REVISTA
DO INSTITUTO DE LATICÍNIOS CÂNDIDO TOSTES
v. 77, n. 4, out-dez 2022

Artigo DOI: 10.14295/2238-6416.v77i4.898

CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA DE KEFIR DE LEITE DE VACA PRODUZIDO COM GRÃOS OBTIDOS DE CULTIVO DOMÉSTICO

Microbiological and physicochemical characteristics of cow's milk kefir produced with grains obtained from domestic cultivation

Victor Maximiliano Reis Tebaldi[1], Victória Macena Rodrigues[1], Jonathan Neves de Carvalho Alves[2], Moysés Estevão de Souza Freitas Pehrson[3], Ariane Maria de Lacerda Braga[3]*

RESUMO

Kefir é uma bebida fermentada tradicional originária de regiões do Cáucaso e da Europa Oriental, produzida pela adição direta de grãos de kefir ao leite. O estudo visou avaliar as características microbiológicas e físico-químicas de bebidas elaboradas com grãos obtidos de cultivo doméstico. As bebidas foram preparadas a partir da inoculação dos grãos em leite UHT integral na proporção 1:15 (p/v), fermentadas por 24 h e filtradas para separação dos grãos. Bactérias lácticas foram quantificadas em Ágar MRS e a contagem de leveduras em Ágar BDA. A enumeração de coliformes totais e termotolerantes foi realizada pela técnica dos tubos múltiplos em Caldo VB e EC. A acidez titulável foi determinada por titulometria com solução de NaOH 0,1N. O teor de lactose foi determinado pelo método de Fehling. Foi constatada a presença de coliformes totais em três amostras e coliformes termotolerantes em apenas uma. Menores teores de lactose foram observados nas amostras com maior crescimento de bactérias lácticas e leveduras. Maiores teores de acidez titulável foram observados nas amostras que apresentaram menores valores de pH e maior crescimento de bactérias lácticas. A maioria das amostras atende aos parâmetros estabelecidos para contagem de bactérias lácticas. Duas amostras apresentaram contagem de leveduras < 10 UFC/mL. A presença de coliformes em três

---

1 Centro Universitário de Barra Mansa, Curso de Nutrição, Rua Vereador Pinho de Carvalho, 267, Centro, CEP 27.330-550, Barra Mansa, RJ, Brasil. E-mail:victormaxibio@yahoo.com.br
2 Universidade Federal de Lavras, Departamento de Ciência dos Alimentos, Lavras, MG, Brasil.
3 Centro Universitário de Barra Mansa, Departamento de Laboratórios Multidisciplinares, Barra Mansa, RJ, Brasil.

*Autor para correspondência

Recebido / Received: 27/10/2021
Aprovado / Approved: 25/04/2022

amostras revela falhas nas condições higiênicas durante os repasses contínuos ou ainda nas etapas de manipulação ou armazenamento. Ressalta-se a importância da adoção de boas práticas higiênicas durante a obtenção dos grãos e elaboração da bebida, visando um produto seguro para o consumo.

Palavras-chave: leite fermentado; probióticos; saúde; bactéria ácido láctica; coliforme.

ABSTRACT

Kefir is a traditional fermented drink originating from regions of the Caucasus and Eastern Europe, produced by directly adding kefir grains to milk. The study aimed to evaluate the microbiological and physicochemical characteristics of beverages made with grains obtained from domestic cultivation. Beverages were prepared by inoculating the grains in UHT whole milk in a 1:15 (w/v) ratio, fermented for 24h, and filtered to separate the grains. Lactic bacteria were quantified on MRS Agar and yeast counts on BDA Agar. Enumeration of total and thermotolerant coliforms was performed using the multiple tube technique in Broth VB and EC, respectively. The titratable acidity was determined by titration with 0.1N NaOH solution. The lactose content was determined by the Fehling method. The presence of total coliforms was found in three samples and thermotolerant coliforms in just one. Lower levels of lactose were observed in samples with higher growth of lactic acid bacteria and yeasts. Higher levels of titratable acidity were observed in samples that presented lower pH values and higher growth of lactic acid bacteria. Most samples meet the established parameters for counting lactic acid bacteria. Two samples showed yeast count < 10 CFU/mL. The presence of coliforms in three samples reveals flaws in the hygienic conditions during the continuous transfers or even in the handling or storage stages. It is important to emphasize adopting of good hygienic practices when obtaining the grains and making the drink, aiming at a safe product for consumption.

Keywords: fermented milk; probiotics; health; lactic acid bacteria; coliform.

INTRODUÇÃO

O kefir é uma bebida de leite fermentado com sabor ácido leve, viscosa, autocarbonatada, levemente alcoólica, produzida pela ação de bactérias lácticas, leveduras e bactérias acéticas que residem de maneira simbiótica, incorporadas em uma matriz de proteína e polissacarídeo resiliente e insolúvel, conhecida como "grão kefir" (NIELSEN *et al*., 2014; AHMED *et al*., 2013; VARDJAN *et al*., 2013). O nome kefir deriva da palavra turca *keyif*, que significa "sentir-se bem" (LOPITZ-OTSOA *et al*., 2006; WSZOLEK *et al*., 2006), devido ao senso geral de saúde e bem-estar gerado naqueles que o consomem (ROSA *et al*., 2017).

Embora tenha sido amplamente consumido na Rússia e nos países da Ásia central, como o Cazaquistão e o Quirguistão, há séculos, agora é cada vez mais popular nos países europeus, no Japão e nos Estados Unidos devido a seus efeitos nutricionais e terapêuticos. No Brasil, o consumo do kefir vem crescendo. Apesar de já existir a produção industrial, ainda que regional, na maioria das vezes os grãos de kefir são doados e a produção ocorre de maneira artesanal nas residências, para consumo próprio, sem haver, portanto, uma padronização na elaboração do kefir e condições higiênicas de manipulação (OTLES; CAGINDI, 2003).

O kefir pode ser produzido a partir de leite pasteurizado, semidesnatado ou desnatado de vaca, cabra, ovelha ou búfala, sendo o kefir de leite de vaca o mais comum. Os grãos de kefir podem ser adicionados ao substrato de fermentação como uma cultura iniciadora. A fermentação ocorre tipicamente em temperaturas que variam de 8 a 25°C, em um recipiente parcialmente fechado, em um tempo variável de 10 a 40 horas. No entanto, o tempo de incubação mais comum é de 24 h (ROSA *et al*., 2017).

Em relação à sua composição, normalmente o kefir contém 89-90% de umidade, 0,2% de lipídios, 3,0% de proteína, 6,0% de açúcar,

0,7% de cinzas, 1,0% de ácido láctico e álcool, 1,98 g/L de CO_2 (SARKAR, 2007). Além desses compostos, o kefir também contém vários compostos aromáticos, como acetaldeído, diacetil e acetoína (POGAČIĆ *et al*., 2013).

No que concerne às suas características microbiológicas, o kefir possui microbiota diversificada e complexa, predominantemente constituída por espécies definidas e indefinidas de leveduras e bactérias e em quantidades variáveis (AHMED *et al*., 2013).

Independentemente do método de fabricação e tipo de cultura, de acordo com o padrão do *Codex Allimentarius* (Codex Stan 243-2003), uma população microbiana típica de kefir deve conter *Lactobacillus kefiri*, bem como espécies dos gêneros *Leuconostoc, Lactococcus e Acetobacter* (preparadas a partir de grãos de kefir) e leveduras que fermentam lactose (*Kluyveromyces marxianus*), bem como leveduras que não fermentam lactose (*Saccharomyces cerevisiae e Saccharomyces exiguus*) quando grãos de kefir são utilizados para a cultura (POGAČIĆ *et al*., 2013).

Witthuhn *et al*. (2004) relatam que os níveis de bactérias ácido lácticas (BAL) e leveduras presentes nos grãos de kefir variam amplamente, alcançando de $6,4 \times 10^4$ UFC/mL a $8,5 \times 10^8$ UFC/mL e $1,5 \times 10^5$ UFC/mL a $3,7 \times 10^8$ UFC/mL, respectivamente.

Em um curto período, os grãos de kefir bem tratados serão multiplicados. O kefir contém bactérias vivas benéficas que podem colonizar o trato intestinal e leveduras benéficas que dominam, controlam e eliminam leveduras destrutivas no corpo. O pequeno tamanho de coalhada do kefir facilita a digestão e contém lactase, a enzima necessária para digerir a lactose, bem como muitas vitaminas e minerais, incluindo cálcio, fósforo, magnésio, vitaminas B_2 e B_{12}, vitamina K, vitamina A e vitamina D. Ele também contém triptofano, aminoácido essencial conhecido por seu efeito relaxante no sistema nervoso (LENGKEY *et al*., 2013).

Diante do exposto, este trabalho visou caracterizar do ponto de vista microbiológico e físico-químico amostras de kefir elaboradas com grãos provenientes de cultivo doméstico.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção dos grãos de kefir

Os grãos de kefir foram adquiridos em três cidades do Sul Fluminense-RJ, por meio de doações provenientes de cultivo doméstico, acondicionados em caixa isotérmica com gelo e imediatamente conduzidos ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Centro Universitário de Barra Mansa. As coletas ocorreram no período de março a agosto de 2020.

Preparação do kefir

Os grãos de kefir de diferentes cultivos domésticos foram ativados em leite de vaca UHT integral a 25°C em vidraria estéril num total de três ciclos sucessivos de 24 horas. Após 24 horas de fermentação foi realizada a filtração em peneira estéril para a separação dos grãos, e estes transferidos para outro recipiente estéril com nova adição de leite UHT a cada ciclo de 24 horas (CHEN *et al*., 2008).

Após 72 horas de ativação, os grãos foram pesados e novamente inoculados em leite UHT na proporção 1:15 (p/v), padronizado para as análises, em frasco esterilizado e incubados a 25°C por 24 horas em condições aeróbias. Após a fermentação procedeu-se a filtração da bebida em peneira esterilizada, para a separação dos grãos e realização das análises microbiológicas e físico-químicas.

Análises microbiológicas

Alíquotas de 1 mL de cada unidade experimental das bebidas foram homogeneizadas em 9 mL de água peptonada 0,1% (p/v) com posteriores diluições seriadas para as contagens de bactérias lácticas, leveduras e pesquisa de coliformes. Todas as análises microbiológicas foram conduzidas em triplicata de acordo com ICMSF (2000).

Quantificação de bactérias lácticas

A contagem de bactérias lácticas nas bebidas foi realizada pelo método de

plaqueamento em profundidade (*pour plate*) em ágar MRS, em triplicata. Transferiu-se 1 mL das diluições para placas de Petri estéreis e o meio de cultura previamente fundido a 45°C foi adicionado seguido de homogeneização com movimentos circulares suaves. Após a solidificação, uma sobrecamada de Ágar MRS foi adicionada à placa. Após solidificação da sobrecamada, as placas foram incubadas a 30°C por 72 horas. As colônias desenvolvidas no meio de cultura foram selecionadas e submetidas à coloração de Gram e teste de catalase para confirmação. As culturas de bactérias Gram positivas (cocos ou bastonetes) catalase negativa foram consideradas como bactérias lácticas.

Contagem de leveduras

Para a enumeração de leveduras as amostras foram plaqueadas em Ágar Batata Dextrose (BDA), acrescido de ácido tartárico 10% esterilizado por filtração, empregando-se o método de plaqueamento em superfície com auxílio de alça de Drigalsky, seguido de incubação a 25°C por 5 dias. As colônias crescidas em Ágar BDA foram submetidas ao exame microscópico a fresco em lâminas contendo corante azul de metileno para confirmação da morfologia.

Enumeração de coliformes

Para enumeração de coliformes empregou-se a técnica dos tubos múltiplos para determinação do número mais provável (NMP), transferindo-se alíquotas de 1 mL das diluições para séries de três tubos de Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) e incubação a 37°C/24-48 horas. Foram considerados positivos os testes que apresentaram produção de gás nos tubos de Durham. A partir dos tubos positivos de caldo LST foram transferidas alíquotas com alça de níquel-cromo para tubos contendo Caldo Bile Verde Brilhante (VB) e *Caldo Escherichia coli* (EC), para a realização de testes confirmativos para coliformes totais e termotolerantes, respectivamente. Os tubos contendo caldo VB foram incubados a 37°C/24-48 horas e caldo EC a 44,5°C/24-48 horas. Foram considerados positivos os testes que apresentaram produção de gás nos tubos de Durham. Para confirmação da presença de *E. coli*, alíquotas foram transferidas com auxílio de alça bacteriológica dos tubos considerados positivos do caldo EC para placas contendo Ágar EMB. Foram consideradas positivas as placas nas quais após a incubação de 37°C/24-48 horas apresentaram formação de colônias pequenas, esféricas, com precipitado negro no centro e brilho verde metálico. As colônias características de *E. coli* crescidas em Ágar EMB foram repicadas para tubos contendo Ágar TSA (Ágar Tripticase de Soja) inclinado. Procedeu-se incubação em estufa por 24 horas a 37°C. As culturas crescidas em Ágar TSA inclinado foram submetidas as seguintes provas bioquímicas: indol; vermelho de metila (VM); Voges Proskauer (VP); e citrato. Este grupo de provas é denominado IMViC (SILVA *et al*., 2010).

Análises físico-químicas

As análises físico-químicas das diferentes bebidas obtidas foram realizadas em duplicata no Laboratório de Análises Físico-químicas do Centro Universitário de Barra Mansa.

Lactose

A lactose foi quantificada pelo método de Fehling, havendo redução dos íons cúpricos (solução de sulfato de cobre) a cuprosos pela lactose (açúcar redutor) em meio alcalino, a quente. Para a alcalinização do meio, empregou-se solução de hidróxido de sódio, adicionada de agente complexante (tartarato de potássio) que impede o consumo de cobre (II) para a formação de hidróxido cúprico (PEREIRA *et al*., 2001).

Acidez titulável

A acidez titulável foi determinada por titulometria com solução de NaOH 0,1N, utilizando como indicador a fenolftaleína, sendo o resultado expresso em porcentagem de ácido láctico (PEREIRA *et al*., 2001).

pH

A medida do pH foi determinada por meio do pHmetro digital (Orion Star A111), devidamente calibrado. O eletrodo foi imerso em cada uma das amostras e os resultados apresentados em sua tela.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análises microbiológicas

Coliformes são bactérias Gram negativas, não formadoras de esporos, em forma de bastonete, aeróbicas ou facultativamente anaeróbicas e produzem ácidos e gases pela fermentação da lactose em 48 horas. O termo coliforme é usado no campo da bacteriologia da higiene alimentar e inclui muitas Enterobacteriaceae, como espécies dos gêneros *Citrobacter*, *Enterobacter, Escherichia e Klebsiella* (TOMINAGA, 2019).

Nesta pesquisa evidenciou-se a presença de coliformes totais em 25% das amostras analisadas e coliformes termotolerantes em 8,3% das amostras. Não foi confirmada a presença de E. *coli* em nenhuma das amostras após realização do teste IMViC. Os resultados das contagens estão expressos na Tabela 1.

Tabela 1. Contagem de coliformes, leveduras e bactérias lácticas em kefir elaborado com grãos obtidos de cultivo caseiro

Amostra	Coliformes totais (NMP/mL)	Coliformes termo-tolerantes (NMP/mL)	Leveduras (UFC/mL)	Bactérias Lácticas (UFC/mL)
01	$\geq 2{,}4\times10^3$	$\geq 2{,}4\times10^3$	< 10	$5{,}1\times10^8$
02	Ausência	Ausência	$5{,}6\times10^5$	$1{,}3\times10^9$
03	Ausência	Ausência	$4{,}4\times10^5$	$1{,}5\times10^7$
04	Ausência	Ausência	$4{,}0\times10^5$	$5{,}8\times10^8$
05	$\geq 2{,}4\times10^3$	Ausência	$2{,}0\times10^4$	$3{,}5\times10^9$
06	$1{,}3\times10^3$	Ausência	$3{,}6\times10^4$	$3{,}6\times10^6$
07	Ausência	Ausência	$6{,}0\times10^4$	$7{,}5\times10^8$
08	Ausência	Ausência	$2{,}2\times10^6$	$1{,}0\times10^9$
09	Ausência	Ausência	< 10	$1{,}2\times10^8$
10	Ausência	Ausência	$1{,}0\times10^6$	$1{,}9\times10^7$
11	Ausência	Ausência	$7{,}6\times10^5$	$9{,}2\times10^8$
12	Ausência	Ausência	$5{,}6\times10^5$	$9{,}0\times10^7$

Em uma investigação conduzida por Cetinkaya; Mus (2012), Enterobacteriaceae foram encontrados em 10% das amostras, com contagem média de $7{,}3\times10^3$ UFC/mL. Os mesmos autores citam um estudo conduzido por Dinç (2008), no qual sugeriu que a contagem média de Enterobacteriaceae em 120 amostras de kefir adquiridas em supermercados em Ancara foi $1{,}2\times10^2$ UFC/mL. Os níveis de contaminação por coliformes obtidos no presente trabalho assemelham-se aos relatados por Cetinkaya; Mus (2012) e maiores que os encontrados por Dinç (2008).

Usando métodos metagenômicos independentes de cultura, Gao *et al*. (2013) identificaram *Shewanella, Acinetobacter, Pelomonas, Dysgonomonas, Weissella e Pseudomonas* pela primeira vez em grãos de kefir tibetanos. Dobson *et al*. (2011) detectaram *Pseudomonas* sp. e membros das famílias Enterobacteriaceae e Clostridiaceae em amostras de kefir.

O consumo do kefir no Brasil tem obtido exponencial aumento, devido aos seus benefícios e baixo custo. A sua principal forma de aquisição para o consumo consiste na doação dos grãos de kefir, feita através de repasse em potes de vidros ou saquinhos, podendo ser preparado e manuseado em casa. Por meio destes múltiplos repasses, pela forma de armazenamento e pelo método de manuseio, que muitas vezes não seguem critérios de boas práticas de higiene e

manipulação de alimentos, o produto pode ser alterado, originando produtos não padronizados, podendo apresentar alterações em sua composição e na sua qualidade microbiológica (GHEDINI *et al*., 2020), devendo ser considerado um ponto crítico de controle para o risco de contaminação.

Historicamente, as bactérias coliformes foram utilizadas como indicadores de contaminação fecal. No entanto, como essas bactérias são amplamente distribuídas na natureza, independentemente das fezes, elas agora são consideradas indicadores sanitários. Além disso, os coliformes produzem sabores estranhos, por isso também são usados como indicadores de qualidade. Assim, os níveis de bactérias coliformes são comumente medidos em produtos cárneos, frutos do mar, sobremesas congeladas, refrigerantes e laticínios (TOMINAGA, 2019).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 241, de 26 de julho de 2018, que dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos, porém ainda não foram estabelecidos critérios para a padronização do cultivo de kefir e para os repasses entre a população (BRASIL, 2018).

Embora não haja critérios para padronização do cultivo e produção do kefir no Brasil, se tomarmos por base a Instrução Normativa nº 60, de 23 de novembro de 2019 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), ela estabelece como aceitável até 10 NMP de *Escherichia coli* em leite fermentado. Desta forma, o valor de coliformes termotolerantes encontrado não extrapolou o limite recomendado para *E. coli.* Salienta-se que esta mesma resolução não estabelece limite para coliformes totais nesse tipo de bebida (BRASIL, 2019).

Mesmo que os coliformes e *E. coli* estejam presentes em pequena contagem, isso pode ser uma consequência de baixo nível de higiene no processo de fabricação, incluindo os manipuladores, qualidade da água utilizada e dos utensílios (PĂUCEAN *et al*., 2012).

As leveduras são reconhecidas por desempenhar um papel fundamental na preparação de produtos lácteos fermentados, onde fornecem nutrientes essenciais para o crescimento, como aminoácidos e vitaminas, alteram o pH, secretam etanol e produzem CO_2. As leveduras no kefir são menos estudadas do que as bactérias, embora as leveduras nos grãos forneçam claramente um ambiente favorável para o crescimento das bactérias do kefir, produzindo metabólitos que contribuem para o sabor e textura na boca (ARSLAN, 2015).

Neste trabalho foram observadas contagens de leveduras variando de $2{,}0\times10^4$ a $2{,}2\times10^6$ UFC/mL. Duas amostras de kefir (16,6%) apresentaram contagem de leveduras < 10 UFC/mL, portanto, fora dos padrões de contagem recomendados na literatura. Conforme expresso na Tabela 1, as bebidas que apresentaram contaminação por coliformes foram aquelas que apresentaram contagem de leveduras < 10 UFC/mL ou presença em menores contagens. Esses resultados se assemelham aos relatados por Păucean *et al*. (2012) e estão de acordo com o valor recomendado por Pogačić *et al*. (2013), os quais citam que o número de leveduras no kefir não deve ser inferior a 10^4 UFC/mL.

A temperatura de armazenamento anterior ao repasse pode influenciar a contagem de leveduras no kefir, o congelamento dos grãos, por exemplo, é capaz de prejudicar a qualidade e quantidade das leveduras presentes nos mesmos (FARNWORTH; MAINVILLE, 2008; GARROTE el al., 1997). Setyawardani; Sumarmono (2015) observaram que o crescimento de leveduras foi minimizado quando o kefir foi armazenado em temperatura abaixo de 0°C. Quanto maior a temperatura durante o armazenamento, maior a atividade metabólica e o crescimento das leveduras.

Farnworth; Mainville (2008) também citam que ao comparar o crescimento de forma isolada das bactérias naturalmente presentes no kefir, em relação ao seu crescimento quando as leveduras são adicionadas ao meio, observou-se que o crescimento de forma isolada foi prejudicado, ressaltando que a presença das leveduras

encontradas nos grãos são fundamentais para garantir a integridade e a viabilidade da microbiota, já que a simbiose encontrada no kefir permite a manutenção de uma uniformidade no perfil microbiológico.

De acordo com a Instrução Normativa nº 46 de 2007 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que regulamenta identidade e qualidade de leites fermentados, a quantidade mínima para contagens de bactérias lácticas em kefir é 10^7 UFC/mL (BRASIL, 2007). No presente estudo, apenas uma amostra não atingiu a quantidade mínima necessária para atender aos padrões, correspondendo a 8,3% do total de amostras.

A contagem de bactérias lácticas variou entre $3{,}6\times10^6$ e $3{,}5\times10^9$ UFC/mL, apenas a amostra 06 (8,3%) apresentou valor abaixo do mínimo recomendado para este grupo de microrganismos.

A maior parte das amostras segue o padrão do *Codex Alimentarius* (Codex Stan 243-2003) para contagem de bactérias lácticas, que também estabelece o valor mínimo de 10^7 UFC/mL. Os valores encontrados para esses microrganismos neste trabalho assemelham-se aos relatados por Londero *et al*. (2012); Irigoyen *et al*. (2005); Farnsworth; Mainville, (2008).

O número de microrganismos presentes no kefir é fator fundamental para que lhe seja conferido o status de probiótico natural e que os inúmeros benefícios associados ao seu uso lhe sejam possíveis (LEITE *et al*., 2013a), ou seja, é fundamental que a contagem das bactérias esteja de acordo com os parâmetros, visto que, segundo a definição: probióticos são microrganismos vivos capazes de conferir benefícios à saúde do hospedeiro quando administrados em quantidades adequadas (OSTADRAHIMI *et al*., 2015; COPPOLA; TURNES, 2004).

Análises físico-químicas

Os resultados das análises físico-químicas estão expressos na Tabela 2.

Tabela 1. Resultados das análises físico-químicas realizadas em kefir elaborado com grãos de cultivo caseiro

Amostras	Lactose (%)	pH	Acidez titulável (%)
01	3,60	3,49	1,54
02	1,90	4,25	0,99
03	3,30	4,61	0,68
04	2,30	4,18	1,54
05	3,30	4,36	0,95
06	3,50	4,67	0,77
07	4,30	4,76	0,63
08	2,60	4,13	1,18
09	3,20	3,91	0,90
10	1,76	3,71	0,90
11	2,18	3,50	1,63
12	2,62	3,70	0,81
C	4,70	6,70	0,18

Nota: C = controle (leite)

Após 24 horas de incubação o valor de pH nas bebidas variou entre 3,49 e 4,76. De acordo com Sulmiyati *et al*. (2019), o valor do pH no kefir está fortemente relacionado com o teor de ácidos orgânicos produzidos por via fermentativa.

Maior decréscimo na concentração de

lactose foi observado nas amostras que apresentaram maior crescimento de bactérias lácticas e leveduras. Em algumas amostras observou-se a redução do teor de lactose com menores valores de acidez titulável. Este fato talvez seja explicado pelo maior crescimento da população de leveduras quando comparado às demais amostras. Sabe-se que a fermentação da lactose pelas leveduras diferentemente das bactérias lácticas produz etanol, o que poderia contribuir para menor acidez titulável. Outra possibilidade seria maior porcentagem de bactérias heterofermentativas e consumo de ácido cítrico, com geração de compostos neutros (diacetil, acetoína, 2,3-butanodiol).

Foram obtidos valores de redução de 40,42% e 37,44% no teor de lactose nas amostras 02 e 10, respectivamente. Estes valores são superiores aos relatados por Irigoyen *et al*. (2005), os quais verificaram redução nos níveis de lactose, entre 20-25% em relação ao leite inicial ao compararem com bebidas fermentadas em diferentes concentrações. Teores reduzidos de lactose no kefir o tornam interessante do ponto de vista dietético, sendo uma boa opção para indivíduos que apresentam intolerância à lactose.

Maiores teores de acidez titulável foram observados nas amostras 01, 04, 08 e 11, as quais apresentaram menores valores de pH e maior crescimento de bactérias lácticas. A amostra 01, apresentou valor ≥ $2{,}4\times10^3$ UFC/mL de coliformes totais e termotolerantes, respectivamente. Sabe-se que os coliformes realizam fermentação ácido mista, também fermentam a lactose com produção de CO_2, hidrogênio e diferentes ácidos, como: láctico, acético e fórmico. Desta forma, esses ácidos, juntamente com aquele produzido pelas bactérias lácticas podem contribuir para o aumento da acidez titulável (Tabela 2). Também há possibilidade de maior concentração de bactérias ácido lácticas homofermentativas nas referidas amostras.

Lengkey *et al*. (2013) compararam bebidas com diversas concentrações de grãos de kefir e seus respectivos valores de pH após a fermentação. Estes autores observaram que as bebidas com menores valores de pH, foram as que apresentaram maior concentração de grãos, demonstrando que uma maior quantidade de grãos e, consequentemente, uma maior quantidade de bactérias gera uma maior acidez no produto.

Leite *et al*. (2013b) verificaram a relação entre a redução do pH com o aumento dos níveis de ácido láctico, onde os valores de pH foram reduzindo progressivamente com o passar do tempo, como consequência da produção e acúmulo de ácidos orgânicos resultantes da fermentação das principais bactérias encontradas em amostras de kefir, corroborando assim com os resultados observados no presente estudo.

CONCLUSÃO

Os múltiplos repasses dos grãos de kefir e o modo artesanal pelo qual ele é produzido e consumido na maior parte dos países, inclusive no Brasil, impossibilita a padronização na produção caseira, controle dos grãos e a qualidade da bebida. Este fato foi evidenciado pela variação observada na contagem de bactérias lácticas, leveduras e análises físico-químicas neste trabalho.

A presença de microrganismos do grupo coliformes em parte das amostras analisadas revela falhas nas condições higiênicas durante os repasses contínuos ou ainda nas etapas de manipulação ou armazenamento, havendo a possibilidade de ocorrência de patógenos, oferecendo desta maneira riscos à saúde.

Por não haver regulamentação que estabeleça critérios de qualidade microbiológica para o kefir no Brasil, ressalta-se a importância da adoção de medidas higiênico-sanitárias durante a manipulação e elaboração do produto, visando desta forma a garantia de um produto seguro para o consumo.

REFERÊNCIAS

AHMED, Z. *et al.* Kefir and health: a contemporary perspective. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 53, n. 5, p. 422-434, 2013, DOI: 10.1080/10408398.2010.540360

ARSLAN, S. A review: chemical, microbiological and nutritional characteristics of kefir. **CyTA – Journal of Food**, v. 13, n. 3, p. 340-345, 2015, DOI: 10.1080/19476337.2014.981588

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 241, de 26 julho de 2018. Dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, n. 144, p. 97, 27 jul. 2018

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº 60, de 23 de dezembro de 2019. Estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, n. 249, p. 133, 26 dez. 2019.

CETINKAYA, F.; MUS, T. E. Determination of microbiological and chemical characteristics of kefir consumed in Bursa. **Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, v. 59, n. 3, p. 217-221, 2012, DOI: 10.1501/Vetfak_0000002528

CHEN, H. C.; WANG, S. Y; CHEN. M. J. Microbiological study of lactic acid bacteria in kefir grains by culture-dependent and culture-independent methods. **Food Microbiology**, v. 25, n. 3, p. 492-501, 2008. DOI: 10.1016/j.fm.2008.01.003

COPPOLA, M. M.; TURNES, C. G. Probióticos e resposta imune. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p.1297-1303, 2004, DOI: 10.1590/S0103-84782004000400056

DINÇ, A. **Kefirin bazı mikrobiyolojik ve kimyasal özelliklerinin belirlenmesi**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade de Ankara, Ankara, 2008.

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

FARNWORTH, E. R.; MAINVILLE, I. Kefir – A fermented milk product. *In*: FARNWORTH, E. R. **Handbook of Fermented Functional Food**. Boca Raton: CRC Press, 2008. p. 89-127.

GAO, J. *et al*. Metagenome analysis of bacterial diversity in Tibetan kefir grains. **European Food Research and Technology**, v. 236, p. 549-556, 2013, DOI: 10.1101/2021.03.15.435442

GARROTE, G. L.; ABRAHAM; A. G. ANTONI; G. L. Preservation of kefir grains, a comparative study. **LWT Food Science and Technology**, v. 30, p. 77-84, 1997, DOI: 10.1006/fstl.1996.0135

GHEDINI, T. G. M. *et al*. Qualidade microbiológica do kefir. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 1, p. 4336-4348, 2020, DOI: 10.34117/bjdv6n1-309

ICMSF – INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS. **Microorganismos de los alimentos**: su significado y metodos de emuneración. 2. ed. Zaragoza: Acribia, 2000. 464 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

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, 2013a, DOI: 10.1590/S1517-83822013000200001

LEITE, A. M. O. *et al*. Microbiological and chemical characteristics of Brazilian kefir during fermentation and storage processes. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 7, p. 4149-4159, 2013b, DOI: 10.3168/jds.2012-6263

LENGKEY, H. A. W.; SIWI, J. A.; BALIA, R. L. The effect of various starter dosages on kefir quality. **Lucrări Ştiinţifice-Seria Zootehnie**, v. 59, p. 113-116, 2013.

LONDERO, A. *et al*. Kefir grains as a starter for whey fermentation at different temperatures: chemical and microbiological characterisation. **Journal of Dairy Research**, v. 79, p. 262-271, 2012, DOI: 10.1017/S0022029912000179

LOPITZ-OTSOA, F. *et al.* Kefir: a symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 23, n. 2, p. 67-74, 2006, DOI: 10.1016/s1130-1406(06)70016-x

NIELSEN, B.; GÜRAKAN, G. C.; ÜNLÜ, G. Kefir: a multifaceted fermented dairy product. **Probiotics & Antimicrobial Proteins**, v. 6, p. 123-135, 2014, DOI: 10.1007/s12602-014-9168-0

OSTADRAHIMI, A. *et al.* Effect of probiotic fermented milk (kefir) on glycemic control and lipid profile in type 2 diabetic patients: a randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. **Iranian Journal of Public Health**, v. 44, n. 2, p. 228-237, 2015.

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

PĂUCEAN, A. *et al.* Microbiological quality of a fermented dairy product containing brewer's yeasts. **Journal of Agroalimentary Processes and Technologies**, v. 18, n. 1, p. 56-60, 2012.

PEREIRA, D. B. C. *et al*. **Físico-Química do Leite e Derivados**: Métodos Analíticos. 2. ed. Juiz de Fora: Templo Gráfica e Editora, 2001. 234 p.

POGAČIĆ, T. *et al.* Microbiota of kefir grains. **Mljekarstvo**, v. 63, n. 1, p. 3-14, 2013.

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

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

SETYAWARDANI, T.; SUMARMONO, J. Chemical and microbiological characteristics of goat milk kefir during storage under different temperatures. **Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture**, v. 40, n. 3, p. 183-188, 2015, DOI: 10.14710/jitaa.40.3.183-188

SILVA, N. *et al*. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. 4. ed. São Paulo: Varela, 2010. 624 p.

SULMIYATI. *et al*. Physicochemical, microbiology, and sensory characterization of goat milk kefir in various incubation time. **Buletin Peternakan**, v. 43, n. 3, p. 193-198, 2019, DOI: 10.21059/buletinpeternak.v43i3.37217

TOMINAGA, T. Rapid detection of coliform bacteria using a lateral flow test strip assay. **Journal of Microbiological Methods**, v. 160, p. 29-35, 2019, DOI: 10.1016/j.mimet.2019.03.013

VARDJAN, T. *et al*. Characterization and stability of lactobacilli and yeast microbiota in kefir grains. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 5, p. 2729-2736, 2013, DOI: 10.3168/jds.2012-5829

WSZOLEK, M. *et al*. Production of kefir, koumiss and other related products. *In*: TAMIME, A. Y. **Fermented Milk**. Oxford: Blackwell Science, 2006. p. 174-216.

WITTHUHN, 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, n. 1, 33-37, 2004, DOI: 10.1111/j.1471-0307.2004.0012