

ESTUDO COMPARATIVO DE ATIVAÇÃO DOS GRÃOS DE KEFIR SOB TEMPERATURA AMBIENTE PARA A PRODUÇÃO DE LEITE FERMENTADO

Comparative study of kefir grains activation at room temperature to produce fermented milk

*Raquel da Silva Magalhães¹, Elaine Cristina Tridente Palma¹,
Raquel da Silva Procópio,¹ Ilana Racowski^{1*}*

RESUMO

Os grãos de kefir são compostos por uma matriz de polissacarídeos naturais, possuem uma microflora mista, composta por leveduras e bactérias. O produto proveniente da fermentação promovida pelos grãos do kefir em leite é o leite fermentado. Por se tratar de um produto difundido de forma artesanal, há lacunas na literatura em relação a melhor forma de armazenamento, sobre as repicagens dos grãos pré-existentes e se estes conseguem manter seu potencial probiótico. Pensando nisso, foi avaliado o processo de ativação e da não ativação dos grãos após a repicagem quando armazenados em temperatura ambiente. Os grãos foram separados em dois grupos, GKA (ativados) e GKNA (não ativados), onde foram avaliadas as suas atividades metabólicas e a enumeração de bactérias lácticas e leveduras, durante 28 dias. Os grãos ativados apresentaram vantagens em relação ao maior aumento de massa (25% para os GKA e 15% para os GKNA), os valores de pH e °Brix foram ligeiramente menores do que os apresentados pelas amostras GKNA. Por outro lado, a amostra GKNA apresentou valores de microrganismos maiores do que a amostra GKA. Concluindo, a ativação dos grãos não se apresentou vantajosa por ser um processo trabalhoso e não surtir efeito na multiplicação dos microrganismos.

Palavras-chave: kefir; bactéria lácticas, leveduras; fermentação; viabilidade.

1 Centro Educacional da Fundação Salvador Arena, Estrada dos Alvarengas, 4001, Alvarenga, 09850-550, São Bernardo do Campo, SP, Brasil. E-mail: ilmb80@gmail.com

*Autor para correspondência

Recebido / Received: 04/01/2023

Aprovado / Approved: 30/03/2023

ABSTRACT

Kefir grains are composed of a natural polysaccharides' matrix with a mixed microflora, composed of yeast and bacteria. The product from the fermentation promoted by kefir grains in milk is fermented milk. Because it is a product disseminated in an artisanal way, there are gaps in the literature regarding the best way of storage, the subculture of pre-existing grains, and whether they manage to maintain their probiotic potential. With that in mind, the process of activation and non-activation of the grains after subculture when stored at room temperature was evaluated. The grains were separated into two groups, GKA (activated) and GKNA (non-activated), where their metabolic activities and the enumeration of lactic acid bacteria and yeasts were evaluated for 28 days. The activated grains showed advantages in relation to the greater mass increase (25% for the GKA and 15% for the GKNA), the pH and °Brix values were slightly lower than those presented by the GKNA samples. On the other hand, the GKNA sample showed higher values of microorganisms than the GKA sample. In conclusion, the activation of the grains was not advantageous because it is a laborious process and has no effect on the multiplication of microorganisms.

Keywords: kefir; lactic bacteria, yeast; fermentation; viability.

INTRODUÇÃO

Segundo a Instrução Normativa nº 46 de 2007 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), kefir ou kefir natural (como também pode ser chamado) é definido como um leite fermentado cuja fermentação se realiza com cultivos ácido-lácticas elaborados com grãos de kefir, *Lactobacillus kefir*, espécies dos gêneros *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Acetobacter* com produção principal de ácido láctico, etanol e dióxido de carbono. Também podem ser sintetizados no kefir, em menores quantidades, compostos como: diacetil, acetaldeído, etil e aminoácidos, substâncias estas que ajudam a trazer para o produto um sabor diferente dos demais leites fermentados (BRASIL, 2007; SAINZ *et al.*, 2020).

Vale ressaltar que a diversificação dos produtos finais formados no kefir, diferentemente dos outros leites fermentados é possível devido aos grãos de kefir possuírem uma microflora mista, composta por leveduras e bactérias (BRACCINI *et al.*, 2021). Esta associação simbiótica de bactérias ácido-lácticas, ácido-acéticas e leveduras, imersas em uma matriz composta de polissacarídeos naturais (denominados *kefiran*) e proteínas pode ser bastante variável, dependendo de diversos fatores como a região geográfica de origem, tempo de utilização e estocagem, do substrato utilizado para o

crescimento dos grãos e da forma de manejo (MAGALHÃES *et al.*, 2011; LEITE *et al.*, 2013).

Ainda pode-se dizer que são grãos irregulares, elásticos, gelatinosos e de aparência viscosa que podem variar de 3 a 35 mm de tamanho, com aparência de um coral ou pedaços de couve-flor, de cor branca ou amarelada, inoculados diretamente em leite esterilizado, em temperatura ambiente, na proporção de 2 a 10% (p/v) (IRIGOYEN *et al.*, 2005; LEITE *et al.*, 2013).

Em relação a microbiota dos grãos de kefir, de acordo com Santos (2015) todos os microrganismos podem ser considerados GRAS (Generally recognized as safe), apresentando alguns fenótipos típicos como, gram-positivos, geralmente não móveis, não esporulados, catalase negativa, anaeróbios aerotolerantes, fastidiosos, ácido-tolerantes e estritamente fermentadores, sendo o ácido láctico, o principal produto final da fermentação de açúcares (LOPITZ-OTSOA *et al.*, 2006).

Dentre os gêneros mais frequentemente isolados estão: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* e leveduras como *Saccharomyces* e *Kluyveromyces* e dentre eles estão as espécies da levedura fermentadora de lactose *Kluyveromyces marxianus*, as leveduras não fermentadoras de lactose *Saccharomyces omnisporus*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces exiguus*, *Lactobacillus casei*,

Bifidobacterium sp. e *Streptococcus salivarius* subsp. *Thermophilus* (STEWART *et al.*, 2019).

A distribuição espacial de microrganismos no grão de kefir ainda é controversa, no entanto, tem sido geralmente relatado que as leveduras estão localizadas na seção interna e intermediária interna dos grãos, enquanto as bactérias existem nas áreas superficiais dos grãos (OLIVEIRA *et al.*, 2019).

Corroborando com estas informações, Magalhães *et al.* (2011) estudando a composição do grão de kefir brasileiro, identificaram 359 espécies isoladas, sendo predominante as bactérias lácticas (60,5%), seguidas das leveduras (30,6%) e bactérias do ácido acético (8,9%). Desta forma, o fato da possibilidade de se ter uma microbiota vasta e a modificação do equilíbrio dinâmico dessa microbiota no grão (já descrito anteriormente) podem levar a importantes alterações nas propriedades físico-químicas, reológicas, sensoriais e nutricionais das bebidas de kefir (GAROFALO *et al.*, 2015).

Outro fator de relevância que deve ser levado em conta quando falamos dos microrganismos do grão de kefir são suas viabilidades durante o armazenamento do grão, já que durante a fermentação, os grãos de kefir chegam à superfície devido à produção de dióxido de carbono e são coados, lavados, secos e armazenados para posterior reutilização (para produzir um novo leite fermentado) (SARKAR, 2008). Alguns autores recomendam o armazenamento de grãos de kefir úmidos a 4°C ou secos em temperatura ambiente por 36 a 48 horas, desta forma, os grãos conseguem manter a atividade por 12 a 18 meses e 8 a 10 dias, respectivamente (MARTH; YOUSEF, 1991). Entre um dos métodos mais atuais está a liofilização e o congelamento a -18°C, capazes de preservar a viabilidade da microbiota por 10 meses, porém com aumento da fase Lag e menor taxa inicial de redução de pH (WITTHUHN *et al.*, 2005).

Desta forma, pensando na heterogeneidade (dependente de sua origem) e a viabilidade dos microrganismos dos grãos de kefir, o objetivo deste trabalho foi verificar se o processo de ativação dos grãos, quando armazenados em temperatura ambiente e empregados como fermento, resultam

em diferenças significativas das atividades metabólicas quando comparados com os grãos armazenados nas mesmas condições, porém não ativados.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido nos Laboratórios de Microbiologia da Faculdade Engenheiro Salvador Arena (FESA) no período de agosto a dezembro de 2022.

Materiais

Cultura

Os grãos de kefir utilizados para a elaboração do projeto foram adquiridos de uma produção artesanal brasileira. Esta cultura inicialmente foi adquirida desde 2012 e vem se mantendo estável por 10 anos. Por semana são comercializados cerca de 15 litros de leites fermentados, todos partindo da mesma cultura e seus repiques. O repique de seus grãos ocorre, atualmente por aproximadamente 60 fabricações, ou seja, mensalmente.

Reagentes químicos e meios de cultura

Os reagentes e meios de cultura utilizados para os experimentos foram: cloreto de Sódio Inlab® e padrões de pH Akso®. Já para a fabricação do kefir foi utilizado o leite integral UHT Italcac®.

Dentre os meios de cultura utilizados estão: caldo de cultura MRS (Man Rogosa Shape – Merck®) e o ágar (BACTO™ Agar BD®) utilizados para o cultivo de bactérias lácticas e Agar Sabouraud (BD®) utilizado para o cultivo de bolores e leveduras.

Métodos

Armazenamento dos grãos de kefir

Para o primeiro uso dos grãos de kefir utilizados como cultura, neste projeto, estes foram lavados com água destilada estéril, secos em papel de seda e divididos em dois lotes, de aproximadamente 50 g. Todos os grãos foram ressuspensos em leite integral UHT, os dois lotes foram armazenados em temperatura ambiente, a diferença entre as amostras é o fato do primeiro

lote (grãos de kefir ativado GKA) sofrer a ativação dos grãos antes de ser inserida para a produção do leite fermentado, enquanto o segundo lote (grãos de kefir não ativado GKNA), saindo do armazenamento foi utilizado diretamente para a produção do leite fermentado (sem sofrer o processo de ativação dos seus grãos). Independente do lote, o armazenamento foi realizado em uma placa de Petri selada com Parafilm. Vale ressaltar que cada lote foi mantido por 10 dias sob refrigeração (10°C) antes do início do projeto.

Ativação dos grãos

A ativação foi realizada conforme proposto por Carvalho (2011) com algumas adaptações. Para tal, os grãos de kefir (amostra GKA) armazenados em leite UHT integral foram ativados diariamente durante dois dias para a produção. A ativação dos grãos foi realizada da seguinte maneira: os grãos foram separados do leite utilizando uma peneira e lavados com água destilada até que todo o leite fosse descartado (visualizado através do escoamento na peneira só de água). Em seguida, os grãos foram inoculados (10% m/v) em leite UHT integral. Os grãos de kefir inoculados no leite foram mantidos a 22°C em estufa incubadora tipo BOD modelo TE-391 (Demanda Bioquímica de Oxigênio, Tecnal). Após 24 horas na estufa, os grãos foram, novamente, separados do leite e lavados com água destilada, e o leite foi descartado. Os grãos foram inoculados (5% m/v) em leite e mantidos por mais 24 horas a 22°C em estufa incubadora e depois utilizados para a produção do leite fermentado.

Elaboração do leite fermentado - kefir

Com os grãos previamente ativados ou não, adicionou-se a 5% m/v destes grãos peneirados o leite UHT integral a 22°C, mediu-se o pH do leite antes de ser inoculado. O conjunto foi levado a estufa incubadora tipo BOD modelo TE-391 (Tecnal) a 22°C durante 12 horas até atingir pH 4,7. Os grãos de kefir foram separados do leite fermentado através de um procedimento de limpeza e armazenados.

Vale salientar que, o leite fermentado só foi analisado para se verificar o metabolismo da

cultura presente nos grãos de kefir, já que estes são os instrumentos de interesse neste projeto e não o produto final obtido da fermentação. Mesmo assim, o produto final foi distribuído em frascos de vidro de 250 mL estéreis, fechados e acondicionados sob refrigeração a 4°C em refrigerador.

Limpeza dos grãos de kefir

Decorrido o tempo de fermentação do leite e a estabilização por 12 horas a 22°C, os grãos foram separados do produto. A separação, para posteriores estudos de viabilidade e metabolismo foram realizadas mediante lavagem com água destilada, até que todo resíduo de leite fosse retirado dos grãos. Para auxiliar este procedimento foi utilizada uma peneira plástica. Retirado o leite, os grãos foram para a estocagem, onde ficaram armazenados em placas de Petri, seladas com Parafilm, por 48 horas em temperatura ambiente. Decorrido este tempo as subculturas sucessivas voltaram a ser empregadas para a fabricação de um novo leite fermentado.

Enumeração da microflora do grão de kefir

A enumeração da microflora dos grãos de kefir, mostrando sua viabilidade, em todas as amostras (GKA e GKNA), foi realizada antes (uma parcela do todo foi separada para a realização da análise microbiológica e o restante incorporado no leite para realizar a fermentação) e depois (após ocorrer a separação dos grãos da bebida pronta, uma parcela foi separada para a análise microbiológica e outra armazenada para ser utilizada novamente) de serem utilizadas como inóculo. Todas as análises foram realizadas em duplicata e a cada 7 dias.

Enumeração das bactérias lácticas totais

A fim de verificar a concentração de bactérias lácticas no grão de kefir foi realizada a análise microbiológica em profundidade (SILVA *et al.*, 2001). Inicialmente foi preparado o meio de cultura sólido MRS conforme as instruções do fabricante e esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos, juntamente com 5 tubos de ensaio contendo solução salina 0,85% estéril e um erlenmeyer com 225 mL de solução salina 0,85%.

Para a realização da análise, foi necessário previamente esterilizar o copo do liquidificador com álcool 70%, já que estava limpo e foi lavado com água destilada estéril e o prosseguimento da análise foi dado ao se colocar 25g da amostra no liquidificador, juntamente com 225 ml de solução salina 0,85% estéril.

Depois de bater em velocidade máxima por 2 minutos, 1 mL da diluição resultante (10^{-1}) foi transferida para um tubo de ensaio contendo 9 mL de solução salina estéril 0,85% (p/v) (diluição 10^{-2}). Deste primeiro tubo, após ser deixado no agitador de tubos por 1 minuto, foi coletado 1 mL e transferido para um novo tubo com 9 mL de solução salina estéril 0,85% (p/v) (diluição 10^{-3}). O passo entre a diluição 10^{-2} e 10^{-3} foi repetido por mais 4 vezes, a fim de se conseguir realizar as diluições 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} . As diluições 10^{-5} e 10^{-6} foram semeadas em placas de Petri, já contendo meio MRS solidificado e cobertas pelo meio de cultura MRS morno e liquefeito, que acabou se homogeneizando com a amostra através de movimentos circulares realizados na bancada. Após a solidificação do meio, as placas foram incubadas em BOD modelo TE-391 (Tecnal), onde permaneceu por 72 horas a 37°C.

Enumeração de leveduras totais

A fim de verificar a concentração de leveduras no grão de kefir, foi realizada a análise microbiológica em superfície. A contagem de leveduras foi realizada pelo método de plaqueamento em superfície a partir de diluições decimais sucessivas das amostras, realizadas da mesma forma que no item anterior. Na superfície de cada placa de Petri contendo 15 a 20 mL de ágar Sabouraud (BD®) inoculou-se 0,1 mL das diluições de 10^{-5} a 10^{-6} . As placas foram incubadas a 22°C em estufa incubadora tipo BOD modelo TE-391 (Tecnal) durante 5 dias (BRASIL, 2003).

Análises físico-químicas

As análises físico-químicas foram realizadas no período de 0 e 24 horas de cada produção de kefir. Tanto a análise de pH quanto a de teor de sólidos solúveis foram realizadas em triplicata e feitas no leite fermentado.

Determinação de pH

Foram retirados 10 mL do líquido fermentado de cada amostra para a determinação do pH em potenciômetro de bancada (KASVI-K390014P), de acordo com a Instrução Normativa nº 68 de 12 de dezembro de 2006 (BRASIL, 2006).

Determinação do teor de sólidos solúveis

A determinação dos Sólidos Solúveis Totais (SST) foram mensurados com o uso de refratômetro portátil (Instrutherm RTB-300), utilizando 0,1 mL de líquido fermentado e leite de cada amostra. Os resultados de SST foram expressos em °Brix e avaliados de acordo com a legislação vigente (BRASIL, 2006).

Análise estatística

As análises estatísticas foram feitas a partir da análise de variância (ANOVA) com o auxílio do software *Action Static* versão 3.7 e quando os resultados do teste F de regressão foram significativos, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados aqui descritos foram analisados com foco nos microrganismos do grão do kefir. Apesar de algumas análises utilizarem a matéria prima do kefir e/ou produto final, estas serviram de base para uma interpretação mais fidedigna e completa dos resultados. Desta forma, foi avaliada a massa dos grãos de kefir e a enumeração microbiana antes e depois do processo de fermentação, o SST e o pH do leite (antes do processo de fermentação) e da bebida pronta (após a fermentação). Tanto a massa quanto a enumeração dos microrganismos ajudam a identificar a viabilidade microbiana presente nos grãos, já o pH e °Brix identificam a cinética de fermentação, que só acontece se os microrganismos do grão estiverem realmente viáveis.

Varição de massa do grão de kefir

A intenção de quantificar a massa dos grãos de kefir era verificar se o fato dos microrganismos

serem ativados ou não, antes da produção da bebida, faria alguma diferença no metabolismo de multiplicação microbiana durante o processo de produção do leite fermentado. Para Almeida (2011) os grãos quando ativados tem condições melhores para seu crescimento e multiplicação dos microrganismos, pois de acordo com o autor, a demanda biológica será maior, isto porque o aumento da lactase será provável (enzima presente nos microrganismos do grão de kefir), auxiliando a degradação da lactose do leite (utilizado como substrato do produto), levando a um maior crescimento microbiano e também

desencadeando um processo fermentativo mais acelerado.

A Tabela 1 traz os resultados da massa dos grãos de kefir, antes e depois da fermentação e compartilha com a ideia de Almeida (2011), onde pelos resultados é possível observar um aumento de massa da amostra GKA de 25% e apenas um aumento de 15% na mostra GKNA nos mesmos espaços de tempo (7, 14, 21 e 28 dias). Esse aumento de massa dos grãos de kefir deve-se ao aumento na biomassa de microrganismos junto ao aumento na quantidade da matriz composta por proteínas e polissacarídeos (GARROTE *et al.*, 2001).

Tabela 1. Variação da massa dos grãos de kefir ativados (GKA) e não ativados (GKNA) antes e após a fermentação.

Tempo (Dias)	GKA			GKNA		
	Massa do grão antes da fermentação (g)	Massa do grão após fermentação (g)	Diferença de massa (g)	Massa do grão antes da fermentação (g)	Massa do grão após fermentação (g)	Diferença de massa (g)
7	25,79	32,24	6,45	25,23	29,01	3,78
14	25,69	32,11	6,42	25,14	28,91	3,77
21	25,20	31,50	6,30	25,24	29,03	3,79
28	25,16	31,45	6,29	25,28	29,07	3,79

Resultados semelhantes foram obtidos por Rattray; O' Connel (2011) e More *et al.* (2021), que também observaram o aumento de 25% nos grãos ativados e 10% para os grãos não ativados.

Diferentes combinações de fatores influenciam no aumento da biomassa dos grãos de kefir, destacando: a renovação do leite em intervalos regulares, a temperatura de cultivo, a lavagem dos grãos e a presença de nutrientes essenciais nas concentrações corretas no meio de crescimento (CHEN *et al.*, 2009). Analisando a frase acima é possível entender o fato dos grãos ativados (amostra GKA) mostrarem um efeito melhor do que os não ativados (GKNA) e desta forma vão de encontro com o que é explicado na teoria. De acordo com Chen *et al.* (2009) o fato de realizar lavagens dos grãos, como foi feito no nosso caso, nas amostras GKA e GKNA ajuda a aumentar a massa microbiana, isto porque deixa os

microrganismos mais aparentes e quando ressuspensos no leite entram em contato com a lactose de forma mais fácil e rápida, gerando resultados positivos na multiplicação microbiana, como também no processo fermentativo. A renovação do leite, também foi um artifício utilizado neste projeto, tanto para a amostra GKA como a GKNA. Porém vale ressaltar que a renovação foi realizada mais de uma vez no caso da amostra GKA, quando esta sofreu o processo de ativação (processo não ocorrido com a amostra GKNA) e depois foi introduzida na fermentação.

Avaliação físico-química das amostras de kefir durante o armazenamento

A Tabela 2 mostra os resultados das características físico-químicas (pH e °Brix) realizadas nas amostras de kefir GKA e GKNA.

Tabela 2. Média dos valores das características físico-químicas do kefir produzido através de dois métodos diferentes de ativação do grão de kefir após 28 dias de produção

Tempo (Dias)	pH		°Brix	
	GKA	GKNA	GKA	GKNA
7	4,81 ± 0,03 ^{Aa}	4,98 ± 0,03 ^{Ba}	5,9 ± 0,17 ^{Aa}	6,2 ± 0,15 ^{Aa}
14	4,03 ± 0,02 ^{Ab}	4,19 ± 0,02 ^{Bb}	5,9 ± 0,15 ^{Aa}	6,0 ± 0,21 ^{Aab}
21	3,98 ± 0,02 ^{Ab}	4,16 ± 0,01 ^{Bc}	5,8 ± 0,06 ^{Aab}	6,0 ± 0,05 ^{Bab}
28	3,88 ± 0,01 ^{Ac}	4,00 ± 0,02 ^{Bc}	5,5 ± 0,06 ^{Ab}	5,7 ± 0,15 ^{Bb}

Dados representam o valor médio de dois experimentos independentes (n=3) e seu desvio padrão.

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

* Médias seguidas de mesma letra minúscula na mesma coluna não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os valores de pH dos diferentes métodos de ativação dos grãos de kefir para a produção da bebida kefir foram significativamente diferentes ($p < 0,05$) durante todo o tempo de pesquisa, com identificação de maiores valores para a bebida produzida com o grão não ativado. Isso demonstra que a acidificação das bebidas fermentadas pela cultura não ativada (GKNA) foi mais lenta em comparação à fermentada pelos grãos ativados (GKA), ou seja, significa que a ativação dos grãos ajudou a acelerar o metabolismo microbiano. Resultados, sobre pH, semelhantes foram descritos por Gul *et al.* (2015), que relataram acidificação maior na fermentação para amostras de bebida produzidas com os grãos ativados de kefir inoculados em leite de vaca (4,55), em relação as preparações com culturas iniciadoras não ativadas (4,62).

Os valores de pH encontrados neste trabalho estão acima daqueles encontrados em laticínios, onde o kefir atinge valores de pH entre 4,3 - 4,4 nas primeiras 24 horas, talvez pelo fato dos laticínios trabalharem com uma cultura mais jovem e não como a utilizada neste trabalho que já provem de uma cultura de 10 anos (GLIBOWSKI; KOWALSKA, 2012). Ainda, para fundamentar a diferença, pode-se dizer que, 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 quando o assunto é a produção de ácido láctico e, conseqüentemente, a redução do pH durante a fermentação (HELLER, 2001).

Apesar da diferença de pH encontrada na indústria, a literatura mostra semelhança em relação aos valores encontrados neste trabalho como é o caso de Leite *et al.* (2013) que ao analisar amostras de bebida fermentada a partir de grãos de kefir, determinaram ao final da fermentação pH 4,85, com queda para 4,31 ao final do período de armazenamento. Valores semelhantes (4,46 para 4,37) foram encontrados por Mituniewicz-Malek *et al.* (2009) em kefir após o mesmo período de armazenamento. Beshkova *et al.* (2002) também observaram pequena diminuição do valor de pH dos grãos (4,50 para 4,00) após sete dias de armazenamento. Valores encontrados entre 3,8 e 4,6 reportados na literatura fazem parte dos trabalhos de Guzel-Seydim *et al.* (2000), Irigoyen *et al.* (2003), Oner *et al.* (2010), Grønnevik *et al.* (2011), Magalhães *et al.* (2011), Sarlak *et al.* (2017) e Cameiro (2010).

Vale ainda dizer que, pelos resultados da Tabela 2, é possível observar na amostra GKA que houve um aumento na atividade fermentativa das culturas presentes no grão de kefir, visto que o pH no 28º dia foi 1,2 vezes menor que o obtido no sétimo dia, menor do que o décimo quarto e o vigésimo primeiro. Para a amostra GKNA, apesar de não ocorrer a ativação dos grãos, o processo fermentativo também sofreu diferença quando o tempo foi avançando, porém mostrou um valor final de pH no 28º dia igual ao do 21º dia ($p < 0,05$).

Em relação a análise de SST (Tabela 2) pode-se dizer que tanto para a amostra GKNA quanto a GKA as repicagens dos dias 7 e 28 apresentaram diferença significativa ao nível de significância de 5%, levando a

crer que o decréscimo do valor do °Brix destas amostras podem significar um aumento do nível de fermentação ou metabolismo de crescimento do microrganismo, já que para a fermentação ocorrer há consumo de açúcar (como também para crescimento do microrganismo), no caso a lactose do leite, a qual é quantificada na determinação do valor de SST.

Comparando os valores de °Brix das duas amostras (GKA e GKNA) nos respectivos dias de repicagem é possível notar pelos resultados da Tabela 2 que há diferença significativa de valores nos dias 21 e 28. No dias iniciais de repicagem (7 e 14) a diferença significativa, ao nível de significância de 5% não é observada, ou seja, é possível afirmar que a diferença de tratamento das duas amostras, nos ensaios iniciais (7 e 14 dias) não mostrou diferença significativa na cinética fermentativa, fato contrário observado nos dois ensaios subsequentes, que mesmo sem diferença significativa entre si nos valores de °Brix, mostraram decréscimo na quantidade de SST em relação aos dias 7 e 14. Ainda, vale a pena chamar a atenção para o fato de a ativação da amostra levar a uma quantidade inferior de °Brix da amostra não ativada, nos dois casos em que os valores mostram

estatisticamente haver diferença significativa entre os valores (dias 21 e 28 de ensaio).

Viabilidade das bactérias lácticas e leveduras

Foram realizadas contagens das colônias lácticas e leveduras, tanto dos grãos ativados quanto para os grãos não ativados, antes e após 24 h de fermentação. A Instrução Normativa nº 46 de 23 de outubro de 2007, intitulada de Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados, estabelece que a contagem mínima de bactérias lácticas e leveduras durante toda a vida de prateleira deste tipo de produto (leite fermentado) deve ser igual a 107 UFC/g (7 Log UFC/ml) e 104 UFC/g (4 Log UFC/ml), respectivamente.

Conforme estudos de Beshkova *et al.* (2011) os grãos de kefir são compostos de 65 a 80% de bactérias lácticas e que as características microbiológicas de grãos de kefir sofrem influências da temperatura e tempo de fermentação, agitação, tipo de leite, como também, a proporção grão/leite.

A Tabela 3 mostra a contagem em função logarítmica das unidades de bactérias lácticas por mL das amostras GKA e GKNA durante o período de 28 dias.

Tabela 3. Contagem de bactérias lácticas das amostras GKA e GKNA, durante o período de 28 dias.

Tempo (Dias)	GKA		GKNA	
	Bactéria Láctica antes da fermentação (Log UFC/mL)	Bactéria Láctica depois da fermentação (Log UFC/mL)	Bactéria Láctica antes da fermentação (Log UFC/mL)	Bactéria Láctica depois da fermentação (Log UFC/mL)
7	7,24 ± 0,04	7,73 ± 0,00	7,41 ± 0,00	8,00 ± 0,00
14	7,23 ± 0,14	7,68 ± 0,01	7,35 ± 0,10	7,72 ± 0,00
21	7,23 ± 0,12	7,36 ± 0,72	7,31 ± 0,49	7,60 ± 0,14
28	7,08 ± 0,17	7,32 ± 0,63	7,04 ± 0,36	7,51 ± 0,52

Dados representam o valor médio de dois experimentos independentes (n=3) e seu desvio padrão.

O maior crescimento bacteriano pôde ser observado nas amostras GKNA (aproximadamente 0,43 Log UFC/mL). Na amostra GKA o crescimento médio foi de 0,33 Log UFC/mL e como em todas as amostras após os 21 dias de estudo houve um decréscimo na contagem das colônias de bactérias lácticas.

Contim *et al* (2018) e Kok-Tasetal (2012) também observaram a diminuição da contagem das bactérias lácticas com o tempo e atribuem a este fenômeno a diminuição do substrato disponível no

meio e o aumento da acidez que acaba por favorecer o crescimento de lactobacilos, mas causa um declínio no número de estreptococos.

Deve-se lembrar também que os grãos de kefir sofrem processo de crescimento e multiplicação dentro do produto e que são grãos com tamanhos e formas irregulares, proporcionando disponibilidades diferentes aos microrganismos que o compõem. Isto quer dizer que, grão menores, quando expostos a acidez do produto, durante o processo fermentativo, acabam por expor mais os

microrganismos a condições de estresse do que os grãos maiores, o mesmo pode ser dito para o fato de serem irregulares, onde alguns microrganismos (os mais próximos da superfície do grão) ficam mais prejudicados sob as condições do processo. Os grãos utilizados neste projeto eram grãos provenientes de repiques, ou seja, uma cultura não homogênea, já que a multiplicação celular dentro dos grãos ocorre de forma aleatória, dependendo da facilidade e disponibilidade de nutrientes, portanto passíveis de deixar os microrganismos estressados e com impossibilidade de crescimento nas placas de Petri contendo o meio MRS, este fato pode explicar a redução de crescimento ocorrida no dia 21 e não constatado nos demais dias de processo e/ou análise.

Outra explicação para isto poderia ser em decorrência da falta de lactose no meio onde as

bactérias lácticas se multiplicaram e sem este nutriente elas não teriam energia suficiente para a população se desenvolver, multiplicar e realizar a fermentação láctica, então a população reduziria suas taxas metabólicas por questão de sobrevivência e manutenção dos microrganismos ainda existentes no meio (MATSUMOTO *et al.*, 2005; PANT *et al.*, 2007). Porém, apesar do parágrafo trazer uma informação cientificamente verdadeira, no caso do produto produzido com as amostras GKNA e GKA a fermentação ocorre com a adição de 5% de cultura, valor considerado pequeno para em 24 horas de processo reduzir tão drasticamente o nível de açúcar do meio.

A Tabela 4 mostra a contagem em escala logarítmica das unidades de leveduras por mL das amostras GKA e GKNA durante o período de 28 dias.

Tabela 4. Contagem de leveduras das amostras GKA e GKNA durante o período de 28 dias.

Tempo (Dias)	GKA		GKNA	
	Leveduras antes da fermentação (Log UFC/mL)	Leveduras depois da fermentação (Log UFC/mL)	Leveduras antes da fermentação (Log UFC/mL)	Leveduras depois da fermentação (Log UFC/mL)
7	6,32 ± 0,00	6,11 ± 0,68	6,91 ± 0,00	6,04 ± 0,00
14	6,00 ± 0,16	6,00 ± 0,00	6,60 ± 0,92	6,48 ± 0,00
21	7,95 ± 0,08	7,43 ± 0,25	8,11 ± 0,07	7,69 ± 0,22
28	7,96 ± 0,08	7,20 ± 0,09	7,90 ± 0,18	7,48 ± 0,09

Dados representam o valor médio de dois experimentos independentes (n=3) e seu desvio padrão.

Gulitz *et al* (2011) encontram para 3 amostras uma contagem de Log de leveduras/g de grão igual 6,8 Log UFC/mL; 6,7 Log UFC/mL e 7,4 Log UFC/mL, valores bem próximos aos encontrados neste trabalho. Miguel (2009) ao estudar a composição microbiológica dos grãos de kefir de leite de diferentes localidades, encontrou contagens de leveduras que variaram de 5,15 Log UFC/mL a 8,30 Log UFC/mL sendo que não houve uma correlação clara entre maior ou menor quantidade total de leveduras e meio de cultivo dos grãos.

No presente trabalho, com exceção da contagem de leveduras no dia 14 da amostra GKA, os demais ensaios de ambas as amostras apresentaram redução no valor final do número de

microrganismos presentes e conseqüentemente ativos no meio. Na amostra GKA a média de redução dos 4 ensaios foi em torno de quase 5%, enquanto na amostra GKNA foi de aproximadamente 6,5%.

Outra questão seria o fato de os resultados encontrados neste trabalho corroborarem com a afirmação de Beshkova *et al* (2011), que diz ser a maior porcentagem do grão de kefir formada por bactérias lácticas. No caso deste trabalho a quantidade das leveduras está muito próximo das bactérias, mostrando, como mencionado inicialmente, que a origem dos grãos pode interferir nas suas características físico-químicas e microbiológicas.

De acordo com Irigoyen *et al* (2003) o pH do

kefir não varia muito com a estocagem da bebida em função da presença das leveduras. Para Collar (1996) as bactérias ácido lácticas produzem ácido láctico e acético mais lentamente, quando em presença de leveduras. Realizando uma análise das Tabelas 2 e 4, podemos dizer que nos grãos utilizados o fato do pH durante a fermentação não ficar próximo do industrial, como já mencionado no anteriormente, e as teorias de Irigoyen e Collar, justificam a quantidade de levedura presentes nos grãos serem similares as das bactérias.

CONCLUSÃO

Os resultados encontrados permitiram concluir que mesmo após 28 dias de repicagem dos grãos de kefir, os microrganismos permaneceram com sua atividade metabólica ativa. O fato dos grãos, durante todo este tempo, serem armazenados em temperatura ambiente não permitiu que apesar de algumas reduções microbianas, estas sempre foram menores do que um ciclo logarítmico, podendo desta forma serem consideradas pequenas.

Em relação a vantagem da ativação dos grãos de kefir (amostras GKA), analisando em relação a cinética enzimática, pôde-se dizer que os valores de pH e °Brix alcançados no final de 24 horas foram ligeiramente menores do que os apresentados pelas amostras GKNA, mostrando vantagem em relação a ativação. Já em relação a viabilidade dos microrganismos, a ativação dos grãos mostrou vantagem em relação ao aumento de massa, mostraram também a atividade microbiana, já que os microrganismos cresceram na placa de Petri durante o processo de enumeração microbiana. Em relação a quantidade dos microrganismos, o fato dos grãos serem armazenados e passarem por ativação a cada começo do processo de fermentação (amostra GKA) permitiu, pelos resultados, verificar que a ativação não foi vantajosa, pois considerando todo o processo, armazenamento da cultura e processos fermentativos; o saldo de microrganismos, já levando em conta as reduções das concentrações de levedura, da amostra GKA foi de menor do que a GKNA. Portanto, conclui-se que a ativação microbiana, no caso da produção do Kefir ajudou na cinética fermentativa, porém não foi efetivo na preservação e multiplicação microbiana.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, F. A. *et al.* Análise sensorial e microbiológica de kefir artesanal produzido a partir de leite de cabra e de leite de vaca. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 66, n. 378, p. 51-56, 2011.
- BESHKOVA, D. M. *et al.* Pure cultures for making kefir. **Food Microbiology**, v. 19, n. 5, p. 537-544, 2002. DOI: 10.1006/fmic.2002.0499
- BRACCINI, V. P. *et al.* Leite fermentado: kefir. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 3, p. 21121-21135, 2021. DOI: 10.34117/bjdv7n3-021
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, n. 239, p. 8, 14 dez. 2006.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007. Regulamento técnico de produção, identidade e qualidade de leites fermentados. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, n. 205, p. 4, 24 out. 2007.
- CARNEIRO, R. P. **Desenvolvimento de uma cultura iniciadora para produção de kefir**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.
- CARVALHO, N. C. **Efeito do método de produção de kefir na vida de prateleira e na infecção experimental com Salmonella Typhimurium em camundongos**. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.
- CHEN, T. H. *et al.* Microbiological and chemical properties of kefir manufactured by entrapped microorganisms isolated from kefir grains. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 7, p. 3002-3013, 2009. DOI: 10.3168/jds.2008-1669
- COLLAR, C. Review: Biochemical and technological assessment of the metabolism of pure and mixed

- cultures of yeast and lactic acid bacteria in breadmaking applications. **Food Science and Technology International**, v. 2, n. 6, p. 349-367, 1996. DOI: 10.1177/108201329600200601
- CONTIM, L. S. R.; OLIVEIRA, I. M. A.; NETO, J. C. Avaliação microbiológica, físico-química e aceitação sensorial do kefir com polpa de graviola. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 73, n. 1, p. 1-9, 2018. DOI: 10.14295/2238-6416.v73i1.604
- GAROFALO, C. *et al.* Bacteria and yeast microbiota in milk kefir grains from different Italian regions. **Food Microbiology**, v. 49, p. 123-133, 2015. DOI: 10.1016/j.fm.2015.01.017
- GARROTE, G. L.; ABRAHAM, A. G.; DE ANTONI, G. L. Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. **Journal of Dairy Research**, v. 68, n. 4, p. 639-652, 2001. DOI: 10.1017/s0022029901005210
- GLIBOWSKI, P.; KOWALSKA, A. Rheological, texture and sensory properties of kefir with high performance and native inulin. **Journal of Food Engineering**, v. 111, n. 2, p. 299-304, 2012. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2012.02.019
- GRØNNEVIK, H.; FALSTAD, M.; NARVHUS, J. A. Microbiological and chemical properties of Norwegian kefir during storage. **International Dairy Journal**, v. 21, n. 9, p. 601-606, 2011. DOI: 10.1016/j.idairyj.2011.01.001
- GUL, O. *et al.* Manufacture and characterization of kefir made from cow and buffalo milk, using kefir grain and starter culture. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 3, p. 1517-1525, 2015. DOI: 10.3168/jds.2014-8755
- GULITZ, A. *et al.* The microbial diversity of water kefir. **International Journal of Food Microbiology**, v. 151, n. 3, p. 284-288, 2011. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.09.016
- GÜZEL-SEYDIM, Z. B. *et al.* Determination of organic acids and volatile flavor substances in kefir during fermentation. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 13, n. 1, p. 35-43, 2000. DOI: 10.1006/jfca.1999.0842
- HELLER, K. J. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, n. 2, p. 374s-379s, 2001. DOI: 10.1093/ajcn/73.2.374s
- IRIGOYEN, A. *et al.* Microbiological, physicochemical, and sensory characteristics of kefir during storage. **Food Chemistry**, v. 90, n. 4, p. 613-620, 2005. DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.04.021
- KOK-TAS, T. *et al.* Effects of different fermentation parameters on quality characteristics of kefir. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 2, p. 780-789, 2013. DOI: 10.3168/jds.2012-5753
- LEITE, A. M. O. *et al.* Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 341-349, 2013. DOI: 10.1590/S1517-83822013000200001
- LOPITZ-OTSOA, F. *et al.* Kefir: a symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 23, n. 2, p. 67-74, 2006. DOI: 10.1016/s1130-1406(06)70016-x
- MAGALHÃES, K. T. *et al.* Comparative study of the biochemical changes and volatile compound formations during the production of novel whey-based kefir beverages and traditional milk kefir. **Food Chemistry**, v. 126, n. 1, p. 249-253, 2011. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.11.012
- MARTH, E. H.; YOUSEF, A. E. Fungi and dairy products. *In*: ARORA, D. K.; MUKERJI, K. G.; MARTH, E. H. **Handbook of Applied Mycology**, 1991. p. 375-414.
- MATSUMOTO, M. *et al.* Cariogenicity of the probiotic bacterium *Lactobacillus salivarius* in rats. **Caries Research**, v. 39, n. 6, p. 479-483, 2005. DOI: 10.1159/000088183
- MIGUEL, M. G. C. P. **Identificação de microrganismos isolados de grãos de kefir de leite e de água de diferentes localidades**. 2009. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.
- MITUNIEWICZ-MAŁEK, A.; DMYTRÓW, I.; JASIŃSKA, M. Quality of kefir produced using active flora probiotic. **Electronic Journal of Polish Agricultural Universities**, v. 12, n. 3, 2009.

- MORE, J. C. R. S. *et al.* Kefir: características microbiológicas e métodos de fabricação. **Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento**. v. 4, n. 6, p. 64-86. 2021.
- OLIVEIRA, A. P. *et al.* Elemental chemical composition of products derived from kefir fermented milk. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 78, p. 86-90, 2019. DOI: 10.1016/j.jfca.2019.02.005
- ÖNER, Z.; KARAHAN, A. G.; ÇAKMAKÇI, M. L. Effects of different milk types and starter cultures on kefir. **Gıda**, v. 35, n. 3, p. 177-182, 2010.
- PANT, D.; ADHOLEYA, A. Enhanced production of ligninolytic enzymes and decolorization of molasses distillery wastewater by fungi under solid state fermentation. **Biodegradation**, v. 18, n. 5, p. 647-659, 2007. DOI: 10.1007/s10532-006-9097-z
- RATTRAY, F. P.; O'CONNELL, M. J. Kefir, Fermented Milks. *In*: FUQUAY, J. W. **Encyclopedia of Dairy Sciences**, San Diego: Academic Press, 2011. p. 518-524.
- SAINZ, I. *et al.* Effect of different kefir grains on the attributes of kefir produced with milk from Costa Rica. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 1, p. 215-219, 2020. DOI: 10.3168/jds.2018-15970
- SANTOS, F. L. **Kefir: propriedades funcionais e gastronômicas**. Cruz das Almas: Editora UFRB, 2015. 124p.
- SARKAR, S. Biotechnological innovations in kefir production: a review. **British Food Journal**, v. 110, n. 3, p. 283-295, 2008. DOI: 10.1108/00070700810858691
- SARLAK, T. *et al.* Effects of starter culture and storage temperature on functional, microbial and sensory characteristics of kefir during storage. **Journal of Pharmaceutical & Health Sciences**, v. 5, n. 1, p. 23-35, 2017. DOI: 10.1108/00070700810858691
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual of food microbiology analysis methods**. São Paulo: Varela, 2001.
- STEWART, L. K. *et al.* Milk and kefir maintain aspects of health during doxorubicin treatment in rats. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 3, p. 1910-1917, 2019. DOI: 10.3168/jds.2018-15576
- WITTHUHN, R. C.; SCHOEMAN, T.; BRITZ, T. J. Characterization of the microbial population at different stages of Kefir production and Kefir grain mass cultivation. **International Dairy Journal**, v. 15, n. 4, p. 383-389, 2005. DOI: 10.1016/j.idairyj.2004.07.016