:
de açúcar de frutas de mel de cereais

Apêndice E – Modelo da ficha de avaliação utilizada nos testes sensoriais das amostras de kefir

Nome:

Data:

Amostra:

O kefir é um leite fermentado de sabor ácido suave, efervescente e de baixo teor alcoólico.

Você está recebendo uma amostra de **kefir**. Por favor, cheire-a sob **luz branca**, coloque-a na boca sem engolir e marque na escala abaixo o quanto você gostou ou desgostou do produto em relação ao **aroma**.

☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Desgostei extremamente	Desgostei muito	Desgostei ligeiramente	Não gostei e nem desgostei	Gostei ligeiramente	Gostei muito	Gostei extremamente

Você está recebendo uma amostra de **kefir**. Por favor, coloque-a na boca sob **luz branca**, degustea e marque na escala abaixo o quanto você gostou ou desgostou do produto em relação à **efervescência**.

☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Desgostei extremamente	Desgostei muito	Desgostei ligeiramente	Não gostei e nem desgostei	Gostei ligeiramente	Gostei muito	Gostei extremamente

Você está recebendo uma amostra de **kefir**. Por favor, coloque-a na boca sob **luz branca**, degustea e marque na escala abaixo o quanto você gostou ou desgostou do produto em relação à **acidez**.

☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Desgostei extremamente	Desgostei muito	Desgostei ligeiramente	Não gostei e nem desgostei	Gostei ligeiramente	Gostei muito	Gostei extremamente

Você está recebendo uma amostra de **kefir**. Por favor, coloque-a na boca sob **luz branca**, degustea e marque na escala abaixo o quanto você gostou ou desgostou do produto em relação à **consistência**.

☐	☐	☐	☐	☐	☐	☐
Desgostei extremamente	Desgostei muito	Desgostei ligeiramente	Não gostei e nem desgostei	Gostei ligeiramente	Gostei muito	Gostei extremamente

Você está recebendo uma amostra de **kefir**. Por favor, coloque-a na boca sob **luz branca**, observe-a e marque na escala abaixo o quanto você gostou ou desgostou do produto em relação à **impressão global (aparência, aroma, sabor e consistência)**.

☐ Desgostei extremamente
 ☐ Desgostei muito
 ☐ Desgostei ligeiramente
 ☐ Não gostei e nem desgostei
 ☐ Gostei ligeiramente
 ☐ Gostei muito
 ☐ Gostei extremamente

Com base em sua opinião sobre esta amostra, indique na escala abaixo sua **intenção de compra**. Qual seria sua atitude de compra em relação ao **kefir**?

☐ Certamente não compraria
 ☐ Possivelmente não compraria
 ☐ Talvez comprasse
Talvez não comprasse
 ☐ Possivelmente compraria
 ☐ Certamente compraria

O que você mudaria no kefir para deixá-lo melhor? (Obs.: você pode marcar mais de uma opção)

- ☐ Adicionaria mais açúcar
- ☐ Adicionaria menos açúcar
- ☐ Adicionaria mel
- ☐ Adicionaria adoçante
- ☐ Adicionaria corante
- ☐ Adicionaria aromatizante

Quais? ☐ baunilha ☐ frutas vermelhas ☐ cítrico ☐ outros:

- ☐ Adicionaria conservante
- ☐ Adicionaria cereal

Quais? ☐ granola ☐ aveia ☐ farelos ☐ castanhas ☐ outros:

- ☐ Adicionaria polpa de fruta

Quais? ☐ morango ☐ maracujá ☐ coco ☐ pêssego ☐ ameixa ☐ frutas vermelhas ☐ outros:

- ☐ Outras opções (favor especificar:)

Apêndice F – Termo de Consentimento Laboratório LASEC

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

FACULDADE DE FARMÁCIA

DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS

LABORATÓRIO DE ANÁLISE SENSORIAL E ESTUDOS DE CONSUMIDOR

TERMO DE CONSENTIMENTO

O Laboratório de Análise Sensorial e Estudos de Consumidor, na pessoa da Profa. Dra. Lúcia Helena Esteves dos Santos Laboissière, declara sua concordância com o desenvolvimento do projeto de pesquisa intitulado “*Estudo da produção de kefir por cultura starter e com grãos: caracterização físico-química, avaliação sensorial e estabilidade do produto*” em suas dependências e colocará à disposição da equipe responsável pela execução do referido projeto a infraestrutura necessária (equipamentos e materiais previstos).

Belo Horizonte, ____ de _____ de ____.

Assinatura do Professor Responsável pelo Laboratório

Assinatura do Chefe do Departamento de Alimentos

Apêndice G – Termo de Consentimento Laboratório LAMIB

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS
LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL E BIOCATÁLISE
TERMO DE CONSENTIMENTO

O Laboratório de Microbiologia Industrial e Biotecnologia, na pessoa da Profa. Dra. Evelyn de Souza Oliveira Lopes, declara sua concordância com o desenvolvimento do projeto de pesquisa intitulado “*Estudo da produção de kefir por cultura starter e com grãos: caracterização físico-química, avaliação sensorial e estabilidade do produto*” em suas dependências e colocará à disposição da equipe responsável pela execução do referido projeto a infraestrutura necessária (equipamentos e materiais previstos).

Belo Horizonte, ____ de _____ de ____.

Assinatura do Professor Responsável pelo Laboratório

Assinatura do Chefe do Departamento de Alimentos

Apêndice H – Termo de Consentimento Laboratório TECAL

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS
LABORATÓRIO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
TERMO DE CONSENTIMENTO

O Laboratório de Tecnologia de Alimentos, na pessoa da Profa. Dra. Silvana da Motta, declara sua concordância com o desenvolvimento do projeto de pesquisa intitulado *“Estudo da produção de kefir por cultura starter e com grãos: caracterização físico-química, avaliação sensorial e estabilidade do produto”* em suas dependências e colocará à disposição da equipe responsável pela execução do referido projeto a infraestrutura necessária (equipamentos e materiais previstos).

Belo Horizonte, ____ de _____ de ____.

Assinatura do Professor Responsável pelo Laboratório

Assinatura do Chefe do Departamento de Alimentos

Apêndice I – Características morfológicas e fisiológicas das bactérias lácticas (BAL) isoladas do grão de kefir

Meio Isolado	Lote	Nº Isolado	Cont. UFC/mL	Descrição	Gram	Cata-lase	T. respiratório			Produção de gás	
							A	An.	M		
MRS	01	1MRSK2	1,8x10 ⁸	Col. branca, leitosa, brilhante	CGP	-	+++	+++	+++	+	
		2MRSK2	1,5x10 ⁹	Col. branca, transparente, brilhante	CGP	-	+++	+++	+++	-	
		1MRSK4	1,0x10 ⁸	Col. branca leitosa média	CGP	-	+++	+++	+++	+	
	02	2MRSK4	1,7x10 ⁹	Col. branca translúcida média	BGP	-	+++	+++	+++	-	
		3MRSK4	2,0x10 ⁷	Col. branca translúcida pequena	BGP	-	+++	+++	+++	-	
		1MRSK8	1,6x10 ⁸	Col. branca, leitosa grande	BGP	-	+++	+++	+++	+	
	03	2MRSK8	2,0x10 ⁷	Col. branca transparente média	BGP	-	++	+	++	-	
		3MRSK7	1,2x10 ⁸	Col. branca, leitosa, pequena	BGP	-	+++	+++	+++	-	
		4MRSK8	3,0x10 ⁷	Col. branca transparente,pequena	BGP	-	+++	+++	+	-	
		5MRSK7	3,8x10 ⁹	Col. branca transparente muito pequena	BGP	-	++	++	++	-	
	M17	01	1M17K3	2,1x10 ⁷	Col. branca leitosa pequena brilhante	CGP	-	++	+	+++	-
			2M17K3	1,9x10 ⁸	Col. transparente leitosa	CGP	-	++	+	+++	-
3M17K3			1,1x10 ⁹	Col. transparente translúcida	CGP	-	+++	+++	+++	-	
02		1M17K4	5,0x10 ⁷	Col. branca translúcida pequena	CGP	-	++	++	+++	+	
		2M17K4	6,9x10 ⁸	Col. branca leitosa media	CGP	-	++	+++	++	-	
		3M17K4	6,0x10 ⁸	Col. branca, leitosa grande	BGP	-	+++	+++	+++	-	
		4M17K5	2,6x10 ⁹	Col. amarela brilhante media	CGP	-	++	+	+++	-	
		5M17K5	1,0x10 ⁸	Col. amarela leitosa grande	CGP	-	++	+	+++	-	
03		1M17K9	2,4x10 ⁸	Col. branca leitosa media	CGP	-	+++	+++	+++	+	
		2M17K9	1,1X10 ⁸	Col. branca leitosa pequena	CGP	-	++	+	++	+	
		3M17K9	6,0x10 ⁷	Col. branca transparente muito pequena	BGP	-	++	+++	+++	-	
		4M17K9	6.6x10 ⁷	Col. amarela brilhante transparente	CGP	-	++	+	+++	+	

Cont., contagem por morfotipo; CGP, cocos Gram positivos; BGP, bacilos Gram positivos; A, aeróbio; An., Anaeróbio; M, microaerófilo. O sinal (+) do teste respiratório representa a intensidade do crescimento das bactérias. Os sinais (+) e (-) do teste de produção de gás representam presença e ausência, respectivamente.

Apêndice J – Características morfológicas e fisiológicas das leveduras isoladas do grão de kefir

Meio Isolado	Lote	Nº Isolado	Cont. UFC/mL	Descrição	Crescimento a 37°C		Crescimento 40 °C		MMF 24h
					24h	48h	24h	48h	
YM	01	2YMK2	1,7x10 ⁶	Col. branca leitosa grande	+		-	-	3+
		3YMK2	2,5x10 ⁷	Col. branca leitosa média	+		-	-	3+
	03	1YMK9	9,0x10 ⁶	Col. branca leitosa grande	+		-	-	3+
		2YMK9	1,0x10 ⁷	Col. branca leitosa média	+		-	-	3+
		4YMK9	2,0x10 ⁶	Col. branca redonda leitosa pequena	+		-	-	3+

Cont., contagem por morfotipo; MMF, meio mínimo de fermentação; 3+, crescimento intenso.

Apêndice K – Relação absorvância versus contagem de células de cada linhagem presente na cultura iniciadora

