REVISTA
DO INSTITUTO DE LATICÍNIOS CÂNDIDO TOSTES
v. 77, n. 2, abr-jun 2022

Artigo DOI: 10.14295/2238-6416.v77i2.887

KEFIR DE LEITE MANTÉM A CONTAGEM MICROBIOLÓGICA COM ATIVIDADE PROBIÓTICA AO LONGO DO CULTIVO COM PREDOMINÂNCIA DOS GÊNEROS *LACTOCOCCUS* E *ASPERGILLUS*

Milk kefir maintains the microbiological count with probiotic activity throughout the cultivation with a predominance of *Lactococcus* and *Aspergillus genera*

Thaís Costa de Almeida[1], Poliana Guiomar de Almeida Brasiel[1], Sheila Cristina Potente Dutra Luquetti[1]*

RESUMO

O kefir é uma bebida fermentada produzida a partir da adição de grãos de kefir ao substrato de cultivo, tradicionalmente o leite. A composição dos micro-organismos presentes no kefir depende de vários fatores, como origem e tempo de fermentação. Sua composição o classifica como um probiótico, capaz de apresentar benefícios à saúde com o consumo regular. Assim, o presente estudo tem como objetivo avaliar a estabilidade da contagem microbiológica do kefir de leite ao longo do período de 35 dias, seu pH e composição centesimal, além de analisar a microbiota bacteriana e fúngica. Para produção do leite fermentado, os grãos de kefir foram cultivados em leite integral pasteurizado, na proporção de 1:10, e a contagem de bactérias e leveduras foi realizada pelo método de plaqueamento em superfície. O DNA genômico total foi extraído e as bibliotecas de amplicons 16S rRNA e ITS foram geradas para cada amostra, as quais foram sequenciadas na plataforma Illumina MiSeq. De acordo com a contagem de bactérias ácido láticas e leveduras, o kefir avaliado apresentou contagem probiótica e tanto a composição centesimal quanto os valores médios de pH, se mostraram adequados ao longo do tempo, mesmo com pequenas variações de pH. Os principais gêneros bacterianos encontrados no kefir foram *Lactococcus, Bacteroides* e *Prevotellaceae_UCG-001*, e *Aspergillus, Beauveria* e *Saccharomyces* foram os gêneros fúngicos predominantes. Os resultados indicam que há manutenção das contagens microbiológicas mínimas do kefir de leite durante o período de análise, com predomínio dos gêneros *Lactococcus* e *Aspergillus.*

Palavras-chave: kefir; probióticos; microbiologia; microbiota.

---

1 Universidade Federal de Juiz de Fora, Departamento de Nutrição, Rua José Lourenço Kelmer, s/n, São Pedro, 36036-900, Juiz de Fora, MG, Brasil. E-mail: thaiscalmeida.nutri@gmail.com

*Autor para correspondência

Recebido / Received: 16/09/2021 Aprovado / Approved: 24/02/2022

ABSTRACT

Kefir is a fermented drink produced from the addition of kefir grains to the cultivation substrate, traditionally milk. The microorganism's composition present in kefir depends on several factors, such as origin and fermentation time. Its composition classifies it as a probiotic, capable of providing health benefits if regularly consumed. Thus, the present study is aimed to evaluate the microbiological count stability of the kefir over the period of 35 days, pH, and nutritional composition, in addition to analyzing the bacterial and fungal microbiota. To produce fermented milk, kefir grains were cultivated in pasteurized whole milk at a ratio of 1:10, and the bacteria and yeast counting was performed by the surface plating method. Total genomic DNA was extracted and 16S rRNA and ITS amplicon libraries were generated for each sample, which was sequenced on the Illumina MiSeq platform. According to the lactic acid bacteria and yeasts count, the evaluated kefir presented probiotic count, and both the centesimal composition and the mean pH values turned up to be appropriate over time, even with small pH variations. The main bacterial genera found in kefir were *Lactococcus*, *Bacteroides,* and *Prevotellaceae_UCG-001*, and *Aspergillus, Beauveria,* and *Saccharomyces* were the predominant fungal genera. The results indicate that the minimum microbiological counts of kefir milk are maintained during the analysis period, with a predominance of *Lactococcus* and *Aspergillus* genera.

Keywords: kefir; probiotics; microbiology; microbiota.

INTRODUÇÃO

O kefir é uma bebida fermentada que teve origem nas montanhas caucasianas da Rússia (MAGALHÃES, 2008; DIAS, 2016). O produto fermentado é produzido artesanalmente, a partir da adição de grãos de kefir ao leite (DIAS, 2016). Os grãos, de aspecto elástico, gelatinoso, irregular, de cor branca ou amarelada e com tamanhos variados, apresentam uma matriz de polissacarídeos e proteínas, onde vivem bactérias ácido-láticas (BAL), bactérias ácido-acéticas e leveduras em uma associação simbiótica (MAGALHÃES, 2008; CAETANO; MONTANHINI, 2014; ROSA *et al.*, 2017; BENGOA *et al.*, 2018; LEITE *et al.*, 2013). No processo de fermentação são produzidos ácido lático, dióxido de carbono e etanol (ROSA *et al.*, 2017). Os grãos têm capacidade de aumentar em número e volume durante a fermentação e podem ser reutilizados (CAETANO; MONTANHINI, 2014; LEITE *et al.*, 2013).

A composição de micro-organismos presentes no kefir depende da origem e armazenamento dos grãos, do tempo de utilização, da composição química do leite, da temperatura de fermentação e da tecnologia utilizada em sua manipulação (MAGALHÃES, 2008; BENGOA *et al.*, 2018). No Brasil, a sua produção é comumente feita de forma doméstica, com a doação dos grãos de pessoa para pessoa (MAGALHÃES, 2008; LEITE *et al.*, 2013). Dessa forma, não é possível saber ao certo as composições química, centesimal e microbiológica presentes nos seus grãos, e em seus produtos (MAGALHÃES, 2008; ROSA *et al.*, 2017).

O kefir é considerado um probiótico, que tem como definição, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), "micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas conferem algum benefício para a saúde" (FAO; WHO, 2006). Para ser considerado probiótico, o Codex Alimentarius e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) estabelecem que o número total mínimo de micro-organismos no kefir deve ser de 10^7 unidades formadoras de colônias (UFC/mL) para bactérias e 10^4 UFC/mL para leveduras (CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 2011; BRASIL, 2007). A identificação da microbiota presente no kefir e em seus grãos é importante para o conhecimento da qualidade do produto como probiótico e seus efeitos biológicos (ROSA *et al.*, 2017). Os micro-organismos encontrados com maior frequência nos grãos de kefir são BAL dos gêneros *Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Streptococcus;* bactérias ácido-acéticas do gênero *Acetobacter,* e leveduras dos gêneros *Kluyveromyces* e *Saccharomyces* (DIAS, 2016; ROSA *et al.*, 2017; BENGOA *et al.*, 2018; LEITE *et al.*, 2013).

Estudos demonstraram que o consumo regular de kefir pode apresentar benefícios à saúde, como melhora da digestão da lactose (HERTZLER; CLANCY, 2003; DE VRESE *et al.*, 1992), efeitos antimicrobianos (RODRIGUES *et al.*, 2005; YERLIKAYA, 2019), imunomodulatórios (VINDEROLA *et al.*, 2005; CARASI *et al.*, 2015), hipocolesterolêmicos (GUO *et al.*, 2011; ZHENG *et al.*, 2013), antioxidantes (LIU *et al.*, 2005; GAMBA *et al.*, 2020), antialérgicos (LEE *et al.*, 2007; HONG *et al.*, 2010), cicatrizantes (RODRIGUES *et al.*, 2005), anti-inflamatórios (LEE *et al.*, 2007; RODRIGUES *et al.*, 2005), modulador da microbiota intestinal (MARQUINA *et al.*, 2002) e ação anti-carcinogênica (LIU *et al.*, 2002; CEVIKBAS *et al.*, 1994).

O objetivo do presente estudo é avaliar a estabilidade da contagem microbiológica do kefir de leite ao longo do período de trinta e cinco dias, seu pH e composição centesimal, e identificar a microbiota bacteriana e fúngica do kefir.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparo do kefir

Os grãos de kefir utilizados no estudo foram obtidos do Laboratório de Bioquímica Nutricional do Departamento de Nutrição e Saúde (DNS) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais, Brasil. Como substrato, foi empregado o leite integral pasteurizado (Benfica®, Juiz de Fora, MG, Brasil). O cultivo foi realizado diariamente durante o período de trinta e cinco dias, seguindo rigorosamente o protocolo experimental para a qualidade do produto fermentado.

Os grãos foram inoculados ao substrato na proporção de 1 grama para cada 10 mL de leite em recipiente de vidro esterilizado, e mantidos em estufa a 25 °C ± 2 °C, durante 24 horas, em meio aeróbio e, posteriormente, os grãos foram separados do leite fermentado utilizando-se uma peneira, conforme estudos anteriores (SIMOVA *et al.*, 2002; KIM *et al.*, 2015). Os grãos retidos na tamisagem foram novamente inoculados ao leite e as amostras de kefir foram coletadas diariamente após 24h de fermentação, sendo esse procedimento de coleta repetido durante trinta e cinco dias, repetindo as etapas descritas na Figura 1 (ROSA *et al.*, 2017; OTLES; CAGINDI, 2003).

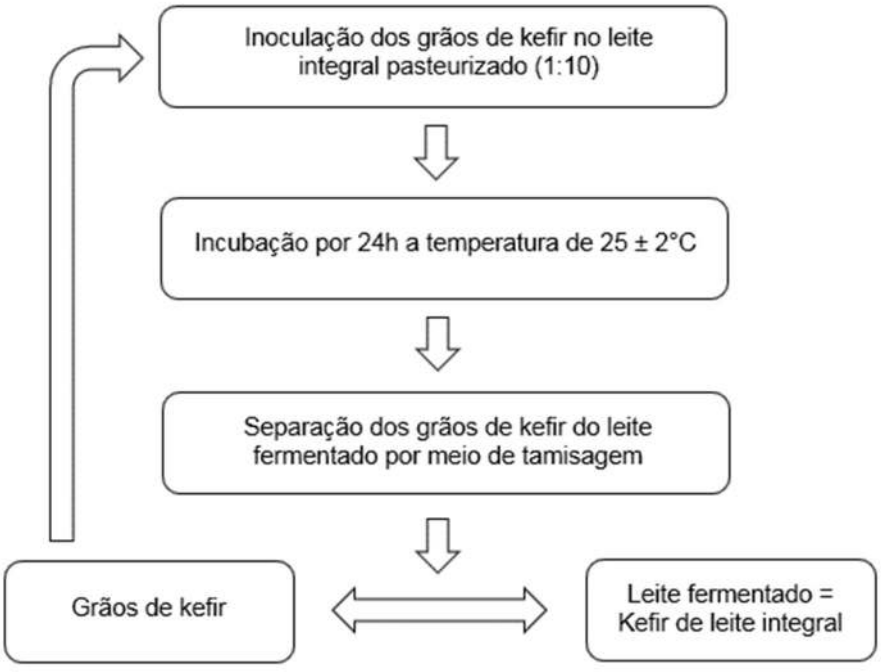


Figura 1. Preparo do kefir de leite.

Contagem microbiológica

A contagem de bactérias foi realizada a cada dois dias pelo método de plaqueamento em superfície por meio da técnica de microgotas a partir de diluições decimais seriadas, após homogeneização das amostras (IBBA; ELASKY, 2018). Na superfície de cada placa contendo o meio ágar de Man, Rogosa e Sharpe (MRS), foram inoculados 20 µL das diluições decimais (10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-7}) do kefir. As placas foram incubadas a 37 °C por 24-48h horas em estufa para a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC). A contagem de leveduras também foi realizada pelo método de plaqueamento em superfície a partir de diluições decimais seriadas. Na superfície de cada placa contendo ágar de batata e dextrose (BDA) acidificado com solução de 10% de ácido tartárico, foram inoculados 100 µL das diluições decimais (10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}) do kefir. As placas foram incubadas a 25 °C em estufa incubadora durante 5 dias. A partir da fórmula (média final da contagem de UFC x fator de diluição)/alíquota utilizada para o plaqueamento, determinou-se a quantidade de UFC/mL de kefir (BRASIL, 2003). O experimento foi realizado em triplicata.

Composição centesimal

A composição centesimal do kefir de leite foi determinada em triplicatas por métodos já descritos pela Association of Official Analytical Chemist (WILLIAMS, 1989; HORWITZ; LATIMER, 2005), e já padronizados no Laboratório de Composição e Valor Nutricional de Alimentos do Departamento de Nutrição da UFJF. A umidade foi analisada por secagem direta da amostra em estufa a 105 ºC; a determinação do teor de cinzas foi realizada por incineração em mufla a 550 ºC e posterior resfriamento em dessecador até a temperatura ambiente; os lipídios totais foram extraídos da amostra de kefir (após 24 horas de fermentação) com éter de petróleo (60-80 °C) em um aparelho de Soxhlet por cerca de 6-8h. O solvente residual foi evaporado em um copo pré-pesado e o aumento no peso do copo resultou nos lipídios totais; e o teor de nitrogênio na amostra foi determinado pelo método de Kjeldahl e a proteína bruta foi calculada multiplicando o nitrogênio avaliado por 6,25 (HELRICH, 1990). A quantificação de carboidratos foi determinada pelo cálculo da diferença percentual, subtraindo-se do total da soma de umidade, cinzas, lipídios e proteínas.

Análise do pH

O pH foi medido por um eletrodo de pH (Gehaka, PG1800; São Paulo, SP, Brasil) conectado a um analisador de íons. O eletrodo foi calibrado no início de cada ensaio com soluções tampão, com pH 4,0 e 7,0 como padrão.

Identificação da microbiota do kefir

O DNA genômico total foi extraído da amostra de kefir referente ao primeiro dia de fermentação – após 24h. O kefir de leite foi homogeneizado por 1 min e então, 2 mL foi transferido para um microtubo e centrifugado por 15 min a 3500 rpm. O pellet foi utilizado para extração de DNA total usando o kit MagaZorb® DNA Mini-Prep (Promega BioSciences, LLC, San Luis Obispo, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante, com algumas modificações, conforme descrito a seguir. Os sedimentos foram ressuspensos em 1 mL de tampão de lise e incubados a 70 °C durante 5 min. Em seguida, a centrifugação a 14000 rpm por 2 min foi realizada. O sobrenadante foi transferido para um tubo limpo, 500 µL de tampão de ligação e 20 µL de proteinase K foram adicionados à mistura e incubados por 30 min a 56 °C, seguindo o protocolo de isolamento fornecido pelo fabricante. As medidas de qualidade e quantidade de DNA foram realizadas por espectrofotometria Nano-Drop 1000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) e eletroforese de DNA com o Bioanalyzer DNA analysis. O DNA extraído foi armazenado a -20 °C.

Após avaliação do DNA, um sequenciamento de alto rendimento na plataforma Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, CA, EUA) foi realizado na empresa GenOne Biotechnologies (Rio de Janeiro, Brasil). As regiões hipervariáveis V3-V4 do gene 16S rRNA e ITS para discriminação de comunidades bacterianas e fúngicas, respectivamente, foram sequenciadas e os dados obtidos, atribuídos e analisados. A filtragem de qualidade dos dados brutos de sequenciamento foi realizada para obter tags limpas de alta qualidade, que foram posteriormente analisadas usando o software QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) com configurações padrão. Um conjunto de

sequências em um nível semelhante de 97% foi agrupado em uma Unidade Taxonômica Operacional (OTU) pelo pipeline UPARSE, e usando Mothur (SCHLOSS *et al*., 2009) como algoritmo de atribuição e Silva (QUAST *et al*., 2012) como banco de dados de referência. Uma sequência foi escolhida como representante de cada OTU para anotar informações taxonômicas.

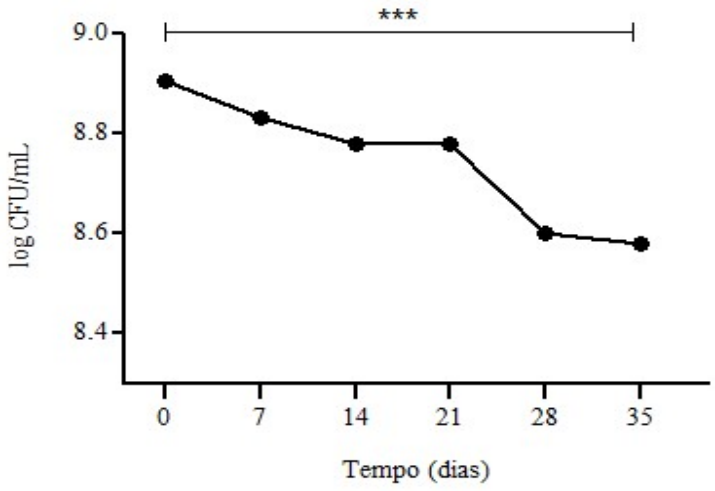
Análise estatística

Os dados foram analisados pelo programa estatístico GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, EUA) e expressos como média ± erro padrão da média. A análise de variância (ANOVA), seguida pelo pós-teste de Newman-Keuls, determinou as diferenças na contagem microbiológica ao longo do tempo. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A contagem de BAL e leveduras do kefir avaliado neste estudo alcançou os valores estabelecidos pelo Codex Alimentarius e o MAPA para probióticos, pois foram obtidos os valores totais mínimos de micro-organismos de 10^8 UFC/mL para bactérias, ao longo dos trinta e cinco dias de acompanhamento e 10^6 UFC/mL para leveduras, na contagem inicial e final (Figuras 1 e 2). Irigoyen *et al.* (2005) observaram em amostras de 1 e 5% de grãos, contagem de 10^8 UFC/mL para BAL e 10^5 UFC/mL para leveduras, onde a contagem de BAL diminuiu entre 7 e 14 dias, enquanto a contagem de leveduras se manteve constante durante todo o período de 28 dias.

Estudos anteriores observaram contagem mínima de 10^5 UFC/mL e máxima de 10^9 UFC/mL para bactérias e contagem mínima de 10^5 UFC/mL e máxima de 10^7 UFC/mL para leveduras (KORSAK *et al.*, 2015; GARROTE *et al.*, 1998; DOBSON *et al.*, 2011). Esses diferentes resultados mostram como pode ser variável a contagem de micro-organismos encontrados no kefir, assim como os gêneros de bactérias e leveduras, o pH alcançado e também a composição centesimal. Esses fatores podem variar de acordo com o local de origem dos grãos de kefir, o tipo de substrato utilizado na fermentação bem como sua composição, a proporção de grãos e substrato, se a análise foi feita nos grãos de kefir ou no leite fermentado, a forma de armazenamento e o tempo/temperatura de fermentação (ROSA *et al.*, 2017).



*** Valores significativos quando $p < 0,05$, em comparação ao D0.

Figura 1. Contagem de BAL em log UFC/mL ao longo de 35 dias

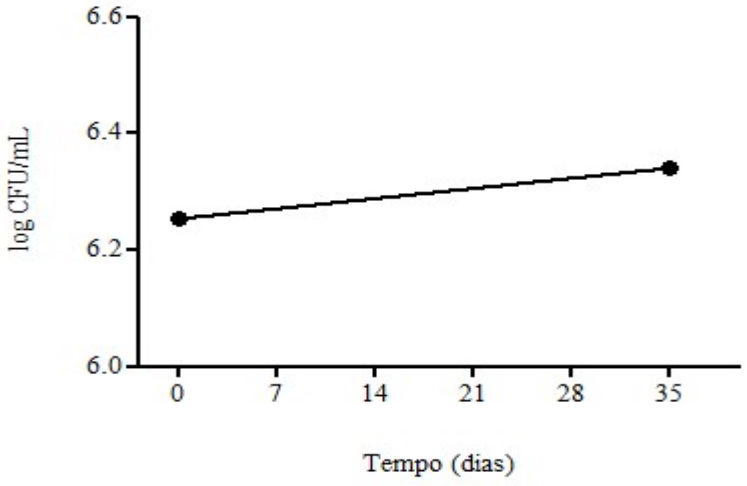


Figura 2. Contagem inicial e final de leveduras em log UFC/mL

A composição centesimal encontrada mostrou 3,1% de proteínas, 2,9% de gordura, 4,1% de lactose, 0,7% de cinzas e 89,2% de umidade em 100 gramas de produto. Segundo o Codex Alimentarius, a composição do kefir deve ser constituída de até 10% de gordura e no mínimo 2,8% de proteína. Dessa forma, a composição encontrada neste estudo atende a esses critérios (CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 2011). Irigoyen *et al.* (2005) observaram resultados semelhantes em relação às gorduras e à lactose. Após fermentação de 24 horas, as amostras de kefir preparadas nas concentrações de 1% e 5% apresentaram teores de gordura de 3,51 e 3,6% e teores de lactose de 3,51 e 3,41%, respectivamente. Os autores observaram que a lactose diminuiu em 20-25% em relação aos valores iniciais de lactose presentes no leite nessas primeiras 24 horas, e os valores encontrados permaneceram constantes até o 14º dia. Porém, vale ressaltar que a proporção utilizada foi diferente do presente estudo. Já Weschenfelder *et al.* (2011), encontraram a composição centesimal de 9,23% de proteínas, 8,29% de gordura, ausência de lactose, 0,89% de cinzas e 79,39% de umidade, após as mesmas condições de incubação, na proporção de 10%. Porém, estes resultados foram encontrados na fase sólida do kefir, segundo a concentração de leite obtido após incubação (24h a25 ºC), maturação (144h a 7º C) e filtração. No leite fermentado foram identificados uma média de 1,34% de lactose após 24 horas de fermentação.

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2017), o limite de lactose aceitável e entendido como seguro para as pessoas com intolerância é de 100 miligramas (mg) para cada 100 gramas (g) de produto. Para aqueles produtos que possuem entre 100 mg e 1 g por 100 g ou mililitros (mL), são considerados produtos com baixo teor de lactose. O teor de lactose encontrado no kefir deste estudo foi de 4,1%, o que equivale a 4,1 g em 100 g de produto. Esse resultado, se comparado ao teor de lactose do leite de vaca, que pode variar entre 4,2 - 5% (MEHTA, 2015), foi menor, porém, ainda está acima do tolerado de acordo com a ANVISA. Porém, um estudo feito por Hertzler;Clancy (2003) mostrou que a ingestão de 3,93 g de lactose em 100 g de kefir melhorou a digestão da lactose, acompanhada por uma melhora nos sintomas de flatulência. Essa concentração baixa de lactose nos leites fermentados é resultante do seu processo de transformação em ácido lático pelas bactérias presentes no kefir, o que influencia também na redução do pH (GRANATO, 2007; MEHTA, 2015).

Os valores médios de pH do kefir variaram ao longo do tempo de fermentação de 3,75 a 4,1 (Figura 3), se mantendo adequado, uma vez que o valor desejável para o kefir é próximo de 4 (IRIGOYEN, 2005). Com o pH abaixo de 4,5, a microbiota que consegue se

desenvolver é limitada aos bolores e leveduras, além de BAL e bactérias ácido-acéticas. Esses resultados classificam o kefir como um alimento muito ácido, o que garante a inibição do crescimento de micro-organismos patogênicos que podem alterar seu sabor e aroma, mantendo assim uma durabilidade maior, se comparada à dos leites não fermentados (GRANATO, 2007; FRANCO, 1996). Ao longo dos primeiros dias, houve uma queda acentuada do pH durante a fermentação, o que pode ser explicado pela degradação da lactose, com um pequeno aumento no 21º dia, que pode ser decorrente da alteração na dinâmica microbiana do produto fermentado. Korsak *et al.* (2015) obtiveram pH mais elevado (4,43 a 4,83), no kefir a 10%, se comparado ao presente estudo, com o mesmo tempo de fermentação, de 24 horas a 25 °C. Já Garrote *et al.* (1998) verificaram resultado próximo a este estudo (3,73), porém em um tempo maior de fermentação, de 48 horas a 20 °C. O maior tempo de fermentação pode ser responsável pelo valor mais baixo do pH.

Weschenfelder *et al.* (2011) também encontraram valores semelhantes ao nosso estudo, em 4 populações diferentes de kefir a 10% (3,60 a 3,77) após incubação por 24 horas a 25 ºC. Irigoyen *et al.* (2005) obtiveram um valor de pH em torno de 4,5 em diferentes amostras, com concentrações de 1% e 5%. Não identificaram variação ao longo do armazenamento do kefir, mas observaram queda acentuada do pH durante a fermentação, na presença dos grãos, que pode ser justificada pela degradação da lactose, resultante da ação das bactérias presentes nos grãos. A contagem de BAL observada no estudo de Irigoyen *et al.* (2005) diminuiu ao longo dos dias, o que pode ter sido responsável pelo pH não ter se tornado mais ácido com o tempo. Também foram encontradas diferenças no pH com relação a concentração de grãos, onde o kefir a 1% apresentou resultados um pouco mais elevados. Dobson *et al.* (2011) observaram uma forte queda do pH do kefir em 24 horas de fermentação, chegando até 4,5, ao mesmo tempo em que *Lactococcus* foi o gênero dominante na fermentação.

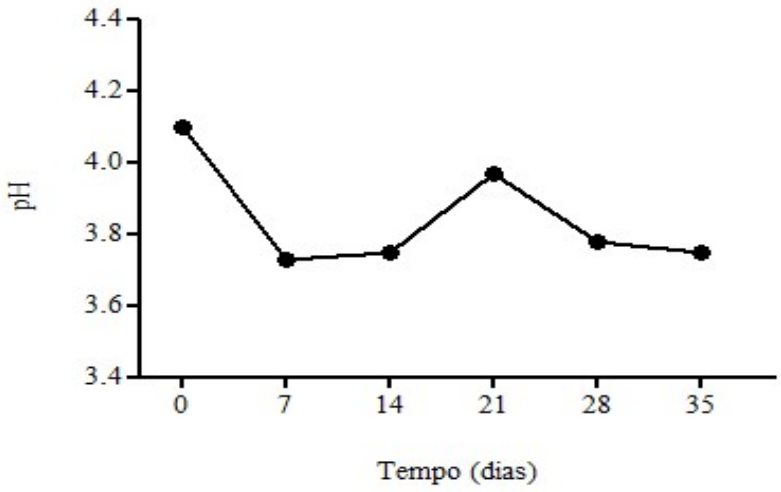


Figura 3. Análise do pH ao longo de 35 dias

Em relação ao perfil de microbiota bacteriana do kefir, os filos Firmicutes, Bacteroidetes e Proteobacteria foram os mais abundantes, com destaque para os gêneros bacterianos *Lactococcus, Bacteroides, Prevotellaceae_UCG-001, Helicobacter, Acinetobacter* e *Prevotella_1* O filo Ascomycota representou mais de 99% da microbiota fúngica, com predomínio dos gêneros *Aspergillus, Beauveria, Saccharomyces, Cladosporium, Sacrocladium* e *Fusarium.* (Figuras 4 e 5).

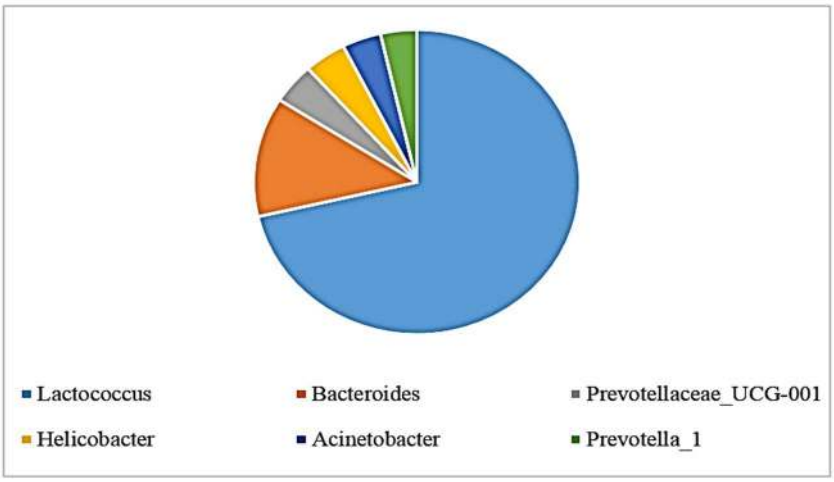


Figura 4. Principais gêneros bacterianos encontrados no kefir de leite

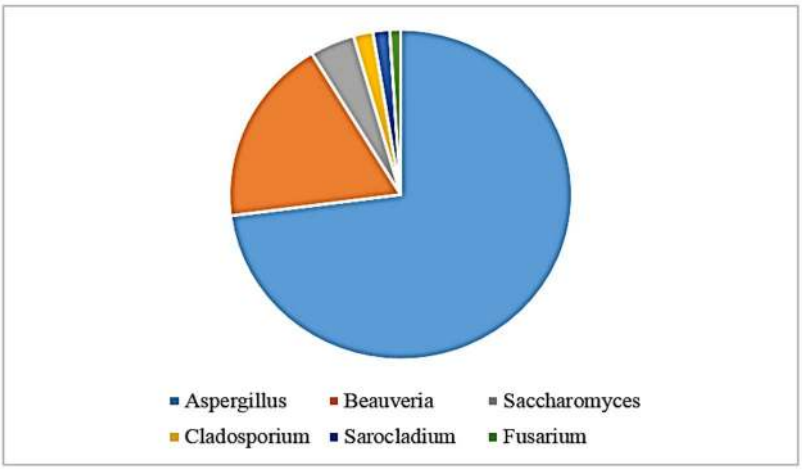


Figura 5. Principais gêneros fúngicos encontrados no kefir de leite

Miguel *et al*. (2010) analisaram a composição microbiológica de grãos de kefir proveniente de 10 estados diferentes do Brasil e também do Canadá e Estados Unidos. Os autores encontraram o gênero *Lactobacillus* em grande quantidade e não encontraram bactérias do gênero *Lactococcus,* o que difere do nosso estudo, onde *Lactococcus* foi o principal gênero identificado. Essa diferença provavelmente ocorre devido às diferenças entre os grãos de kefir – rico em bactérias do gênero *Lactobacillus* - e o produto fermentado – com predomínio de bactérias do gênero *Lactococcus.* Gao; Zhang (2019) e Dobson *et al.* (2011), encontraram resultados semelhantes ao presente estudo, observando nos grãos *Lactobacillus* como gênero dominante e no leite fermentado *Lactococcus* como principal gênero. Esses resultados evidenciam que a microbiota do kefir e dos grãos são bastante distintas. Em relação às leveduras, Gao e Zhang (2019) não encontraram diferenças significativas, sendo o *Kazachstania* o gênero predominante, tanto nos grãos quanto no leite fermentado, seguido por menor número dos gêneros *Kluyveromyces* e *Saccharomyces*. Esses resultados também mostram que a composição microbiológica de grãos de kefir oriundas de diferentes localidades podem variar, devido a fatores como a origem dos grãos, os métodos de produção e o tipo de leite utilizado, como já foi abordado aqui (GRANATO, 2007).

O kefir possui diversos micro-organismos que podem auxiliar na digestão da lactose, tendo o gênero *Lactococcus* uma alta capacidade de digeri-la (YERLIKAYA, 2019; REA *et al.*, 1996). Pessoas com intolerância à lactose apresentam atividade insuficiente no intestino da enzima β-galactosidase. A diminuição do teor de lactose pelas bactérias presentes no kefir e a presença de atividade da enzima β-galactosidade o torna favorável para o consumo por pessoas que possuem intolerância à lactose (FARNWORTH; MAINVILLE, 2003; SARKAR, 2007).

As BAL podem produzir diversas substâncias com atividade antimicrobiana, como por exemplo bacteriocinas, que são compostos proteicos que inibem patógenos (KOJIC *et al.*, 2007). Yerlikaya (2019) mostrou que BAL do gênero *Lactococcus* isoladas de grãos de kefir tiveram efeitos contra *Salmonella Enterica* e *L.* monocytogenes. Carasi *et al.* (2015) avaliaram em camundongos o consumo de kefir contendo uma espécie do gênero *Lactobacillus* e consideraram esse kefir adequado para ser usado em distúrbios inflamatórios intestinais. Zheng *et al.* (2013) mostraram que em ratos a ingestão de BAL isoladas de grãos de kefir levou ao aumento de HDL e na redução de colesterol total sérico e hepático, triglicerídeos e LDL. Gamba *et al*. (2020) encontraram em grãos de kefir inoculados em leite, bactérias dos gêneros *Lactococcus*, *Lactobacillus* e *Acetobacter*, sendo *Lactococcus* o principal gênero de BAL encontrado, e leveduras dos gêneros *Kazachstania*, *Saccharomyces, Pichia e Galactomyces.* O kefir apresentou atividade antioxidante e também antimicrobiana contra *Escherichia coli, Salmonella Typhimurium e Staphylococcus aureus.* Em estudo feito por Rodrigues *et al.* (2005), foi testada a atividade cicatrizante do kefir e do kefiran (exopolissacarídeos produzidos por alguns *Lactobacillus* isolados de grãos de kefir), a partir de uma pomada à base de kefir. Neste mesmo estudo também foi verificada propriedade antimicrobiana e anti-inflamatória.

De acordo com Marquina *et al.* (2002), o consumo de kefir por camundongos teve uma influência significativa na composição da microbiota intestinal, pois aumentou significativamente a contagem de BAL na mucosa intestinal e reduziu as populações de *Enterobacteriaceae* e *Clostridium*. Rattray; O'Connel (2011) indicaram que o kefir possui propriedades moduladoras da microbiota intestinal, além de propriedades anticarcinogênicas, antibacterianas e redutoras de colesterol. Propriedades antitumorais do kefir também foram observadas em outros estudos, que concluíram que estas podem ser devido aos micro-organismos ou ao kefiran produzidos durante o processo de fermentação, principalmente os *Lactobacillus* (LIU *et al.*, 2002; SANTOS *et al.,* 2003).

CONCLUSÃO

Nossos resultados indicam que há manutenção da contagem microbiológica do kefir de leite durante um período de 35 dias. Foram encontrados micro-organismos probióticos, apresentando-se em contagem adequada, segundo entidades reguladoras, sendo os gêneros bacteriano e fúngico predominantes, *Lactococcus* e *Aspergillus,* respectivamente. Assim, o kefir de leite constitui uma opção probiótica interessante e de baixo custo.

REFERÊNCIAS

BENGOA, A. A. *et al.* Kefir micro-organisms: their role in grain assembly and health properties of fermented milk. **Journal of Applied Microbiology**, v. 126, n. 3, p. 686-700, 2018. DOI: 10.1111/jam.14107

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, n. 181, p. 14, 18 set. 2003.

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.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 135, de 08 de fevereiro de 2017. Altera a Portaria SVS/MS nº 29, de 13 de janeiro de 1998, que aprova o regulamento técnico referente a alimentos para fins especiais, para dispor sobre os alimentos para dietas com restrição de lactose. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, n. 29, p. 44, 09 fev. 2017.

CAETANO, D. R.; MONTANHINI, M. T. M. Análise microbiológica de leite fermentado kefir produzido com leite contaminado por *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos**, v. 5, n. 1, p. 33-38, 2014. DOI: 10.14685/rebrapa.v5i1.158

CARASI, P. *et al.* Impact of kefir derived *Lactobacillus kefiri* on the mucosal immune response and gut microbiota. **Journal of Immunology Research**, v. 2015, p. 1-12, 2015. DOI: 10.1155/2015/361604

CEVIKBAS, A. *et al.* Antitumoural antibacterial and antifungal activities of kefir and kefir grain. **Phytotherapy Research**, v. 8, n. 2, p. 78-82, 1994. DOI: 10.1002/ptr.2650080205

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **Milk and Milk Products**. 2. ed. Roma: World Health Organization (WHO); Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2011. 248 p.

DE VRESE, M.; KELLER, B.; BARTH, C. A. Enhancement of intestinal hydrolysis of lactose by microbial beta-galactosidase (EC 3.2.1.23) of kefir. **British Journal of Nutrition**, v. 67, n. 1, p. 67-75, 1992. DOI: 10.1079/BJN19920009

DIAS, P. A. *et al.* Propriedades antimicrobianas do *kefir*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 83, p. 1-5, 2016. DOI: 10.1590/1808-1657000762013

DOBSON, A. *et al.* High-throughput sequence-based analysis of the bacterial composition of kefir an associated kefir grain. **FEMS Microbiology Letters**, v. 320, n. 1, p. 56-62, 2011. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2011.02290.x

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Probiotics in Food. Health and Nutritional Properties and Guidelines for Evaluation.** Roma: FAO, 2006, 56 p.

FARNWORTH, E. R.; MAINVILLE, I. Kefir - A fermented milk product. *In:* FARNWORTH, E. R. **Handbook of Fermented Functional Foods**. Boca Raton: CRC Press, 2003. p. 77-111.

FRANCO, B. D. G. M. **Microbiologia dos Alimentos.** São Paulo: Atheneu, 1996. 182p.

GAMBA, R. R. *et al.* Chemical, microbiological, and functional characterization of kefir produced from cow's milk and soy milk. **International Journal of Microbiology**, v. 2020, p. 1-11, 2020. DOI: 10.1155/2020/7019286

GAO, W.; ZHANG, L. Comparative analysis of the microbial community composition between Tibetan kefir grains and milks. **Food Research International**, v. 116, p. 137-144, 2019. DOI: 10.1016/j.foodres.2018.11.056

GARROTE, G. L.; ABRAHAM, A. ANTONI, G. L. Characteristics of kefir prepared with different grain [ratio] milk ratios. **Journal of Dairy Research**, v. 65, n. 1, p. 149-154, 1998. DOI: 10.1017/S0022029997002677

GRANATO, D. Leites fermentados: algumas considerações. **Revista Leite e Derivados**, v. 16, n. 100, p. 16-33, 2007.

GUO, Z. *et al*. Influence of consumption of probiotics on the plasma lipid profile: a meta-analysis of randomised controlled trials. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 21, n. 11, p. 844-850, 2011. DOI: 10.1016/j.numecd.2011.04.008

HELRICH, K. (ed.). **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC)**. 15. ed. Arlington: AOAC, 1990.

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, n. 5, p. 582-587, 2003. DOI: 10.1053/jada.2003.50111

HORWITZ, W.; LATIMER Jr., G. W. (ed.). **Official methods of analysis of AOAC International**. 18. ed. Gaithersburg: AOAC International, 2005.

HONG, W. S. *et al*. The antiallergic effect of kefir lactobacilli. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 8, p. H244-H253, 2010. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2010.01787.x

IBBA, M. P.; ELASKY, K. **Basic and Practical Microbiology Lab Manual.** 1. ed. rev. [*s. l.*]: Cognella Academic Publishing, 2018. 344 p.

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

KIM, D. H. *et al.* Detection and enumeration of lactic acid bacteria, acetic acid bacteria and yeast in kefir grain and milk using quantitative Real-Time PCR. **Journal of Food Safety**, v. 35, n. 1, p. 102-107, 2015. DOI: 10.1111/jfs.12153

KOJIC, M. *et al.* Characterization of *Lactococci* isolated from homemade kefir. **Archives of Biological Sciences**, v. 59, n. 1, p. 13-22, 2007. DOI: 10.2298/ABS0701013K

KORSAK, N. *et al.* Short communication: Evaluation of the microbiota of kefir samples using metagenetic analysis targeting the 16S and 26S ribosomal DNA fragments. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 6, p. 3684-3689, 2015. DOI: 10.3168/jds.2014-9065

LEE, M. Y. *et al*. Anti-inflammatory and anti-allergic effects of kefir in a mouse asthma model. **Immunobiology**, v. 212, n. 8, p. 647-654, 2007. DOI: 10.1016/j.imbio.2007.05.004

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

LIU, J. R. *et al*. Antitumor activity of milk kefir and soy milk kefir in tumor-bearing mice. **Nutrition and Cancer**, v. 44, n. 2, p. 183-187, 2002. DOI: 10.1207/S15327914NC4402_10

LIU, J-R *et al*. Antioxidative activities of kefir. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 18, n. 4, p. 567-573, 2005. DOI: 10.5713/ajas.2005.567

MAGALHÃES, K. T. **Caracterização microbiológica e química da bebida kefir de leite e açúcar mascavo.** 2008. 108 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

MARQUINA, D. *et al.* Dietary influence of kefir on microbial activities in the mouse bowel. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, n. 2, p. 136-140, 2002. DOI: 10.1046/j.1472-765X.2002.01155.x

MEHTA, B. M. Chemical composition of milk and milk products *In:* CHEUNG, P. C. K.; MEHTA, B. M. **Handbook of Food Chemistry.** Heidelberg: Springer, 2015. p. 511-553.

MIGUEL, M. G. C. P. *et al.* Diversity of bacteria present in milk kefir grains using culture-dependent and culture-independent methods. **Food Research International**, v. 43, n. 5, p. 1523-1528, 2010. DOI: 10.1016/j.foodres.2010.04.031

OTLES, S.; CAGINDI, O. Kefir: A probiotic dairy-composition, nutritional and therapeutic aspects. **Food Engineering Department**, v. 2, n. 2, p. 54-59, 2003. DOI: 10.3923/pjn.2003.54.59

QUAST, C. *et al.* The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, v. D1, p. D590-D596, 2012. DOI: 10.1093/nar/gks1219

RATTRAY, F. P.; O'CONNELL, M. J. Fermented milks kefir. *In:* FUKAY, J. W. (ed.). **Encyclopedia of Dairy Sciences**. 2. ed. San Diego: Academic Press, 2011. p. 518-524.

REA, M. C. *et al.* Irish kefir-like grains: their structure, microbial composition and fermentation kinetics. **Journal of Applied Bacteriology,** v. 81, n. 1, p. 83-94, 1996. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1996.tb03286.x

RODRIGUES, K. L. *et al*. Antimicrobial and healing activity of kefir and kefiran extract. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 25, n. 5, p. 404-408, 2005. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2004.09.020

RODRIGUES, K. L.; CARVALHO, J. C.; SCHNEEDORF, J. M. Antiinflamatory properties of kefir and its polysaccharide extract. **Inflammopharmacology**, v. 13, p. 485-492, 2005. DOI: 10.1163/156856005774649395

ROSA, D. D. *et al*. Milk Kefir: nutritional, microbiological and health benefits. **Nutrition Research Reviews**, v. 30, n. 1, p. 82-96, 2017. DOI: 10.1017/S0954422416000275

SANTOS, A. *et al.* The antimicrobial properties of different strains of *Lactobacillus* spp. isolated from kefir. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 26, n. 3, p. 434-437, 2003. DOI: 10.1078/072320203322497464

SARKAR, S. Potential of kefir as a dietetic beverage - a review. **British Food Journal,** v. 109, n. 4, p. 280-290, 2007. DOI: 10.1108/00070700710736534

SCHLOSS, P. D. *et al.* Introducing Mothur: open-source, platform independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 23, p. 7537-7541, 2009. DOI: 10.1128/AEM.01541-09

SIMOVA, E. *et al.* Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 1, p. 1-6, 2002. DOI: 10.1038/sj/jim/7000186

VINDEROLA, C. G. *et al*. Immunomodulating capacity of kefir. **Journal of Dairy Research,** v. 72, n. 2, p. 195-202, 2005. DOI: 10.1017/S0022029905000828

WESCHENFELDER S. *et al.* Caracterização físico-química e sensorial de kefir tradicional e derivados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 2, p. 473-480, 2011. DOI: 10.1590/S0102-09352011000200027

WILLIAMS, S. (ed.). **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC)**. 14th ed. Washington: AOAC, 1989.

YERLIKAYA, O. Probiotic potential and biochemical and technological properties of *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis* strains isolated from raw milk and kefir grains. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 1, p. 124-134, 2019. DOI: 10.3168/jds.2018-14983

ZHENG, Y. *et al.* Probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from Tibetan kefir grains. **Plos One**, v. 8, n. 7, p. 1-8, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0069868