

**CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA E
QUÍMICA DA BEBIDA QUEFIR DE LEITE E
AÇÚCAR MASCADO**

KARINA TEIXEIRA MAGALHÃES

2008

KARINA TEIXEIRA MAGALHÃES

**CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA E QUÍMICA DA BEBIDA
QUEFIR DE LEITE E AÇÚCAR MASCADO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador:

Profa. Dra. Rosane Freitas Schwan

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2008

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Magalhães, Karina Teixeira.

Caracterização microbiológica e química da bebida quefir de leite e
açúcar mascavo / Karina Teixeira Magalhães. – Lavras : UFLA, 2008.
108 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2008.
Orientador: Rosane Freitas Schwan.
Bibliografia.

1. Quefir. 2. Bebida fermentada. 3. Análise microbiológica. 4.
Análise química. 5. Microscopia eletrônica de varredura. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 664.024
- 576.163

KARINA TEIXEIRA MAGALHÃES

**CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA E QUÍMICA DA BEBIDA
QUEFIR DE LEITE E AÇÚCAR MASCADO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de “Mestre”.

Aprovada em 4 de março de 2008

Prof. Dr. Henrique César Pereira Figueiredo UFLA

Prof. Dr. Eduardo Alves UFLA

Profa. Dra. Vany Perpétua Ferraz UFMG

Profa. Dra. Rosane Freitas Schwan
UFLA
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

*A minha mãe, Gilda,
pelas orações e conselhos.
A meu pai, Gumercindo, pela criação.
A minha irmã e familiares,
pelo carinho.*

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e pela força para enfrentar todas as dificuldades.

A professora Dra. Rosane Freitas Schwan, pela orientação deste trabalho e por ter confiado em mim. Quero também fazer um agradecimento especial à sua qualidade de ser muito humana. Agradeço pela paciência e dedicação na orientação, pela amizade, pela responsabilidade em transmitir conhecimentos e pelo exemplo de conduta como pesquisadora e professora. Agradeço, principalmente, pela sua presença em minha vida.

À professora Dra. Patrícia Gomes Cardoso, pela atenção, paciência, pelos conhecimentos transmitidos e pela grande amizade.

Ao professor Dr. Romildo da Silva, pelos ensinamentos transmitidos, atenção, brincadeiras e, em especial, pela sua alegria.

Ao professor Dr. Eustáquio Souza Dias, pelos ensinamentos transmitidos, pela atenção e dedicação como educador.

A professora Dra. Vany Ferraz, pela grande ajuda nas análises de cromatografia.

Ao professor Dr. Eduardo Alves, pelos ensinamentos transmitidos e pela ajuda nas análises de microscopia eletrônica de varredura.

Ao amigo Antônio Claret Sales, pela grande ajuda, amizade e incentivo.

À Cooperativa Agrícola Alto Rio Grande Ltda. (CAARG), em Lavras, MG, pela grande colaboração na realização do projeto. Agradeço, em especial, ao seu presidente, Ozani Pereira Barbosa, pela atenção e contribuição.

Aos meus pais, Gumercindo e Gilda e a minha irmã, Kassiana, que sempre acreditaram e apoiaram minhas decisões. Ao meu cunhado, Phillipe, pela amizade e ao Puff, pelo carinho.

A todos os funcionários do Departamento de Biologia da UFLA.

A Magda, pelo companheirismo e prestatividade no desempenho de sua função. Agradeço também pela paciência e amizade.

A Cleuza, Sandra e Tina, pelas análises físico-químicas. Agradeço a dedicação, paciência e amizade.

Ao Paulinho e ao Lamartine, pela ajuda e amizade.

A Ivani, pela imensa ajuda no laboratório. Agradeço, em especial, a sua amizade, atenção e companheirismo.

A Cidinha, pelos ensinamentos, conselhos e amizade.

A Cássia, pela dedicação e empenho durante a identificação das leveduras. Agradeço também pela amizade e preocupação.

Aos meus amigos Whasley e Cristina, pela ajuda nos gráficos e tabelas. Agradeço pelos ensinamentos, pela paciência e pela amizade.

Aos meus companheiros de batalha nas identificações microbianas, Euziclei e Cíntia. Agradeço o companheirismo e a amizade.

A Carla, pela paciência e ensinamentos no início dos meus estudos.

Aos meus amigos Mariana, Gilberto, Mateus Bello, Mateus Augusto e Evânia, que sempre estiveram por perto, em todas as horas.

A meus amigos, colegas e companheiros de laboratório e mestrado: Vívian, Fernanda, Louise, Ana Paula, João Paulo, Pedrinho, Sandra, Rogério, Cláudia, Lucas, Emerson, Maiara, Karol, Karina Herrera, Rômulo, Danila, Carolina, Raquel, Vanessa, Lamartine, Márcia, Gabi, Dany, Gilvani e Thalita.

Aos meus amigos Marcele e Assis, pelo carinho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pelo apoio financeiro.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento desta pesquisa. Agradeço a todos, de coração.

“Porque todos aqueles que pedem recebem; aqueles que procuram acham, e a porta será aberta para quem bate”.

Mateus 7, 8

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Os grãos de quefir: origem evolutiva e um breve histórico.....	3
2.2 A microbiologia do quefir e algumas características.....	5
2.3 Bioquímica do quefir.....	14
2.4 Propriedades terapêuticas do quefir cultivado em leite.....	17
2.5 Processo de produção e preservação na estocagem do quefir.....	20
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
CAPÍTULO 1 - Caracterização microbiológica e química da bebida	
quefir de leite	30
RESUMO	31
ABSTRACT	32
1 INTRODUÇÃO	33
2 MATERIAL E MÉTODOS	35
2.1 Amostragem dos grãos.....	35
2.2 Fermentação do quefir.....	35
2.3 Enumeração de bactérias mesófilas, acetobactérias, bactérias ácidas láticas (BAL) e leveduras.....	35
2.4 Identificação microbiana.....	37
2.5 Observação dos grãos de quefir usando Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	39
2.6 Análises químicas.....	40
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
3.1 Enumeração microbiana.....	42

3.2 Identificação dos isolados microbianos.....	44
3.3 Distribuição da microbiota dos grãos do quefir usando Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	49
3.4 Caracterização química da bebida fermentada quefir.....	55
4 CONCLUSÃO.....	61
AGRADECIMENTOS.....	62
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
CAPÍTULO 2 - Estudo microbiano e químico da bebida quefir de açúcar mascavo.....	68
RESUMO.....	69
ABSTRACT.....	70
1 INTRODUÇÃO.....	71
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	73
2.1 Preparo do inóculo e fermentação do quefir.....	73
2.2 Análises químicas.....	73
2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	74
2.4 Caracterização microbiológica.....	75
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	78
3.1 Composição química da bebida fermentada quefir.....	78
3.2 Observação, enumeração e diversidade microbiana encontrada na bebida fermentada quefir de açúcar mascavo.....	85
4 CONCLUSÃO.....	100
AGRADECIMENTOS.....	101
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	102
ANEXO.....	107
ANEXO A.....	108

RESUMO

MAGALHÃES, Karina Teixeira. **Caracterização microbiológica e química da bebida quefir de leite e açúcar mascavo**. 2008. 108 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil.

Duas bebidas fermentadas com grãos de quefir foram estudadas neste trabalho. As bebidas são popularmente consumidas no Brasil. Os grãos foram inoculados no leite e em solução de açúcar mascavo. O estudo objetivou a identificação microbiológica e à caracterização dos compostos químicos formados durante a fermentação das bebidas. Os grãos de quefir cultivados em leite apresentam associação simbiótica de microrganismos pertencentes a diversas espécies, incluindo bactérias ácido lácticas (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*), leveduras e bactérias ácido acéticas. Os grãos de quefir cultivados em açúcar mascavo são também compostos por uma associação simbiótica de leveduras e bactérias. Os grãos de quefir cultivados em açúcar mascavo e os cultivados em leite são similares em constituição microbiológica, procedimentos de cultivo, em estrutura e constituição química, mas diferem em aspecto visual. A caracterização de microrganismos nas bebidas quefir indicaram a presença de bactérias lácticas (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*), bactérias Gram-positivas, bactérias Gram-negativas e leveduras. O gênero *Lactobacillus* predominou, durante todo o período de fermentação, em ambas as bebidas, sendo, portanto, um grupo de importância, presente nas bebidas quefir. As espécies dominantes foram *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* 1 e *Candida kunwiensis*. Os grãos de quefir do leite e açúcar mascavo indicaram maior colonização de bactérias e leveduras em sua superfície externa, em análises realizadas usando a Microscopia Eletrônica de Varredura. Em análises químicas, foram detectados os ácidos láctico e acético. Etanol também foi encontrado. Três tipos de fermentação (láctica, alcoólica e acética) foram observados durante o preparo das bebidas. O estudo foi de importância para o conhecimento da microbiota, do processo fermentativo e da constituição química das bebidas fermentadas quefir de leite e de açúcar mascavo consumidas no Brasil.

*Comitê Orientador: Dra. Rosane Freitas Schwan – UFLA (Orientadora), Dra. Patrícia Gomes Cardoso – UFLA

ABSTRACT

MAGALHÃES, Karina Teixeira. **Microbiological and chemical characterization of milk and brown sugar kefir beverage.** 2008. 108 p. Dissertation (Master Program in Agricultural Microbiology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG, Brazil.

Two beverages fermented with kefir grains that are commonly consumed in Brazil were studied. The grains were inoculated in milk and a brown sugar solution. The objective of the study was the microbiological identification and characterization of the chemical compounds formed during the beverage fermentation. The kefir grains cultured in milk presented a symbiotic association of microorganisms belonging to several species including lactic acid bacteria (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*), yeasts and acetic acid bacteria. The kefir cultured in brown sugar also consisted of a symbiotic association of yeasts and bacteria. The kefir cultured in brown sugar and cultured in milk are similar in microbiological constitution, culture procedures, structure and chemical constitution, but differ in visual appearance. The characterization of microorganisms in the kefir beverages indicated the presence of lactic bacteria (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*), Gram positive bacteria, Gram negative bacteria and yeasts. The *Lactobacillus* genus predominated throughout the fermentation period in both the beverages and was therefore an important group present in the kefir beverages. The dominant species were *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* 1 and *Candida kunziensis*. The kefir grains in brown sugar and milk indicated a greater colonization of bacteria and yeasts on the external surface, in analyzes using Electronic Scanning Microscopy. Chemical analyses showed lactic and acetic acid. Ethanol was also detected. Three types of fermentation (lactic, alcoholic and acetic) were observed during the beverage preparation. The study was important for understanding the microbiota, fermentation process and chemical constitution of the milk and brown sugar fermented kefir beverages consumed in Brazil.

*Guidance Comitee: Dra. Rosane Freitas Schwan – UFLA (Major Professor), Dra. Patrícia Gomes Cardoso – UFLA

1 INTRODUÇÃO

Os alimentos fermentados têm papel vital na história do desenvolvimento do homem, oferecendo grande variedade de sabores, aromas e texturas que enriquecem sua alimentação. De modo geral, os alimentos e as bebidas fermentadas podem ser produzidos e distribuídos a baixo custo e são de alto valor nutricional, fornecendo calorias, proteínas, vitaminas e minerais.

Quefir cultivado em leite é uma bebida fermentada (Garrote et al., 1997; Pintado et al., 1996; Rodrigues et al., 2005), ligeiramente carbonatada e que contém poucas quantidades de álcool (Farnworth, 2005; Plessas et al., 2008). Esta bebida teve origem nas montanhas caucasianas da Rússia (Urdaneta et al., 2007) e encontra-se distribuída e/ou, em produção artesanal em muitos países, como a Argentina, Taiwan, Portugal, Turquia, França (Farnworth, 2005), Suécia, Hungria, Polônia, Noruega, Finlândia, Dinamarca, França, Alemanha, Grécia, Áustria, Israel, Japão, Canadá e Estados Unidos (Schneedorf & Anfiteatro, 2004). A bebida pode ser elaborada em qualquer tipo de leite (vaca, cabra, ovelha, camela, búfala) (Irigoyen et al., 2005) e é inoculada com grãos contendo microbiota diversificada.

A bebida quefir de açúcar mascavo também é inoculada com grãos de quefir constituídos por uma diversidade de microrganismos, que formam uma associação simbiótica de leveduras e bactérias. Esses grãos podem ter se originado dos tradicionais grãos de quefir do Cáucaso, mas isto é discutível (Ulloa et al., 1994). Os grãos de quefir cultivados em açúcar mascavo são utilizados popularmente no México para produzir bebidas refrescantes de baixo teor alcoólico e acético, quando o tempo de fermentação não excede a 2 dias (Rubio et al., 1993). Quando a fermentação se prolonga por 2 a 3 semanas, se produz uma bebida conhecida como vinagre de tibicos (Lappe et al., 1992). Na Europa, também se utiliza o grão de quefir cultivado em açúcar mascavo, para

produzir a bebida fermentada conhecida como Tibi ou Sugary Kefir (Lappe et al., 1992).

Os grãos de quefir cultivados em leite e os que são cultivados em açúcar mascavo são similares em estrutura e em constituição microbiológica e química (Ulloa et al., 1994). As bebidas fermentadas prontas incluem ácido láctico, ácido acético, CO₂, álcool e compostos aromáticos (Otlés & Cagindi, 2003). A complexa comunidade microbiana simbiótica produz grãos de 3 a 35mm (Guzel-Seydim et al., 2005), constituídos, principalmente, pelo polissacarídeo quefiran, que contém quantidades aproximadamente iguais de glicose e galactose (Cheirsilp et al., 2002; Cheirsilp et al., 2003; Rimada & Abraham, 2001).

No Brasil, não se encontram dados referentes à produção e consumo das bebidas quefir de leite e açúcar mascavo. Não há relatos, na literatura, sobre a constituição química e microbiológica dessas bebidas consumidas no Brasil. As razões pelas quais o Brasil ainda não a produz industrialmente podem ser a falta de informações tecnológicas e, mesmo, a falta de interesse por parte das indústrias lácteas em desenvolver e lançar no mercado novos produtos.

Este estudo foi realizado com o objetivo de isolar e identificar os microrganismos presentes durante a fermentação e caracterizar quimicamente as bebidas consumidas no Brasil. O estudo visou um melhor entendimento do processo fermentativo para a produção das bebidas fermentadas quefir de leite e açúcar mascavo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Os grãos de quefir: origem evolutiva e um breve histórico

A expressão quefir se origina do turco “kef” (aquilo que embriaga, aquilo que está fermentado) ou de “kiaf” (aquilo que espuma). Por outro lado, no Cáucaso (Rússia), quefir se relaciona com “kefy” (aquilo que tem ótima qualidade, aquilo que causa prazer). Os grãos de quefir ou fungos do quefir, também chamados de painço, milho-miúdo-do-profeta ou grãos-do-Profeta, segundo a lenda, teriam sido entregues pessoalmente pelo profeta Maomé a sua tribo eleita, como símbolo de imortalidade (Hafliger et al., 1991).

Embora permanecessem geograficamente restritos durante séculos, os aldeões montanheses do Cáucaso acreditavam que os grãos-do-profeta perderiam sua força e longevidade, caso fossem distribuídos indiscriminadamente com o segredo de seu manuseio. Poucos registros sobre o quefir são conhecidos daqueles tempos, como os contos de viajantes sobre uma bebida de propriedades mágicas, e menção do navegador Marco Pólo, em suas viagens ao Leste Europeu (Schneedorf & Anfiteatro, 2004).

A origem evolutiva dos grãos de quefir ainda não foi esclarecida. Tornase praticamente impossível conseguir a formação espontânea dos grãos, mesmo com o aporte de todos os componentes individuais, isolados da microbiota do quefir (Hafliger et al., 1991). Novos grãos somente se originam da multiplicação e da repartição de grãos pré-existentes (Hafliger et al., 1991). Estes grãos compõem-se de uma massa gelatinosa irregular de tamanho 3 a 35mm (Liu & Lin, 2000; Irigoyen et al., 2005) e uma matriz polissacarídica, na qual se albergam os microrganismos característicos, em verdadeira simbiose. Este polissacarídeo é denominado quefiran e se compõe de partes equivalentes de glicose e galactose (Rimada & Abraham, 2001; Cheirsilp et al., 2003).

Liu & Moon (1983) relataram a forma empírica possivelmente por meio da qual os tártaros do Cáucaso preparavam a cultura do quefir: estocavam leite de cabra ou de ovelha em odre de barro e acrescentavam fragmentos de estômago de carneiro, agitando de tempos em tempos até a coagulação do produto. Após o consumo da coalhada assim obtida, sem limpeza prévia do odre, acrescentavam novamente leite e esperavam sua coagulação, consumindo-a a seguir. Este processo repetitivo teria por finalidade forrar as paredes do odre com uma crosta constituída, em grande parte, por um aglomerado de microrganismos vivos. Formaram-se, então, os grãos do quefir, que se adaptaram ao meio e nele se propagaram.

O quefir alcançou renome na Europa Central e Oriental na década de 80 do século 19. Em 1884, o médico W. Podwyssotzki, em Kiev (Ucrânia), publicou o livro “Kefyr”. Constituindo praticamente a primeira referência técnico-científica conhecida no assunto, esta obra descreve a origem, a evolução, bem como a distribuição do quefir pela Europa, a partir de 1867, desde o sopé do maciço de Elbrus, no Cáucaso, mais especificamente na aldeia montanhosa de Karatschajeff (Klupsch, 1992).

Comercialmente, o quefir foi disseminado por todo o mundo. A bebida quefir é fabricada sobre uma variedade de nomes, incluindo “Kephir, Kiaphur, Kefer, Knapon, Kepi e Kippi”. Quefir é o leite fermentado mais popular, após o iogurte, consumido na Rússia. Em 1994, estimava-se entre 65 a 80 o percentual de vendas totais, na Rússia, de leites fermentados à base de quefir, totalizando a produção anual superior a um milhão de toneladas (Schneedorf & Anfiteatro, 2004).

Os grãos de quefir cultivados em açúcar mascavo e conhecidos como “Kefir d’água” podem ter se originado dos tradicionais grãos de quefir do Cáucaso, mas isto é discutível (Ulloa et al., 1994). Lappe et al. (1992) afirma que o estudo deste tipo de quefir foi iniciado por Lutz, em 1898/1899 e, na

Europa, o estudo microbiano e químico destes grãos tem adquirido grande relevância.

Os grãos de quefir cultivados em açúcar mascavo são muito semelhantes aos cultivados em leite, em estrutura, em constituição microbiológica e em produtos formados durante a fermentação (Ulloa et al., 1994), mas diferem em aspecto visual. Os grãos constituem em uma massa compacta gelatinosa de cor amarelada, translúcida, de forma irregular e tamanho variável de 3 a 35mm (Rubio et al., 1993). Estes grãos cultivados dessa forma são utilizados popularmente no México para produzir bebidas refrescantes de baixo teor alcoólico e acético, ou ainda para produção do vinagre de tibicos (Rubio et al., 1993). Algumas pessoas no México consomem as bebidas quefir com a intenção de reduzir o peso, combater arteriosclerose e prevenir alguns males cardíacos, porém, sem base científica (Rubio et al, 1993).

2.2 A microbiologia do quefir e algumas características

A bebida quefir contém uma diversidade de bactérias ácido lácticas que são grupos fisiologicamente distintos. Segundo McKay & Baldwin (1990), elas podem, geralmente, ser descritas como bactérias Gram-positivas, cocos não esporulados ou bastão, sendo o ácido láctico o maior produto da fermentação dos carboidratos. Tradicionalmente, as bactérias ácido lácticas compreendem os gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Pediococcus* e *Streptococcus* e têm sido envolvidas na fermentação de leite, cereais e vegetais.

A população microbiana encontrada no quefir tem sido usada como um exemplo de comunidade simbiótica e esta natureza simbiótica têm dificultado a identificação e o estudo dos microrganismos constituintes dos grãos de quefir ou da bebida quefir. Algumas bactérias e leveduras da bebida quefir, quando isoladas em cultura pura, ou não crescem ou diminuem sua atividade bioquímica, dificultando os estudos da população (Koroleva, 1991).

É conhecido que leveduras têm importante função na preparação de produtos fermentados de leite. Leveduras podem fornecer nutrientes essenciais de crescimento, tais como aminoácidos e vitaminas; elas alteram o pH, secretam etanol e produzem CO₂ (Viljoen, 2001). As leveduras da bebida quefir fornecem um ambiente para o crescimento de bactérias, produzindo metabólitos que contribuam para o aroma e o sabor da bebida quefir (Clementi et al., 1989). As propriedades de leveduras encontradas nessa bebida variam. Por exemplo, algumas leveduras fermentam lactose, enquanto outras não. Também são encontradas algumas leveduras na superfície do grão, enquanto outras habitam seu interior. Pode ser que leveduras localizadas em diferentes pontos nos grãos de quefir mostrem diferentes funções no processo de fermentação (Iwasawa et al., 1982).

Para La Rivière (1969), os grãos de quefir de leite constituem uma associação simbiótica de leveduras e bactérias ácido lácticas, usadas para a produção de uma bebida láctea. Com a transferência diária destes grãos para leite fresco, eles dobram de peso, pela multiplicação, em um período de 7 a 10 dias. Mesmo não tendo assepsia restrita em sua manipulação, geralmente domiciliar, os grãos mantiveram suas características estruturais e de aparência durante várias décadas de propagação. Garrote et al. (2001) descreveram a microbiota da bebida quefir produzida na Argentina: bactérias e leveduras. Dentre as leveduras, representantes do gênero *Saccharomyces* foram achadas. As bactérias foram *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus parakefir* e *Lactobacillus plantarum*. Representantes do gênero *Acetobacter* também foram observados.

Em estudos realizados no México, com grãos de quefir cultivados em açúcar mascavo, Ulloa et al. (1994) encontraram, na bebida fermentada quefir, a presença de leveduras, como *Candida valida*, *Pichia membranifaciens* e *Saccharomyces cerevisiae*. Porém, Lappe et al. (1992) afirmam que a microbiota

da bebida consumida no México é constituída pelas leveduras *Candida valida*, *Cryptococcus albidus* e *Pichia kluyveri*.

Ainda em estudos realizados no México com quefir cultivado em açúcar mascavo, Rubio et al. (1993) identificaram a microbiota da bebida. Os autores analisaram a microbiota presente na bebida quefir durante 264 horas de fermentação e encontraram leveduras, como *Candida valida*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cândida guilliermondii*, *Cryptococcus albidus*, *Brettanomyces clausenii* e *Rhodotorula rubra*. Também identificaram várias espécies do gênero *Bacillus*, como *B. circulans*, *B. coagulans*, *B. firmus*, *B. macerans*, *B. polymyxa* e *B. pumilus*. Em estudos realizados na Europa, Pidoux (1989) identificou, em bebida fermentada quefir de açúcar mascavo, leveduras como *Zygosaccharomyces florentinus*, *Torulaspora pretoriensis*, *Candida valida*, *Cândida lambica* e *Kloeckera apiculada*. Também foram quantificadas as bactérias lácticas *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus casei* ssp. *casei*, *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Streptococcus lactis* e *Streptococcus cremoris*.

A composição microbiana da bebida quefir é definida dependendo do método de produção, da origem dos grãos e dos métodos de identificação microbiológica (Witthuhn et al., 2004a). Todos estes fatores contribuem para a variação da população microbiana da bebida. A microbiota dominante da bebida quefir elaborada em diferentes localidades encontra-se relacionada na Tabela 1.

Em estudos utilizando a microscopia de luz e a microscopia eletrônica de varredura, com grãos de quefir cultivados em leite, Toba et al. (1990), bem como Arihara et al. (1990), descreveram os grãos como semelhantes a porções de couve-flor. Os grãos variaram de diâmetro entre 5 e 20mm. Nos grãos caracterizados como propagáveis, bactérias bastonadas, curtas e longas, assim como leveduras, formavam colônias separadas, na superfície externa e na cavidade interna.

A observação dos grãos de quefir por Guzel-Seydim et al. (2005), usando microscopia eletrônica de varredura, revelou que a sua superfície é rugosa. Nas amostras fatiadas, a superfície interna dos grãos também se mostrou rugosa e com porções semelhantes a uma coleção de pequenas crateras. Foram observadas células de leveduras nas superfícies externa e interna dos grãos. Três tipos de bacilos (curto, longo e curvado) foram notados. Cocos não foram observados. A preparação dos grãos para a microscopia eletrônica pode ter sido a causa da remoção destes microrganismos. Os grãos foram caracterizados como irregulares e variaram de tamanho entre 3 a 35mm. Eles atuam como uma matriz polissacarídica, na quais bactérias ácido lácticas e leveduras vivem simbioticamente.

Bylund (1995), usando também microscopia eletrônica, atribuiu aos grãos de quefir cultivados em leite diâmetro entre 15 e 20mm e descreveu-os como de cor amarelada, referindo-se também à sua semelhança com as porções de couve-flor. Afirma que os grãos são insolúveis em água e, ao serem embebidos em leite, os grãos enturgessem, passando a ter coloração branca. Para este autor, os bastonetes presentes seriam *Lactobacillus bulgaricus* convivendo estreitamente com bactérias esféricas, o *Streptococcus thermophilus*. Leveduras e bactérias seriam sustentadas por uma rede, composta, prioritariamente, por proteínas e polissacarídeos.

TABELA 1 Microbiota dominante do quefir cultivado em leite e açúcar mascavo, em diferentes locais.

BACTÉRIAS	LOCALIDADE	SUBSTRATO DE CULTIVO	REFERÊNCIAS
<i>Lactobacillus brevis</i>	Portugal	Leite	Pintado et al., 1996
<i>Lactobacillus kefir</i>	Portugal, Argentina	Leite	Pintado et al., 1996; Garrote et al., 2001
<i>Lactococcus lactis</i>	Portugal, Turquia	Leite	Pintado et al., 1996; Yüksekdag et al., 2004
<i>Lactobacillus paracasei</i>	Espanha	Leite	Santos et al., 2003
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Espanha, África do Sul, Argentina, Europa	Leite, Açúcar mascavo	Santos et al., 2003; Witthuhn et al., 2004a; Garrote et al., 2001; Pidoux, 1989
<i>Lactobacillus delbruekii</i>	Espanha	Leite	Santos et al., 2003
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Espanha	Leite	Santos et al., 2003
<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i>	Espanha	Leite	Santos et al., 2003
<i>Lactobacillus viridescens</i>	Espanha	Leite	Angulo et al., 1993
<i>Lactobacillus gasseri</i>	Espanha	Leite	Angulo et al., 1993
<i>Lactobacillus delbruekii</i> ssp. <i>delbruekii</i>	África do Sul	Leite	Witthuhn et al., 2004b; Witthuhn et al., 2004a
<i>Leuconostoc lactis</i>	África do Sul	Leite	Witthuhn et al., 2004b
<i>Lactobacillus delbruekii</i> ssp. <i>lactis</i> 1	África do Sul	Leite	Witthuhn et al., 2004b

...Continua...

TABELA 1 cont.

<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	África do Sul, Argentina	Leite	Witthuhn et al., 2004b; Garrote et al., 2001
<i>Lactobacillus brevis</i> 3	África do Sul	Leite	Witthuhn et al., 2004a
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides/dextranicum</i> 2	África do Sul	Leite	Witthuhn et al., 2004b
<i>Lactobacillus fermentum</i>	África do Sul, Espanha,	Leite	Witthuhn et al., 2004b; Angulo et al., 1993; Witthuhn et al., 2004;
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 1	África do Sul	Leite	Witthuhn et al., 2004a
<i>Lactobacillus helveticus</i>	Espanha	Leite	Angulo et al., 1993
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Espanha	Leite	Angulo et al., 1993
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 2	África do Sul	Leite	Witthuhn et al., 2004a
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Argentina, Europa	Leite, açúcar mascavo	Garrote et al., 2001; Pidoux, 1989
<i>Lactobacillus parakefir</i>	Argentina	Leite	Garrote et al., 2001
<i>Lactobacillus casei</i>	Espanha, Rússia	Leite	Angulo et al., 1993; Plessas et al., 2007
<i>Lactococcus cremoris</i>	Turquia	Leite	Yüksekdağ et al., 2004
<i>Lactococcus</i> spp.	Espanha	Leite	Fontán et al., 2006
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Turquia	Leite	Yüksekdağ et al., 2004
<i>Streptococcus durans</i>	Turquia	Leite	Yüksekdağ et al., 2004
<i>Lactobacillus curvatus</i>	África do Sul	Leite	Witthuhn et al., 2004b

...Continua...

TABELA 1 cont.

<i>Enterococcus</i> spp.	Espanha	Leite	Fontán et al., 2006
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i>	África do Sul	Leite	Witthuhn et al., 2004a
<i>Bacillus brevis</i>	México	Açúcar mascavo	Rubio et al., 1993
<i>Bacillus circulans</i>	México	Açúcar mascavo	Rubio et al., 1993
<i>Enterobacter aerogenes</i>	México	Açúcar mascavo	Rubio et al., 1993
<i>Bacillus coagulans</i>	México	Açúcar mascavo	Rubio et al., 1993
<i>Bacillus firmus</i>	México	Açúcar mascavo	Rubio et al., 1993
<i>Bacillus macerans</i>	México	Açúcar mascavo	Rubio et al., 1993
<i>Bacillus polymyxa</i>	México	Açúcar mascavo	Rubio et al., 1993
<i>Bacillus pumilus</i>	México	Açúcar mascavo	Rubio et al., 1993
<i>Acetobacter acetic</i>	Portugal, Espanha	Leite	Pintado et al., 1996; Angulo et al., 1993
<i>Acetobacter rasens</i>	Portugal	Leite	Pintado et al., 1996
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	Europa	Açúcar mascavo	Pidoux, 1989
<i>Lactobacillus casei</i> ssp. <i>casei</i>	Europa	Açúcar mascavo	Pidoux, 1989
<i>Lactobacillus casei</i> ssp. <i>rhamnosus</i>	Europa	Açúcar mascavo	Pidoux, 1989
<i>Streptococcus lactis</i>	Europa	Açúcar mascavo	Pidoux, 1989
<i>Streptococcus cremoris</i>	Europa	Açúcar mascavo	Pidoux, 1989

...Continua...

TABELA 1 cont.

LEVEDURAS	LOCALIDADE	SUBSTRATO DE CULTIVO	REFERÊNCIAS
<i>Candida holmii</i>	África do Sul, México,	Leite	Witthuhn et al., 2004b; Angulo et al., 1993
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	África do Sul, México, Espanha	Leite, mascavo, açúcar	Witthuhn et al., 2004b; Rubio et al., 1993; Angulo et al., 1993; Ulloa et al., 1994
<i>Geotrichum candidum</i>	África do Sul	Leite	Witthuhn et al., 2004a
<i>Cryptococcus humicolus</i>	África do Sul	Leite	Witthuhn et al., 2004a
<i>Candida krusei</i>	África do Sul	Leite	Witthuhn et al., 2004a
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Argentina	Leite	Garrote et al., 2001
<i>Saccharomyces lactis</i>	Iran	Leite	Assadi et al., 2000
<i>Saccharomyces fragilis</i>	Iran	Leite	Assadi et al., 2000
<i>Brettanomyces clausenii</i>	México	Açúcar mascavo	Rubio et al., 1993
<i>Canida guilliermondii</i>	México	Açúcar mascavo	Rubio et al., 1993
<i>Candida valida</i>	México, Europa	Açúcar mascavo	Rubio et al., 1993; Lappe et al., 1992.; Pidoux, 1989

...Continua...

TABELA 1 cont.

<i>Pichia kluyveri</i>	México	Açúcar mascavo	Lappe et al., 1992
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	Espanha	Leite	Angulo et al., 1993
<i>Torula kefir</i>	Irã	Leite	Assadi et al., 2000
<i>Saccharomyces unisporus</i>	Portugal, Espanha	Leite	Pintado et al., 1996; Angulo et al., 1993
<i>Saccharomyces delbrueckii</i>	Portugal	Leite	Pintado et al., 1996
<i>Zygosaccharomyces sp.</i>	África do Sul	Leite	Witthuhn et al., 2004b
<i>Candida kefir</i>	África do Sul	Leite	Witthuhn et al., 2004b; Witthuhn et al., 2004a; Assadi et al., 2000
<i>Candida friedricchii</i>	Espanha	Leite	Angulo et al., 1993
<i>Candida guilliermondii</i>	México	Açúcar mascavo	Rubio et al., 1993
<i>Candida lipolytica</i>	África do Sul	Leite	Witthuhn et al., 2004b
<i>Candida lambica</i>	Europa	Açúcar mascavo	Pidoux, 1989
<i>Kloeckera apiculada</i>	Europa	Açúcar mascavo	Pidoux, 1989
<i>Zygosaccharomyces florentinus</i>	Europa	Açúcar mascavo	Pidoux, 1989
<i>Torulaspora pretoriensis</i>	Europa	Açúcar mascavo	Pidoux, 1989
<i>Cryptococcus albidus</i>	México	Açúcar mascavo	Rubio et al., 1993; Lappe et al., 1992
<i>Rhodotorula rubra</i>	México	Açúcar mascavo	Rubio et al., 1993
<i>Pichia membranaefaciens</i>	México	Açúcar mascavo	Ulloa et al., 1994

2.3 Bioquímica do quefir

Além de sua composição microbiológica, o quefir possui uma matriz gelatinosa com teores aproximados de 13% de proteínas e 24% de debris celulares, polissacarídeos e lipídeos (Schneedorf & Anfiteatro, 2004). O principal polissacarídeo do quefir é o quefiran, um exopolissacarídeo que contém quantidades aproximadamente iguais de glicose e galactose (Cheirsilp et al., 2002; Cheirsilp et al., 2003; Rimada & Abraham, 2006).

Descoberto no final da década de 1960, o quefiran assemelha-se constitutivamente a polissacarídeos de glico-galactano, servindo ao quefir como uma matriz de sustentação e de coesão entre seus diversos componentes (Schneedorf & Anfiteatro, 2004). Micheli et al. (1999) desenvolveram um método para a obtenção de quefiran em laboratório, obtendo o teor de 2g do polissacarídeo por litro da bebida fermentada, a partir da atividade bacteriana presente nos grãos.

Sobre essas investigações sobre os produtores de quefiran há controvérsias, entretanto, Kooiman (1968) reportou que o *Lactobacillus brevis*, atualmente conhecido como *Lactobacillus kefir*, é responsável pela produção de quefiran. Porém, de acordo com Tada et al. (2007), o produtor do quefiran nos grãos de quefir é o *Lactobacillus kefirianofaciens*.

A propriedade saudável do quefiran tem estimulado o desenvolvimento de meios e condições de crescimento que aperfeiçoem sua produção. O quefiran é produzido quando o substrato para cultivo dos grãos está ácido ou na presença de ácido láctico (Toba et al., 1987). Abraham & Antoni (1999) mostraram que a quantidade de polissacarídeo de quefir produzido de leite bovino foi quase duas vezes maior que aquele produzido pelo leite de soja. Grãos de quefir crescem em leite de soja produzindo um exopolissacarídeo que Liu et al. (2002) têm mostrado ser primeiramente composto de D-glucose e D-galactose.

A composição química da bebida quefir de leite e/ou açúcar mascavo é variável e não bem definida. Isto depende de fatores tais como o conteúdo de gordura do leite ou a concentração de carboidratos no substrato, a composição microbiológica ou o processo tecnológico de produção (Otles & Cagindi, 2003). Os principais produtos formados durante a fermentação são ácido láctico, CO₂ e álcool. A composição química da bebida quefir, dada por componente/100g, é a seguinte: energia, 65kcal; gordura, 3,5g; proteína, 3,3g; lactose, 4,0g; água, 87,5g; cálcio, 0,12g; fósforo, 0,10g; magnésio, 12,0g; potássio, 0,15g; sódio, 0,05g; ácido láctico, 1,0g; colesterol, 13,0mg; manganês, 5µg; triptofano, 0,05g; leucina, 0,34g; isoleucina, 0,21g; treonina, 0,17g; lisina, 0,27g; valina, 0,22g; vitaminas: A, 0,06mg; B₁, 0,04mg; B₂, 0,17mg; B₆, 0,05mg; B₁₂, 0,5mg; C, 1mg; D, 0,08mg e E, 0,11mg (Otles & Cagindi, 2003).

Os numerosos benefícios das vitaminas B são regulação dos rins, do fígado e do sistema nervoso, além de aumentar a energia e a longevidade do corpo. Triptofano é um dos aminoácidos essenciais no quefir que promovem um efeito relaxante no sistema nervoso. Cálcio e magnésio são abundantes no quefir, os quais são importantes minerais para a saúde do sistema nervoso. Quefir é também uma boa fonte de fósforo, sendo o segundo mineral mais abundante em nossos corpos e ajuda na utilização de carboidratos, gorduras e proteínas para crescimento, manutenção e energia das células (Otles & Cagindi, 2003).

A lactose é um dissacarídeo parcialmente consumido pelos microrganismos presentes na bebida quefir. Estes microrganismos são bactérias lácticas e algumas leveduras. Como produto principal do metabolismo da lactose, pontua-se o ácido láctico. A gordura presente na bebida fermentada é uma função direta da origem e do tipo do leite utilizado em sua produção, se de rebanho bovino ou caprino. A tipificação, como os baixos níveis de gordura (natural, em pó, desnatado e UHT), também possui função direta na gordura

presente na bebida. A escolha da fonte láctica para a fermentação também resulta em propriedades organolépticas distintas para a bebida quefir (Schneedorf & Anfiteatro, 2004).

Monitorando amostras de grãos cultivados em leite e estaticamente, a 4°C, durante 21 dias, Guzel-Seydim et al. (2000) verificaram alterações no aroma das suspensões produzidas pelo metabolismo de ácidos voláteis, tais como ácido orótico, cítrico, pirúvico, láctico, úrico, acético, propiônico, butírico e hipúrico, em análise cromatográfica de alta performance (HPLC), e de etanol, acetaldeído e diacetila, em cromatografia gasosa (CG). Dos compostos testados, ácido láctico, orótico, cítrico, etanol e acetaldeído apresentaram aumento relevante no 21º dia de cultivo, ao passo que acetoína decaiu em, aproximadamente, 30%. Outros ácidos orgânicos encontrados na bebida foram ácido fórmico, isobutírico, caprótico, caprílico e láurico.

Dióxido de carbono, produzido por algumas bactérias lácticas heterofermentativas e por leveduras, é responsável pela gaseificação típica observada na bebida. Vitaminas do complexo B, como B₁, B₁₂, biotina, niacina (B₃) e pirodoxina (B₆), além de ácido fólico, vitaminas K, cálcio, manganês e aminoácidos, também constituem parte da suspensão probiótica do quefir (Guzel-Seydim et al., 2000).

O etanol, juntamente com o CO₂ e os compostos aromáticos, é o ingrediente marcante na bebida quefir. Seu teor varia em função do período e da temperatura de fermentação permitida, bem como das condições de produção, se predominantemente aeróbica ou anaeróbica. Não obstante, também pode ocorrer variação na concentração de etanol, dependendo de as amostras serem constituídas por grãos de quefir propriamente ditos, ou amostras liofilizadas e iniciadoras de colônia, uma apresentação comercial bastante utilizada (Hallé et al., 1994).

Existem largas faixas de teores alcoólicos encontrados na literatura. Hallé et al. (1994) encontraram teores variáveis entre 0,03 a 1,8g, a cada 100g da bebida fermentada com os grãos de quefir no leite, e de 10 a 100mg, se utilizados iniciadores da colônia. O máximo conteúdo de álcool reportado na bebida quefir foi de 38g por litro da bebida, o que equivale a um teor aproximado de 5% de etanol, semelhante ao encontrado na cerveja. Este nível de etanol, porém, só foi alcançado após 7 a 10 dias de fermentação contínua da bebida, o que costuma ser desaconselhável por questões sanitárias. O teor alcoólico também varia com a temperatura de fermentação, podendo reduzir-se a quase um terço em 4°C, quando comparado a 30°C (Schneedorf & Anfiteatro, 2004).

Em estudos químicos da fermentação da bebida quefir de açúcar mascavo, realizados por Rubio et al. (1993), foram verificados três tipos de fermentação durante o processo: láctica, alcoólica e acética. Em 48 horas de fermentação, o produto foi considerado uma bebida láctea ligeiramente alcoólica. No fim de 264 horas de fermentação, o produto foi considerado como uma bebida fermentada acética, denominada vinagre de tibicos.

2.4 Propriedades terapêuticas do quefir cultivado em leite

Um dos primeiros registros literários do emprego terapêutico de quefir data do princípio da década de 1970, quando o pesquisador russo Batinkov sugeriu o emprego da bebida probiótica para o tratamento de úlceras pépticas e duodenais. A partir de então, passaram a surgir diversos trabalhos, em línguas eslavas, sobre a utilização do quefir no tratamento de doenças pancreáticas, pneumonia, bronquite e tuberculose, dentre outras (Schneedorf & Anfiteatro, 2004).

Na atualidade, o quefir tem merecido indicações científicas nos mais variados enfoques, desde a nutrição e a dietoterapia, até mesmo o seu emprego

com resultados significativos na oncologia comparada. Vários estudos investigaram os efeitos imunomodulatórios (Vinderola et al., 2004), antiinflamatórios (Rodrigues et al., 2005; Lee et al., 2007), cicatrizantes (Rodrigues et al., 2004), antialérgicos (Lee et al., 2007), antitumorais (Cevikbas et al., 1994; Furukawa et al., 1990; LeBlanc et al., 2006), antimicrobianos (Santos et al., 2003; Rodrigues et al., 2004), antineoplásticos e pró-digestivos (Saloff-Coate, 1996) do Kefir.

Os microrganismos presentes na bebida quefir processam o leite e tornam os nutrientes mais acessíveis ao organismo. De acordo com Otles & Cagindi (2003), o quefir possibilita que pessoas com problemas de má-absorção da lactose consumam o leite, o qual é modificado e processado pelos microrganismos. O produto também é conhecido por afetar benéficamente o trato intestinal, sendo considerado uma mistura probiótica (Urdaneta et al., 2007). Estudando o metabolismo de indivíduos intolerantes à lactose, Alm (1982) observou redução de 30% no teor de lactose, presente em quefir fermentado por 11 dias e recomendou o seu consumo por aqueles pacientes.

Além de uma melhoria no metabolismo de carboidratos, para os consumidores, o consumo da bebida quefir também está associado a um aumento na proteólise digestória (Vass et al., 1984). Em estudo com ratos Wistar, Vass et al. (1984) identificaram uma melhor digestibilidade de produtos à base de proteínas com dieta suplementada com iogurte e quefir, com conseqüente aumento de massa corporal, por grama de proteína consumida pelos animais. Nesse sentido, Sintsova (1991) também encontrou correlação direta entre a administração oral de quefir em pacientes com obesidade alimentar e o aumento da proteólise intragástrica. Urdaneta et al. (2007) realizaram um estudo com 20 fêmeas de ratos Wistar recebendo a alimentação suplementada com quefir. Os resultados mostraram que a dieta pode beneficiar a digestão de proteínas, devido ao aumento da atividade intestinal. Além disso, a dieta

apresentou relação direta com a redução do índice glicêmico dos organismos examinados.

O quefir também tem sido utilizado como barreira patogênica nas mais diversas formas de infecção bacteriana. Orlova et al. (1980) avaliaram o efeito de dietas suplementadas com quefir em formulações comerciais de dois grupos (Robolact e Linolact), na Hungria. Os autores verificaram significativa redução de infecções intestinais agudas em crianças daquele país, quando comparada à nutrição convencional. Os autores identificaram, ainda, uma diferença composicional relevante na microbiota presente em ambos os grupos.

O primeiro estudo *in vitro* sobre as propriedades antimicrobianas de diferentes linhagens de *Lactobacillus* spp. isoladas do quefir foi realizado por Santos e colaboradores (2003). Os autores verificaram que as melhores propriedades probióticas foram observadas em *Lactobacillus acidophilus* CYC 10051 e *Lactobacillus kefirifaciens* CYC 10058.

Efeitos imunomodulatórios também estão associados ao consumo de quefir, embora em ensaios murinos e, às vezes, dependentes da idade do animal. Vinderola et al. (2004) determinaram a capacidade imunomodulatória de quefir da resposta imune na mucosa intestinal de ratos e para averiguar a importância da dosagem e viabilidade celular nesta resposta. LeBlanc et al. (2006) observaram que quefir possui várias substâncias, não especificadas, que podem exercer efeitos benéficos no sistema imune e prevenir certos tipos de câncer. Os autores citam como exemplo a resposta imune em tumores localizados em glândulas mamárias.

Pouco é conhecido sobre as propriedades antiinflamatórias do quefir. Estudos prévios têm demonstrado que ele tem efeitos antiinflamatórios *in vitro* (DeSimone et al., 1986). Lee et al. (2007) demonstraram, *in vivo*, efeitos antiinflamatórios e antialérgicos em ratos asmáticos.

Atividade cicatrizante de quefir foi verificada usando-se uma pomada à base de quefir, em ratos albinos com ferida dorsal infectada por *Staphylococcus aureus*. A cicatrização foi mais bem observada nos animais tratados com a formulação com quefir (70%), em relação ao grupo controle tratado com pomada comercial à base de neomicina-clostebol (Rodrigues et al., 2004).

Não foram encontrados relatos científicos sobre a terapêutica de quefir de açúcar mascavo.

2.5 Processo de produção e preservação na estocagem do quefir

Diversos são os meios e os substratos de preparo da bebida fermentada pelos grãos de quefir nos países do Ocidente, devido à extensa variabilidade de cultivo caseiro dos grãos. Inúmeras são as receitas criadas para o consumo do produto, variando desde o cultivo em solução açucarada ou leite à fermentação de sucos de frutas ou em mistura de sucos de frutas com leite. Há, ainda, informações sobre a produção de quefir a partir de leite de ovelhas, cabras, búfalas e leite de soja (Kuo & Lin, 1999). O cultivo também ocorre à temperatura ambiente até a de refrigeração, de um metabolismo fermentativo de 10 às 72 horas ou mais, do simples preparo doméstico até processos industriais de fermentação (Schneedorf & Anfiteatro, 2004).

A maneira mais simples de se conduzir o preparo da bebida quefir é permitir uma fermentação dos grãos em água açucarada (açúcar comum, cristalizado, mascavo) (Schneedorf & Anfiteatro, 2004) ou leite (vaca, cabra, desnatado, pasteurizado, baixa gordura, UHT, arroz ou soja). A quantidade de grãos para o cultivo pode variar de 2% a 10% de peso final (Ogles & Cagindi, 2003). Os grãos são pesados e inoculados no substrato. A fermentação pode ocorrer de 4 a 8 horas em temperatura ambiente, seguidas de 10 a 18 horas sob refrigeração (Schneedorf & Anfiteatro, 2004), podendo, ainda, ocorrer fermentação sob temperatura controlada de 20° a 25°C, por 18 a 24 horas (Ogles

& Cagindi, 2003). Posteriormente ao período de fermentação, os grãos são coados, lavados e inoculados em novo substrato. A bebida fermentada quefir é consumida após a retirada do inóculo (grãos), posterior ao período de fermentação. A bebida pronta é constituída de microrganismos viáveis e compostos químicos, resultantes do processo de fermentação.

Quanto ao procedimento de cultivo do quefir, este pode se realizar em banho estático (sem troca do volume sob fermentação) ou contínuo (substituição periódica do substrato de cultivo em intervalos de 24 a 48 horas) (Schneedorf & Anfiteatro, 2004). Considerando que o comportamento do quefir pode variar sob um grande número de parâmetros, causando dificuldade para a padronização do produto, a indústria tem se esforçado em direção à produção de bebida quefir, a partir de linhagens puras de microrganismos, bem como de grãos liofilizados (Weis & Burgbacher, 1986). Witthuhn et al. (2004c) mostraram que a liofilização dos grãos de quefir resultou na redução do número microbiano, bem como do número de espécies microbianas, comparado aos grãos que não foram liofilizados. A liofilização causou um impacto na comunidade microbiana dos grãos de quefir.

Contudo, os processos que partem da utilização de linhagens puras de microrganismos e ou grãos liofilizados, ainda possuem resultados pouco significativos. A fermentação a partir de grãos inicializadores, cultivados continuamente, refrigerados ou congelados, ainda é a melhor opção para a preparação da bebida quefir (Hayes, 1990). A conservação em 4°C (Otlés & Cagindi, 2003; Witthuhn et al., 2004b) ou mesmo o congelamento a -20°C (Garrote et al., 1997; Witthuhn et al., 2004b) ou -80°C (Garrote et al., 1997) permitem uma estabilização metabólica que pode ser recuperada após alguns meses de reativação da cultura.

No Brasil, as bebidas quefir de leite e açúcar mascavo são produzidas apenas de forma doméstica. Portanto, não há conhecimento microbiológico e

químico dessas bebidas. Dessa forma, o presente estudo é importante por ser o primeiro relato científico das bebidas quefir de leite e açúcar mascavo consumidas no Brasil.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, A.G.; ANTONI, G.L. de. Characterization of kefir grains grow in cow's milk and in soya milk. **Journal of Dairy Research**, v. 66, p. 327-333, 1999.

ALM, L. Effect of fermentation on lactose, glucose, and galactose content in milk and suitability of fermented milk products for lactose intolerant individuals. **Journal of Dairy Science**, v. 65, n. 3, p. 346-352, 1982.

ANGULO, L.; LOPEZ, E.; LEMA, C. Microflora present in kefir grains of the Galician Region (North-West of Spain). **Journal of Dairy Research**, v. 60, p. 263-267, 1993.

ARIHARA, K.; TOBA, T.; ADACHI, S. Immunofluorescence microscopic studies on distribution of *Lactobacillus kefiranofasciens* and *Lactobacillus kefir* in kefir grains. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 11, p. 127-134, 1990.

ASSADI, M.M.; POURAHMAD, R.; MOAZAMI, N. Use of isolated kefir starter cultures in kefir production. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 16, p. 541-543, 2000.

BYLUND, G. Dairy processing handbook. Kefir. **Tetra Pak Processing Systems**. S-22186 Lund, p. 257-260, 1995.

CEVIKBAS, A.; YEMNI, E.; EZZEDENN, F.W.; YARDIMICI, T. Antitumoural, antibacterial and antifungal activities of kefir and kefir grain. **Phytother Research**, v. 8, p. 78-82, 1994.

CHEIRSILP, B.; SHIMIZU, H.; SHIOYA, S. Enhanced kefir production by mixed culture of *Lactobacillus kefiranofasciens* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biotechnology**, v. 100, p. 43-53, 2002.

CHEIRSILP, B.; SHOJI, H.; SHIMIZU, H.; SHIOYA, S. Interactions between *Lactobacillus kefiranofasciens* and *Saccharomyces cerevisiae* in mixed culture for kefir production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 96, n. 3, p. 279-284, 2003.

CLEMENTI, F.; GOBBETTI, M.; ROSSI, J. Carbon dioxide synthesis by immobilized yeast cells in kefir production. **Milchwissenschaft**, v. 44, p. 70-74, 1989.

DeSIMONE, C.; SALVADORI, B.B.; NEGRI, F. The adjuvant effect of yogurt on production of gamma interferon by ConA stimulated human peripheral blood lymphocytes. **Nutrition International**, v. 33, p. 419-433, 1986.

FARNWORTH.E.D. Kefir: a complex probiotic. **Food Science Technology**, v. 2, p. 1-17, 2005.

FONTÁN, M.C.G.; MARTÍNEZ, S.; FRANCO, I.; CARBALLO, J. Microbiological and chemical changes during the manufacture of kefir made cows' milk, using a commercial starter culture. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 762-767, 2006.

FURUKAWA, N.; MATSUOKA, A.; YAMANAKA, Y. Effects of orally administered yogurt and kefir on tumor growth in mice. **Journal Japan Society Nutricional Food Sci.**, v. 43, p. 450-453, 1990.

GARROTE, G.L.; ABRAHAM, A.G.; ANTONI, G.L. de. Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. **Journal of Dairy Research**, v. 68, p. 639-652, 2001.

GARROTE, G.L.; ABRAHAM, A.G.; ANTONI, G.L. de. Preservation of kefir grains, a comparative study. **Lebensm. – Technological**, v. 30, p. 77-84, 1997.

GUZEL-SEYDİM, Z.; SEYDİM, A.C.; GREENE, A.K. Organic acids and volatile flavor components evolved during refrigerated storage of kefir. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 2, p. 275-277, 2000.

GUZEL-SEYDİM, Z.; WYFFELS, J.T.; SEYDİM, A.C.; GREENE, A.K. Turkish kefir and kefir grains: microbial enumeration and electron microscopic observation. **International Journal of Dairy Technology**, v. 58, n. 1, p. 25-29, 2005.

HAFLIGER, M.; SPILLMANN, H.; PUHAN, Z. Kefir-ein faszinierendes Sauermilchprodukt. **Deutsche Molkerei-Zeitung-Lebensmittelindustrie und Milchwirtschaft**, Kempten, v. 13, p. 370-375, 1991.

HALLÉ, C.; LEROI, F.; DOUSSET, X.; PIDOUX, M. Les kefirs: des associations bactéries lactiques-levures. In: ROISSART,H.; LUQUET, F.M.

- Bactéries lactiques:** aspects fondamentaux et technologiques. France: Loriga, 1994. v. 2, p. 169-182.
- HAYES, S. **Dairy biotechnology.** London: National Dairy Council, 1990. p. 5-7.
- IRIGOYEN, A.; ARANA, I.; CASTIELLA, M.; TORRE, P.; IBÁÑEZ, F.C. Microbiological, physicochemical, and sensory characteristics of kefir during storage. **Food Chemistry**, v. 90, p. 613-620, 2005.
- IWASAWA, S.; UEDA, M.; MIYATA, N.; HIROTA, T.; AHIKO, K. Identification and fermentation character of kefir yeast. **Agricultural Biological Chemistry**, v. 46, p. 2631-2636, 1982.
- KLUPSCH, H.J. Saure Milcherzeugnisse, Milchgetränke und Desserts. **Velarg D-4650 Gelsenkirchen-Buer.** p. 115-133, 1992.
- KOOIMAN, P. The chemical structure of kefirin, the water-soluble polysaccharide of the kefir grain. **Carbohydrate Research**, v. 7, p. 200-211, 1968.
- KOROLEVA, N.S. Products prepared with lactic acid bacteria and yeast. In: ROBINSON, R.K. (Ed.). **Therapeutic properties of fermented milks.** London: Elsevier Applied Sciences, 1991. 179p.
- KUO, C.Y.; LIN, C.W. Taiwanese kefir grains: their growth, microbial and chemical composition of fermented milk. **Journal Dairy Technology**, v. 54, p. 19-23, 1999.
- LAPPE, P.; MONROY, M.T.R.; VEGA, C.A.; ULLOA, M. Especies de levaduras aisladas de tибicos cultivados en soluciones azucaradas de piloncillo y de melaza. **Micologya**, v. 5, p. 1-10, 1992.
- LA RIVIÉRI, J.W.M. Ecology of yeast in the kefir grain. Antonil van Leeuwenhoek. Supplement: **Yeasts Symposium**, Amsterdam. v. 35, p. 15-16, 1969.
- LeBLANC, A.M.; MATAR, C.; FARNWORTH, E.; PERDIGON, G. Study of cytokines involved in the prevention of a murine experimental breast cancer by kefir. **Cytokine**, v. 34, p. 1-8, 2006.

LEE, M.Y.; AHN, K.S.; KWON, O.K.; KIM, M. J.; KIM, M.K.; LEE, I.Y.; OH, S.R.; LEE, H.K. Anti-inflammatory and anti-allergic effects of kefir in mouse asthma model. **Immunobiology**, v. 212, p. 647-654, 2007.

LIU, J.A.P.; MOON, N.J. Kefir – “new” fermented milk product. **Cultured Dairy Products Journal**, Washington, v. 83, n. 3, p. 11-12, 1983.

LIU, J-R.; CHEN, M-J.; LIN, C-W. Characterization of polysaccharide and volatile compounds produced by kefir grains grow in soymilk. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 1, p. 104-108, 2002.

LIU, J-R.; LIN, C-W. Production of kefir from soymilk with or without added glucose, lactose, or sucrose. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 4, 716-719, 2000.

McKAY, L.L.; BALDWIN, K. Application for biotechnology: present and future improvements in lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology**, v. 87, p. 3-14, 1990.

MEDRANO, M.; PÉREZ, P.F.; ABRAHAM, G. Kefiran antagonizes cytopathic effects of *Bacillus cereus* extracellular factors. **Journal of Food Microbiology**, v. 122, n. 1-2, p. 1-7, 2008

MICHELI, L.; UCCELLETTI, D.; PALLESCHI, C.; CRESCENZI, V. Isolation and characterization of a ropy *Lactobacillus* strain producing the exopolysaccharide kefiran. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, n. 1, p. 69-74, 1999.

ORLOVA, Z.N.; KASATKINA, T.N.; OKHAPKINA, V.F. Use of robolact and linolac dry milk mixtures in the overaction therapy of infants with acute intestinal infections. **Pita**, v. 4, p. 45-47, 1980.

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.

PIDOUX, M. The microbial flora of sugary kefir grain (the gingerbeer plant): biosynthesis of the grain from *Lactobacillus hilgardii* producing a polysaccharide gel. **Mircen Journal**, v. 5, p. 223-238, 1989.

PINTADO, M.E.; SILVA, J.A.L. da.; FERNANDES, P.B.F.; MALCATA, F.X.; HOGG, T.A. Microbiological and rheological studies on Portuguese kefir grains. **International Journal of Food science and Technology**, v. 31, p. 15-26, 1996.

PLESSAS, S.; KOLIOPOULOS, D.; KOURKOUTAS, Y.; PSARIANOS, C.; ALEXOPOULOS, A.; MARCHANT, R.; BANAT, I.M.; KOUTINAS, A.A. Upgrading of discarded oranges through fermentation using kefir food industry. **Food Chemistry**, v. 106, p. 4049, 2008.

PLESSAS, S.; TRANTALLIDI, M.; BEKATOROU, A.; KANELLQAKI, M.; NIGAM, P.; KOUTINAS, A.A. Immobilization of kefir and *Lactobacillus casei* on brewery spent grains for use in sourdough wheat bread making. **Food Chemistry**, v. 105, p. 187-194, 2007.

RIMADA, P.S.; ABRAHAM, A.G. Kefiran improves rheological properties of glucono- δ -lactone induced skim milk gels. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 33-39, 2006.

RIMADA, P.S.; ABRAHAM, A.G. Polysaccharide production by grains during whey fermentation. **Journal of Dairy Research**, v. 68, p. 653-661, 2001.

RODRIGUES, K.L.; CAPUTO, L.R.G.; CARVALHO, J.C.T.; EVANGELISTA, J.; SCHNEEDORF, J.M. Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 25, p. 404-408, 2004.

RODRIGUES, K.L.; CARVALHO, J.C.; SCHNEEDORF, J.M. Anti-inflammatory properties of kefir and its polysaccharide extract. **Inflammopharmacology**, v. 32, p. 1124-1127, 2005.

RUBIO, M.T.; LAPPE, P.; WACHER, C.; ULLOA, M. Estudio microbiano y químico de la fermentación de soluciones de piloncillo inoculadas con tíficos. **Latina-American Microbiology**, v. 35, p. 19-31, 1993.

SALOFF-COASTE, C. Kefir. **Danone Newslett**, v. 11, p. 1-11, 1996.

SANTOS, A.; SAN MAURO, M.; SANCHES, A.; TORRES, J.M.; MARQUINA, D. The antimicrobial properties of different strains of *Lactobacillus* spp. Isolated from Kefir. **System Applied Microbiol**, v. 26, p. 434-437, 2003.

SCHNEEDORF, J.M.; ANFITEATRO, D. Quefir, um probiótico produzido por microrganismos encapsulados e inflamação. In: CARVALHO, J.C.T. **Fitoterápicos anti-inflamatórios: Aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. São Paulo: Tecmed, 2004, p. 443-467.

- SINTSOVA, N.V. Changes in intragastric proteolytic activity in patients with obesity and possibilities of its dietetic correction. **Arkh**, v. 63, n. 2, p. 47-51, 1991.
- TADA, S.; KATAKURA, Y.; NINOMIYA, K.; SHIOYA, S. Fed-Batch Coculture of *Lactobacillus kefiranofaciens* with *Saccharomyces cerevisiae* for Effective Production of Kefiran. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 103, n. 6, p. 557-562, 2007.
- TOBA, T.; ABE, S.; ADACHI, S. Modification of KPL médium for polysaccharide production by *Lactobacillus* sp. Isolated from kefir grain. **Journal of Zootechnical Science**, v. 58, p. 987-990, 1987.
- TOBA, T.; ARIHARA, K.; ADACHI, S. Distribution of microorganisms with particular referente to encapsulated bacteria in kefir grains. **International Journal of food Microbiology**, Amsterdam, v. 10, p. 219-224, 1990.
- ULLOA, M.; LAPPE, P.; TABOADA, J.; DÍAS-GARCÉS, J. Mycobiota of the Tibi grains used to ferment Pulque in Mexico. **Revista Mexicana de Micología**, v. 10, p. 153-159, 1994.
- URDANETA, E.; BARRENETXE, J.; ARANGUREN, P.; IRIGOYEN, A.; MARZO, F.; IBÁÑEZ, F.C. Intestinal beneficial effects of kefir-supplemented diet in rats. **Nutrition Research**, v. 27, p. 653-658, 2007.
- VASS, A.; SZAKALY, S.; SCHIMIDT, P. Experimental study of the nutritional biological characters of fermented milks. **Medical**, v. 41, n. 2-3, p. 157-161, 1984.
- VILJOEN, B.C. The interaction between yeast and bacteria in dairy environments. **International Journal Food Microbiol.**, v. 69, p. 37-44, 2001.
- VINDEROLA, C.G.; DUARTE, J.; TANGAVEL, D.; PERDIGÓN, G.; FARNWORTH, E.; MATAR, C. Immunomodulating capacity of kefir. **Journal of Dairy Research**, v. 72, p. 195-202, 2004.
- WEIS, W.; BURGBACHER, G. 100 Jahre Kefir in Deutschland. Nach wie vor ein aktuelles Thema. **Deutsche Milchwirtschaft**, Hildesheim, v. 4, p. 81-90, 1986.

WITTHUHN, R.C.; SCHOEMAN, T.; BRITZ, T.J. Characterisation of the microbial population at different stages of kefir production and kefir grain mass cultivation. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 383-389, 2004a.

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, p. 33-37, 2004b.

WITTHUHN, R.C.; SCHOEMAN, T.; CILLIERS, A.; BRITZ, T.J. Impact of preservation and different packaging conditions on the microbial community and activity of kefir grains. **Food Microbiology**, v. 22, p. 337-344, 2004c.

YÜKSEKDAG, Z.N.; BEYATLI, Y.; ASLIM, B. Determination of some characteristics coccoid forms of lactic acid bacteria isolated from Turkish kefir with natural probiotic. **Technology, Lebensm.** v. 37, p. 663-667, 2004.

CAPÍTULO 1

Caracterização microbiológica e química da bebida quefir de leite

RESUMO

MAGALHÃES, Karina Teixeira. **Caracterização microbiológica e química da bebida quefir de leite**. In: _____. Caracterização microbiológica e química da bebida quefir de leite e açúcar mascavo. 2008. Cap.1, p.30-67. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

Quefir é uma bebida fermentada produzida pela adição dos grãos de quefir no leite. Os grãos são compostos por uma associação simbiótica de leveduras e bactérias. A bebida quefir é popularmente consumida no Brasil. O estudo objetivou caracterizar e identificar a população microbiana presente na bebida quefir de leite e caracterizar quimicamente o produto. Um inóculo de 10% de grãos de quefir foi adicionado em leite integral pasteurizado (marca Ipê, produzido pela Cooperativa Agrícola Alto Rio Grande Ltda., em Lavras, MG, Brasil), para 24 horas de fermentação aeróbica, com temperatura de 25°C. Um total de 359 isolados microbianos foi identificado, os quais se dividiram em bactérias Gram-positivas (67,8%), bactérias Gram-negativas (3,6%) e leveduras (28,6%). O gênero *Lactobacillus* foi o mais frequente (81%) durante todo o período de fermentação. Além dos *Lactobacillus*, outras bactérias lácticas foram encontradas. Dentre elas, espécies dos gêneros *Leuconostoc* e *Lactococcus*. As bactérias gram-negativas identificadas eram representadas por espécies dos gêneros *Serratia* e *Klebsiela*. Os isolados de leveduras foram identificados em espécies dos gêneros *Candida*, *Kluyveromyces*, *Torulaspora*, *Pichia* e *Saccharomyces*. A espécie bacteriana dominante foi *Lactobacillus fermentum* e *Candida kunwiensis* foi a espécie de levedura dominante, durante as 24 horas de fermentação. Os grãos de quefir foram observados utilizando-se a microscopia eletrônica de varredura, que indicou maior colonização de bactérias e leveduras na superfície externa dos grãos. Os grupos de microrganismos identificados realizaram três tipos de fermentação durante o processo: láctica, alcoólica e acética. O pH diminuiu nas 24 horas de fermentação. O conteúdo de proteína e de ferro aumentou e o de lactose diminuiu. O conteúdo de etanol apresentou um ligeiro aumento, o ácido acético aumentou paulatinamente e o ácido láctico apresentou máxima concentração de 17,4 mg/mL, em 24 horas de fermentação. Tanto o crescimento microbiano como as atividades químicas durante o processo de fermentação ocorreram de forma similar.

*Comitê Orientador: Dra. Rosane Freitas Schwan – UFLA (Orientadora), Dra. Patrícia Gomes Cardoso – UFLA

ABSTRACT

MAGALHÃES, Karina Teixeira. **Microbiological and chemical characterization of milk Kefir beverage.** In: _____. Microbiological and chemical characterization of milk and brown sugar Kefir beverage. 2008. Cap.1, p.30-67. Dissertation (Master Program in Agricultural Microbiology) – Federal University of Lavras, - Lavras – MG - Brazil.

Kefir is a fermented beverage produced by adding Kefir grains to milk. The grains consist of a symbiotic association of yeasts and bacteria. The Kefir beverage is commonly consumed in Brazil. The objective of the study was to characterize and identify the microbial population present in the milk Kefir beverage and characterize the product chemically. A 10% inoculum of Kefir grains was added to whole pasteurized milk (IPÊ - Alto Rio Grande Agricultural Cooperative LTDA – Lavras, MG, Brazil) for 24 aerobic fermentation at 25°C. A total of 359 microbial isolates were identified. The isolates were divided into Gram positive bacteria (67.8%), Gram negative bacteria (3.6%) and yeasts (28.6%). The *Lactobacillus* genus was the most frequent (81%) throughout the fermentation period. Other lactic bacteria were found in addition to the *Lactobacillus*, including species of the *Leuconostoc* and *Lactococcus* genera. The Gram negative bacteria identified were represented by species of the *Serratia* and *Klebsiela* genera. The yeast isolates were identified in species of the *Candida*, *Kluyveromyces*, *Torulaspora*, *Pichia* and *Saccharomyces* genera. The dominant bacterial species was *Lactobacillus fermentum* and *Candida kunwiensis* was the dominant yeast species during the 24 hours of fermentation. The Kefir grains were observed by Electronic Scanning Microscopy that indicated a greater colonization of bacteria and yeasts on the external surface of the grains. The microorganism groups identified carried out three types of fermentation during the process: lactic, alcoholic and acetic. The pH decreased in the 24 hours of fermentation. The protein and iron contents increased but lactose decreased. The ethanol contents presented a slight increase, acetic acid increased slightly and lactic acid presented a maximum concentration of 17.4 mg/mL in 24 hours fermentation. Microbial growth and the chemical activities during the fermentation process occurred in a similar way.

*Guidance Comitee: Dra. Rosane Freitas Schwan – UFLA (Major Professor), Dra. Patrícia Gomes Cardoso – UFLA

1 INTRODUÇÃO

Quefir é uma bebida de leite fermentado cuja origem está nas montanhas caucasianas (Garrote et al., 1997; Pintado et al., 1996; Rodrigues et al., 2005). No Cáucaso, ela é primariamente produzida por leite de ovelhas, considerando que, na Europa, esta produção na escala comercial é basicamente limitada para leite de vaca (Irigoyen et al., 2005). A bebida quefir é tradicionalmente consumida e muitas propriedades saudáveis têm sido propostas (Otlés & Cagindi, 2003).

Efeitos benéficos do consumo da bebida quefir têm sido atribuídos à sua microbiota e aos seus produtos metabólicos (Medrano et al., 2008). O consumo dessa bebida tem sido associado à melhoria da digestão da lactose (Hertzler & Clancy, 2003). Além disso, efeitos antimicrobianos (Santos et al., 2003; Rodrigues et al., 2004), imunomodulatórios (Vinderola et al., 2004), antiinflamatórios (Rodrigues et al., 2005; Lee et al., 2007), cicatrizantes (Rodrigues et al., 2004) e antialérgicos (Lee et al., 2007) também têm sido informados.

A bebida quefir é um produto da fermentação do leite inoculado com grãos de quefir. Estes grãos são irregulares, gelatinosos e variam de tamanho de 3 a 35mm em diâmetro (Guzel-Seydim et al., 2005); contêm bactérias ácido lácticas (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*), bactérias ácido acéticas e leveduras que vivem simbioticamente em uma complexa matriz de polissacarídeos e proteínas (Cheirsilp et al., 2002; Cheirsilp et al., 2003; Rimada & Abraham, 2006; Medrano et al., 2008). Leveduras são importantes na fermentação do quefir para a produção de etanol e dióxido de carbono (Irigoyen et al., 2005). Os grãos, usualmente, contêm leveduras que fermentam lactose (*Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus* e *Torula kefir*), bem como as que não fermentam lactose (*Saccharomyces cerevisiae*) (Irigoyen et al., 2005). O

principal polissacarídeo é o quefiran, que contém quantidades aproximadamente iguais de glicose e galactose (Cheirsilp et al., 2002; Cheirsilp et al., 2003; Rimada & Abraham, 2006; Medrano et al., 2008). Várias espécies de *Lactobacillus* homo e heterofermentativos, incluindo *Lactobacillus kefirifaciens*, *Lactobacillus kefir* (Irigoyen et al., 2005) e *Lactobacillus brevis* (Kooiman 1968), produzem este polissacarídeo.

A composição química da bebida quefir é variável e depende de fatores, tais como o conteúdo de gordura do leite ou o processo tecnológico de produção (Irigoyen et al., 2005). A maior produção formada durante a fermentação é de ácido láctico, acetaldeído, acetoina, diacetil, etanol e CO₂ (Guzel-Seydim et al., 2000). Além disso, durante a fermentação, é possível observar um aumento nos teores de vitamina B₁, B₁₂, cálcio, aminoácidos e vitamina K (Otlés & Cagindi, 2003). A bebida Kefir pode ser produzida com qualquer tipo de leite (vaca, cabra, ovelha, camela, búfala) (Irigoyen et al., 2005) e possui as seguintes características: pH abaixo de 4,0, teor alcoólico entre 0,5% a 2% e conteúdo de gordura dependendo do tipo de leite (Irigoyen et al., 2005).

Os microrganismos presentes nos grãos de quefir, a composição química do leite utilizado e a tecnologia de produção são fatores que influenciam na comunidade microbiológica, nas características físicoquímicas e sensoriais da bebida quefir, durante o processo de fermentação (Irigoyen et al., 2005).

No Brasil, a bebida quefir de leite somente é produzida em âmbito doméstico, não havendo conhecimento da constituição microbiológica e química. Este estudo objetivou identificar a população microbiana presente nesta bebida e realizar a sua caracterização química. A importância do presente trabalho está em ser o primeiro relato científico da constituição microbiológica e química da bebida quefir de leite consumida no Brasil.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostragem dos grãos

Os grãos de quefir para o preparo do inóculo foram obtidos do uso doméstico destes grãos, para produção da bebida quefir. Os grãos foram provenientes de cultivos em leite, de domicílios da cidade de Lavras, MG, Brasil. O inóculo (grãos) foi adaptado ao novo substrato (leite integral pasteurizado Ipê, produzido pela Cooperativa Agrícola Alto Rio Grande Ltda., em Lavras, MG, Brasil), por sete dias, na proporção de 10% de inóculo. Trocas diárias do substrato foram realizadas.

2.2 Fermentação do quefir

Os grãos (250g) utilizados foram lavados em água mineral estéril e posteriormente transferidos assepticamente para Erlenmeyers contendo 2.250mL do leite integral pasteurizado. Os Erlenmeyers contendo os grãos de quefir foram incubados aerobicamente, à temperatura de 25°C, sem agitação, pelo período de 24 horas. Para cada amostra, foram coletados 30 mL do substrato fermentado, para análises microbiológicas e químicas. As coletas foram feitas em intervalos de 6 horas, a partir da adição do inóculo (grãos) no substrato. De cada tempo, foram coletadas três amostras de um mesmo Erlenmeyer.

2.3 Enumeração de bactérias mesófilas, acetobactérias, bactérias ácidas lácticas (BAL) e leveduras

Para a determinação da contagem total de bactérias e leveduras foi utilizada uma alíquota de 100 µL de cada diluição em triplicata que, em seguida, foi espalhada com Alça de Drigalsky, utilizando-se a técnica de plaqueamento por superfície.

A enumeração de microrganismo foi caracterizada utilizando-se sete diferentes meios de cultura: **ágar nutriente (AN)** (g/litro extrato de carne (Merck - Brasil), 3,0g; peptona (Himedia), 5,0g; ágar (Merck - Brasil), 12g e água destilada acrescida de 400 mg/1000mL de nistatina (Sigma, St. Louis, USA) para a contagem de bactérias mesófilas; **MRS (OXOID Brasil Ltda.)** (em g. L⁻¹: peptona 10,0; extrato de carne 8,0; extrato de levedura, 4,0; glicose, 20,0; monooleato de sorbitano (Tween 80), 1,0; K₂HPO₄, 2,0; acetato de sódio, 3,0; citrato de amônia, 2,0; sulfato de magnésio, 0,01; sulfato de manganês, 0,036, acrescido de 400 mg/1000mL de nistatina (Sigma, St. Louis, USA) para a contagem de *Lactobacillus*; **M17 (OXOID Brasil Ltda)** (g/litro peptona balanceada, 5g; peptona de soja, 5g; extrato de levedura, 2,5g; extrato de carne, 5g; lactose, 5g; glicerolfosfato de sódio, 19g; sulfato de magnésio, 0,25g; ácido ascórbico, 0,5g; ágar 15g); acrescido de 400 mg/1000mL de nistatina (Sigma, St. Louis, USA) e pH 7,1 para a contagem de *Lactococcus*; **meio 254 (DSMZ)** (g/litro extrato de malte, 15g; extrato de levedura, 5g; agar, 15g; 60mL de etanol) acrescido de 400 mg/1000mL de nistatina (Sigma, St. Louis, USA) para a contagem de *Acetobacter*; meio **Edwards (modified) (EM) (OXOID Brasil Ltda.)** acrescido de 400 mg/1000mL de nistatina (Sigma, St. Louis, USA) para a contagem de *Streptococcus*; meio **LUSM** (Benkerroum et al., 1993) acrescido de 400 mg/1000mL de nistatina (Sigma, St. Louis, USA) para a contagem de *Leuconostoc* e **(YEPG)** (1% extrato de levedura (Merck - Brasil); 1% peptona Himedia); 1,3% ágar (Merck - Brasil); 2% de glicose (Merck Brasil)), acrescido de 100 mg/1000mL de cloranfenicol (Sigma, St. Louis, USA) para a contagem de leveduras.

Foram feitas diluições seriadas de base 10 para o plaqueamento nos referidos meios de cultivo, com as seguintes diluições: 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶, 10⁷, 10⁸ e 10⁹, para os meios MRS, ágar nutriente, M17, meio 254, Edwards (modified) e LUSM. Para o meio YEPG, as diluições utilizadas foram 10³, 10⁴,

10^5 , 10^6 e 10^7 . As diluições e os plaqueamentos foram feitos em câmara de fluxo laminar e as placas incubadas em BOD, a 28°C, durante 48 horas, para crescimento bacteriano e 5 dias, para crescimento de leveduras.

2.4 Identificação microbiana

Após o período de incubação, as colônias crescidas nas placas foram classificadas de acordo com as características e as estruturas morfológicas, buscando caracterizar os diferentes morfotipos crescidos nos meios de cultivo. Foi realizada contagem total dos morfotipos encontrados, identificando o tipo de meio cultivado, a amostra, a diluição e a triplicata. A partir da contagem total, foi escolhida, para morfologia de colônia, uma placa de cada meio e diluição, cuja contagem se encontrasse entre 30 e 300 colônias. O número de isolados que foram selecionados para identificação, foi determinado pelo cálculo da raiz quadrada do número total de isolados, contados conforme mencionado no Bacteriological Manual for Foods (Food Drugs Administration, FDA, 1972). Os isolados foram purificados por meio de sucessivas repicagens e as leveduras separadas de bactérias por meio de exame microscópico. Para certificação da pureza das bactérias, foram realizados testes pela técnica de coloração diferencial de Gram, descrita em Madigan et al. (2004) e Pelczar et al. (1996).

As bactérias Gram-negativas foram identificadas usando Kits Bac-Tray I e II (Difco United States of America).

As bactérias Gram-positivas foram submetidas à realização de testes específicos: catalase, motilidade, oxidase e produção de ácido e gás a partir da glicose. As interpretações dos resultados e das provas bioquímicas para a identificação dos isolados seguiram instruções do “Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology” (Holt et al., 1994), “The Prokaryotes” (Hammes et al., 1991). Os *Lactobacillus* foram agrupados de acordo com as características fisiológicas (heterofermentativos obrigatórios, homofermentativos obrigatórios,

heterofermentativos facultativos). As principais provas utilizadas foram: crescimento a 15°C, produção de NH₃ a partir da arginina e fermentação de fontes de carbono [(Sigma Chemical Co., St Louis, Mo, USA) arabinose, celobiose, esculina, galactose, maltose, manose, melezitose, melibiose, rafinose, ribose, sacarose, trealose e xilose]. Uma vez agrupados, a identificação dos microrganismos foi realizada por meio do sistema API 50CHL (BioMérieux Brasil SA).

A caracterização dos isolados de leveduras foi realizada usando testes convencionais descritos por Kurtzman et al. (2003) e Barnett et al. (2000). Os testes incluíam habilidade para fermentar açúcares, assimilação de compostos de nitrogênio, teste de Diazonium blue B (DBB), produção de ácido acético e crescimento em diferentes temperaturas. A habilidade das leveduras em fermentar açúcares foi detectada por exame das culturas para a produção de gás CO₂. A solução filtro-esterilizado dos açúcares a 6% [2mL; glicose, galactose, sacarose, maltose, lactose, melizitose, celobiose, D-xilose, metil α -D-glucosídeo e Rafinose (Sigma Chemical Co., St Louis, Mo, USA)] foi assepticamente misturada com caldo extrato de levedura a 2% (4mL), em tubos contendo um tubo de Durham invertido. A suspensão de células de levedura (0,2mL) também foi adicionada nos tubos e, posteriormente, incubada a 25°C. Observações foram feitas em intervalos de 7 a 21 dias.

Como num sistema de “carimbo”, as colônias foram inoculadas em placas contendo os meios para testes de assimilação de carboidratos [(Sigma Chemical Co., St Louis, Mo, USA) (glicose, galactose, sacarose, maltose, celobiose, trealose, lactose, melibiose, rafinose, melizitose, sorbose, inulina, amido solúvel, xilose, L e D arabinose, D-ribose, L-ramnose, glicerol, eritritol, ribitol, galactitol, manitol, glucitol, salicina, L-K-d-glucanal, succinato de sódio, citrato de sódio, inositol, metanol, etanol)] e nitrogênio [(Sigma) (nitrato e nitrito de sódio, lisina, etilamina, glucosamina)], resistência a cicloheximida

(Sigma) (0,01% e 0,1%), crescimento em meio sem vitamina e teste de osmolaridade (50% e 60% de glicose, e 10% e 16% de NaCl (Merck - Brasil)). Para o teste de produção de ácido acético, uma pequena porção do inóculo de leveduras foi repicada em placas de YEPG (1% extrato de levedura (Merck - Brasil), 1% peptona (Himedia), 1,3% ágar (Merck), 2% de glicose (Merck - Brasil)) com 0,5% CaCO₃ (Merck - Brasil). A produção de ácido acético foi observada com a formação de zonas claras ao redor da cultura. O crescimento de leveduras a diferentes temperaturas foi testado por repicagem da cultura em placas de YEPG (1% extrato de levedura (Merck - Brasil), 1% peptona (Himedia), 1,3% ágar (Merck - Brasil), 2% de glicose (Merck - Brasil)) e incubação, por 5 dias, em diferentes temperaturas: 25°C, 30°C, 37°C, 42°C e 45°C.

2.5 Observação dos grãos de quefir usando Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Os grãos de quefir foram observados em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). As amostras foram coletadas para a visualização das superfícies externas e internas dos grãos. Utilizaram-se dois grãos de quefir cultivados por 24 horas, a 25°C, em leite integral pasteurizado Ipê.

Posteriormente às coletas das amostras, os grãos foram imersos em solução fixativa (Karnovisks modificada), pH 7,2, por 24 horas. Depois, uma das amostras foi transferida para glicerol 30%, por 30 minutos e imersa em nitrogênio líquido para posterior fratura em superfície metálica resfriada também por nitrogênio líquido. Ambas as amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1%, desidratadas em gradiente de acetona (25%, 50%, 75%, 90% e 100%) por três vezes e secas em máquina de ponto crítico (Bal-tec CPD 030). Foram montados os *stubs* e cobertos com ouro no metalizador (Bal-tec SDC 050). Ao

final deste procedimento, os *stubs* foram examinados em microscópio eletrônico de varredura (Leo EVO 040), 1 no laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultra-Estrutural (LME) da UFPA.

2.6 Análises químicas

O pH foi determinado, na bebida quefir, utilizando-se potenciômetro Micronal modelo B474, segundo técnica estabelecida pela Association of Official Analytical Chemist, AOAC (1995). A acidez titulável foi determinada por titulometria com solução de Dornic, utilizando-se como indicador a fenolftaleína e o resultado expresso em graus Dornic (°D). A determinação de proteína bruta foi calculada em função da concentração de nitrogênio total pelo método Kjeldahl e os conteúdos de gordura, vitamina C (ácido ascórbico), cinza, ferro, umidade e matéria seca foram determinados segundo normas da AOAC (1995). O teor de cálcio nas amostras também foi determinado segundo AOAC (1995), por espectrofotometria de absorção atômica, em equipamento Varian, modelo Spectra-A 100-200 (110 V), com faixa de comprimento de onda de 185 a 900 nm, seleção de comprimento de onda e fenda automatizadas, utilizando-se uma lâmpada de 10 mA, combustível acetileno, meio suporte óxido nítrico e estequiometria de chama reduzida, com cone vermelho de 1-1,5 cm de altura. O comprimento de onda utilizado na determinação foi de 422,7 nm. Etanol, ácidos orgânicos (lático e acético) e carboidrato (lactose) foram analisados no período de 24 horas de fermentação.

Amostras foram coletadas em intervalos de 6 horas, desde a adição do inóculo (grãos) ao substrato. As amostras do fermentado foram primeiramente desengorduradas com hexano. A uma alíquota de 0,5 mL de amostra adicionaram-se 0,5 mL de hexano, levando-se ao vortex por 30 segundos e, posteriormente, ao repouso. A camada hexânica foi retirada e desprezada. A camada aquosa foi centrifugada e o sobrenadante filtrado em membrana de 0,45

µm. Para análise do carboidrato (lactose), foram injetados 20 µL no cromatógrafo líquido Shimadzu, equipado com detetor, por índice de refração. Coluna: Microsorb 100-5 amino 250 x 4,6 mm (Varian). Fase móvel: acetonitrila/água (60:40). Fluxo: 1,2 mL/min. Para as análises dos ácidos orgânicos e etanol (padronização interna), foram utilizadas as mesmas amostras, tendo apenas sido adicionados 100µL de uma solução aquosa do padrão interno (butanol 1,38 mg/mL) a 400 µL das amostras. Foram injetados 2 µL no cromatógrafo a gás Varian GP-3380. Coluna: HP-FFAP 25 m x 0,25 mm (Agilent). Programação de temperatura na coluna 70°C, 0 min, 10°C/min, 140°C, 0 min, 15°C/min, 240°C. Injetor: 260°C. Split: 1/100. Detector de ionização de chamas: 260°C.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Enumeração microbiana

A população microbiana (\log_{10} ufc/mL) da bebida fermentada quefir foi observada durante as 24 horas de fermentação dos grãos em leite integral pasteurizado (Tabela 1). Todos os gêneros microbianos mostraram crescente aumento populacional durante o período de 24 horas de fermentação. Os valores variaram entre um mínimo de $3,51 \log_{10}$ ufc/mL e um máximo de $6,72 \log_{10}$ ufc/mL no tempo 0 de fermentação. Após 24 horas de fermentação, os valores variaram entre um mínimo de $7,21 \log_{10}$ ufc/mL e um máximo de $12,41 \log_{10}$ ufc/mL. O substrato sem conter o inóculo apresentou crescimento de espécies do gênero *Lactobacillus*.

A população microbiana, durante um período de 22 horas de fermentação dos grãos de quefir em leite pasteurizado, também mostrou aumento populacional durante a fermentação em estudos realizados por Guzel-Seydim et al. (2005). Witthuhn et al. (2004b) relataram que a população microbiana, de 3 a 30 dias de cultivo, não mostrou aumento durante todo o período de cultivo dos grãos de quefir.

TABELA 1 Enumeração (\log_{10} ufc/mL) microbiana durante o período de fermentação da bebida quefir de leite

Grupo preditivo de microrganismos	Tempo de fermentação (h)					
	SSI	T0	T6	T12	T18	T24
<i>Streptococcus</i>	*ND	3,51±0,01	4,11±0,03	4,42±0,08	4,61±0,07	7,54±0,01
Bactérias mesófilas	*ND	5,81±0,01	6,51±0,01	6,91±0,02	7,12±0,02	7,34±0,04
<i>Leuconostoc</i>	*ND	6,72±0,01	6,04±0,02	7,51±0,01	7,62±0,01	10,41±0,02
<i>Acetobacter</i>	*ND	5,92±0,01	6,13±0,01	6,63±0,01	7,33±0,01	7,72±0,01
<i>Lactobacillus</i>	5,31±0,04	6,31±0,02	6,14±0,01	6,52±0,01	7,43±0,01	12,41±0,03
<i>Lactococcus</i>	*ND	6,13±0,01	6,21±0,02	6,42±0,01	6,63±0,01	7,21±0,02
Leveduras	*ND	6,21±0,01	6,72±0,01	7,32±0,01	7,43±0,01	8,11±0,03

SSI = Substrato sem inóculo, *ND = Não detectado
 Os dados são médias de três replicatas \pm desvio padrão

3.2 Identificação dos isolados microbianos

Os isolados identificados na bebida fermentada quefir de leite estão listados na Tabela 2. Os gêneros de bactérias identificados incluem *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Klebsiela* e *Serratia*; os gêneros de leveduras incluem *Kluyveromyces*, *Torulaspora*, *Saccharomyces*, *Candida* e *Pichia*. *Lactobacillus* estiveram presentes em todos os tempos de fermentação analisados, indicando ser um grupo de importância para a produção do quefir. Os gêneros de bactérias (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*) e os gêneros de leveduras (*Kluyveromyces*, *Torulaspora*, *Saccharomyces*, *Candida* e *Pichia*) tiveram prévia informação como sendo pertencentes à bebida fermentada quefir de leite (Lee et al., 2007; Lappe et al., 1992; Ângulo et al., 1993). Porém, os gêneros bacterianos *Klebsiela* e *Serratia* foram identificados, pela primeira vez, na bebida fermentada quefir de leite.

A bebida examinada neste estudo não mostrou presença de bactérias ácido acéticas (BAA), como relatado por Koroleva (1988). Witthuhn et al. (2004b), em seus estudos, também não encontraram BAA na bebida quefir de leite. BAA são consideradas como contaminantes por alguns pesquisadores (Angulo et al., 1993).

Um total de 359 isolados microbianos foi identificado na bebida quefir de leite (Tabela 2). Os isolados se dividiram em bactérias Gram-positivas (67,8%), bactérias Gram-negativas (3,6%) e leveduras (28,6%). O gênero *Lactobacillus* foi o mais freqüente (81%) durante todo o período de fermentação e incluiu as espécies *Lactobacillus fermentum* (103 isolados), *Lactobacillus paracasei* ssp *paracasei* 1 (45 isolados), *Lactobacillus brevis* 3 (17 isolados), *Lactobacillus brevis* 1 (15 isolados) *Lactobacillus fructivorans* (11 isolados), *Lactobacillus paracasei* ssp *paracasei* 2 (4 isolados), *Lactobacillus paracasei* ssp *paracasei* 3 (2 isolados). O substrato sem adição de inóculo somente apresentou crescimento da espécie *Lactobacillus brevis* 1 (12 isolados). A

espécie *Lactobacillus brevis* 1 permaneceu na bebida quefir durante o período de fermentação.

Segundo Kooiman (1968), a presença de *Lactobacillus brevis* na bebida fermentada quefir é de grande importância. Segundo seus estudos, a espécie é a principal responsável pela produção do polissacarídeo quefiram.

Além dos *Lactobacillus*, outras bactérias lácticas foram achadas. Dentre elas, *Leuconostoc Lactis* (21 isolados), *Leuconostoc mesenteroides* ssp *cremoris* (4 isolados) e *Lactococcus lactis* ssp *lactis* 1 (3 isolados). Muitos pesquisadores têm estudado a composição da microbiota presente na bebida quefir, que contém bactérias lácticas pertencentes a uma diversidade de espécies e gêneros que também incluem *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Leuconostoc* (Assadi et al., 2000; Santos et al., 2003; Yüksesdag et al., 2004; Witthuhn et al., 2004b; Witthuhn et al., 2004a). Por haver predominância de bactérias lácticas na bebida fermentada, pode-se dizer que se trata de uma fermentação, em que o principal produto formado é o ácido láctico (Otlés & Cagindi, 2003). Este ácido contribui com as características organolépticas da bebida (Otlés & Cagindi, 2003).

Serratia plymuthica (6 isolados) foi detectada durante as primeiras 12 horas de fermentação. Esta espécie Gram-negativa foi detectada em bebida fermentada indígena (cauim) (Almeida et al., 2007). *Klebsiela ozaenae* (3 isolados) também foi achada na bebida fermentada quefir, no período inicial da fermentação. Esta espécie foi achada em amostras de água, em estudos realizados por Tomas et al. (1986). *Serratia plymuthica* e *Klebsiela ozaenae* são comumente encontradas no ambiente e, portanto, sua presença na bebida quefir pode ser explicada pela manipulação dos grãos. Não foram encontrados dados na literatura sobre os aspectos clínicos e ambientais de ambas as espécies identificadas. O não crescimento das espécies *Serratia plymuthica* e *Klebsiela ozaenae*, após 12 horas de fermentação, pode ser devido ao aumento da acidez da bebida, pela presença de ácidos, como o láctico e ou o acético, produzidos por

alguns microrganismos. O aumento da acidez em bebidas fermentadas pode inibir o crescimento de algumas espécies microbianas (Rubio et al., 1993). *Serratia plymuthica* e *Klebsiela ozaenae* não foram descritas anteriormente como presentes na microbiota da bebida quefir de leite.

Os isolados de leveduras foram identificados como *Candida kunwiensis* (34), *Kluyveromyces marxianus* (28), *Kluyveromyces lactis* var. *lactis* (23), *Torulaspota delbrueckii* (14), *Pichia guilliermondii* (9), *Saccharomyces cerevisiae* (4). As espécies de leveduras *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces lactis* var. *lactis*, *Torulaspota delbrueckii*, *Pichia guilliermondii* e *Saccharomyces cerevisiae* foram previamente identificadas como pertencentes à bebida fermentada quefir, por alguns autores, em análises de grãos de quefir cultivados em leite (Lappe et al., 1992; Angulo et al., 1993; Lin & Kuo, 1999; Lee et al., 2007). Porém, a espécie predominante, *Candida kunwiensi*, não foi anteriormente encontrada em bebida fermentada quefir de leite. *Candida kunwiensis* é comumente encontrada no ambiente e foi isolada de amostras de flores em estudos realizados por Hong et al. (2003). Os autores relatam, ainda, que a espécie de levedura *Candida kunwiensis* é associada a vetores, como os insetos e a presença desta levedura na bebida quefir pode ser devido à presença de alguns insetos no local de manipulação dos grãos.

TABELA 2 Identificação dos isolados presentes na bebida fermentada quefir de leite

TF (h)	Isolados identificados		NI
SSI	Bactéria Gram-positiva	<i>Lactobacillus brevis</i> 1	12
		<i>Lactobacillus fermentum</i>	23
		<i>Lactobacillus brevis</i> 3	2
T0	Bactéria Gram-positiva	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp <i>paracasei</i> 1	7
		<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp <i>paracasei</i> 3	2
		<i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>lactis</i> 1	3
	Bactéria Gram-negativa	<i>Klebsiela ozaenae</i>	3
	Levedura	<i>Kluyveromyces lactis</i> var. <i>lactis</i>	1
<i>Torulaspora delbrueckii</i>		1	
<i>Kluyveromyces marxianus</i>		2	
<i>Candida kunwiensis</i>		7	
T6	Bactéria Gram-positiva	<i>Lactobacillus fermentum</i>	22
		<i>Lactobacillus brevis</i> 3	12
	Levedura	<i>Pichia guilliermondii</i>	2
		<i>Torulaspora delbrueckii</i>	1
		<i>Kluyveromyces marxianus</i>	8
		<i>Candida kunwiensis</i>	8

TF – Tempo de fermentação, SSI = substrato sem inóculo, NI = Número de isolados.

... Continua ...

TABELA 2 cont.

T12	Bactéria Gram-positiva	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp <i>paracasei</i> 1	11
		<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp <i>paracasei</i> 2	4
		<i>Lactobacillus fermentum</i>	14
		<i>Lactobacillus brevis</i> 1	2
		<i>Lactobacillus fructivorans</i>	3
	Bactéria Gram-negativa	<i>Serratia Plymuthica</i>	6
		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4
	Levedura	<i>Candida kunwiensis</i>	9
		<i>Pichia guilliermondii</i>	3
		<i>Lactobacillus fermentum</i>	20
T18	Bactéria Gram-positiva	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp <i>paracasei</i> 1	6
		<i>Lactobacillus brevis</i> 1	4
		<i>Lactobacillus brevis</i> 3	3
		<i>Leuconostoc Lactis</i>	8
		<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp <i>cremoris</i>	4
	Levedura	<i>Pichia guilliermondii</i>	4
		<i>Candida kunwiensis</i>	10
T24	Bactéria Gram-positiva	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp <i>paracasei</i> 1	21
		<i>Lactobacillus fermentum</i>	35
		<i>Lactobacillus brevis</i> 1	9
		<i>Lactobacillus fructivorans</i>	8
		<i>Leuconostoc Lactis</i>	13
	Levedura	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	12
		<i>Kluyveromyces marxianus</i>	18
		<i>Kluyveromyces lactis</i> var. <i>lactis</i>	22

3.3 Distribuição da microbiota dos grãos do quefir usando Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Com o auxílio da Microscopia Eletrônica de Varredura, a eletromicrografia dos grãos de quefir cultivados no leite foi realizada observando-se toda a região externa e interna dos grãos analisados. Trinta e duas eletromicrografias foram analisadas; nas Figuras 1, 2 e 3 são mostradas as superfícies externa e interna dos grãos. A olho nu (Figura 1 A), a superfície externa do grão é lisa e brilhante. Entretanto, observada sob a MEV, a superfície foi revelada coberta por um aglomerado de microrganismos (Figura 1 B).

Na Figura 2 (A, B, C e D), são observadas leveduras e bactérias juntamente distribuídas na porção externa dos grãos de quefir. A seta da Figura 2A indica uma célula bacteriana em forma de bastonete e as setas da Figura 2 (B e D) indicam células de levedura. Nas amostras fatiadas, a face interna do grão aparentou-se áspera e irregular (Figura 3 A, C e D). Segundo Guzel-Seydim et al. (2005), a aparente superfície cheia de irregularidade pode ser o resultado do procedimento usado na preparação dos grãos para microscopia eletrônica de varredura. Bastonetes, leveduras e polissacarídeo foram observados, a 3.000, 5.000 e 6.000x, na porção externa do grão (Figura 2 A, B, C e D) O polissacarídeo pode ser devido à presença de kefirana nos grãos de quefir do leite. Em estudos realizados por Guzel-Seydim et al. (2005), observou-se a presença de polissacarídeo nas porções externa e interna dos grãos.

Dois tipos de bastonetes foram observados na porção externa do grão de quefir (Figura 1B). A seta 1 (Figura 1B) indica um bastonete curto e a seta 2 (Figura 1B), um bastonete longo. Na porção interna do grão, a observação de leveduras e bastonetes foi menor, comparada com a porção externa (Figura 3 A, B, C e D). Na porção interna do grão também se observou a presença de polissacarídeo, indicado pela seta 1 da Figura 3B. Também se observou célula de levedura na porção interna do grão. A seta 2 da Figura 3B e a seta da Figura

3D indicam a presença de células de leveduras. Célula bacteriana foi observada na porção interna do grão, indicada pela seta da Figura 3C.

A composição e a distribuição microbiológica nos grãos de quefir estão relacionadas à produção de ácidos orgânicos durante a fermentação. No entanto a produção de ácidos orgânicos tem relação direta com o tipo de substrato, a temperatura e o método aeróbico ou anaeróbico de cultivo dos grãos (Guzel-Seydim et al., 2005). O presente estudo mostrou que a microbiota do quefir é mais evidente na superfície externa dos grãos. Outros pesquisadores, como Toba et al. (1990), têm observado que leveduras predominam na parte interna dos grãos de quefir de leite, enquanto a porção externa apresenta, principalmente, bastonetes e poucas leveduras. Os autores relataram, ainda, uma variedade de bastonetes (curto, longo e curvado) em toda parte da amostra.

Guzel-Seydim et al. (2005) observaram bastonetes longos e curvados, principalmente na porção interna dos grãos de quefir do leite e bastonetes curtos na porção externa. Neste estudo, cocos não foram observados em qualquer porção destes grãos. Guzel-Seydim et al. (2005) também não detectaram cocos e Rea et al. (1996) detectaram cocos em uma de suas amostras de grãos de quefir cultivados em leite. Estes autores afirmam que cocos predominaram na superfície externa dos grãos.

Mesmo não havendo visualização de cocos nos grãos analisados, bactérias dos gêneros *Lactococcus* e *Leuconostoc* foram identificadas na bebida quefir fermentada por estes grãos. Este fato pode ser devido à liberação de células cocos dos grãos de quefir para o substrato, durante o período de fermentação e, portanto, a não visualização de cocos aderidos aos grãos analisados.

Em comparação com os microrganismos identificados neste estudo, pôde-se notar que o número de bactérias foi superior ao número de leveduras identificadas na bebida quefir analisada. E a visualização de eletromicrografias

de grãos de quefir utilizados para produção da bebida quefir mostrou que o número de bactérias distribuídas nos grãos também foi superior ao número de leveduras distribuídas neles.

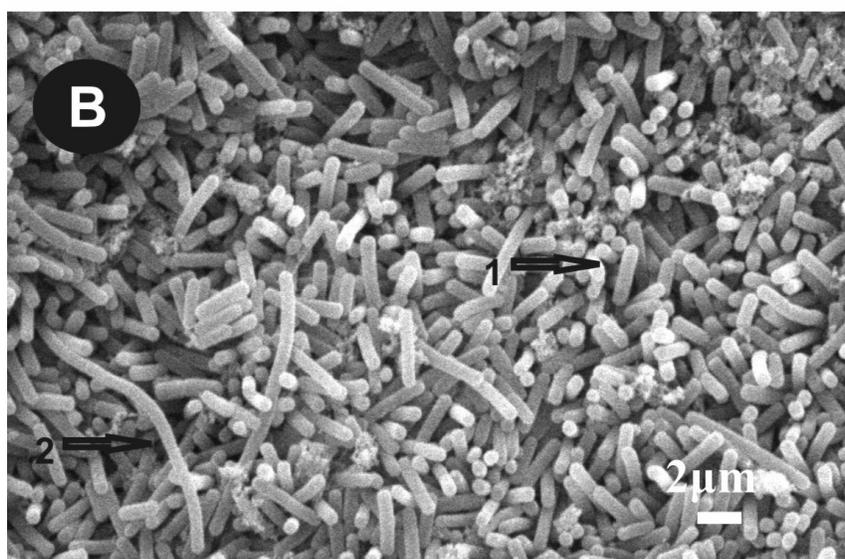
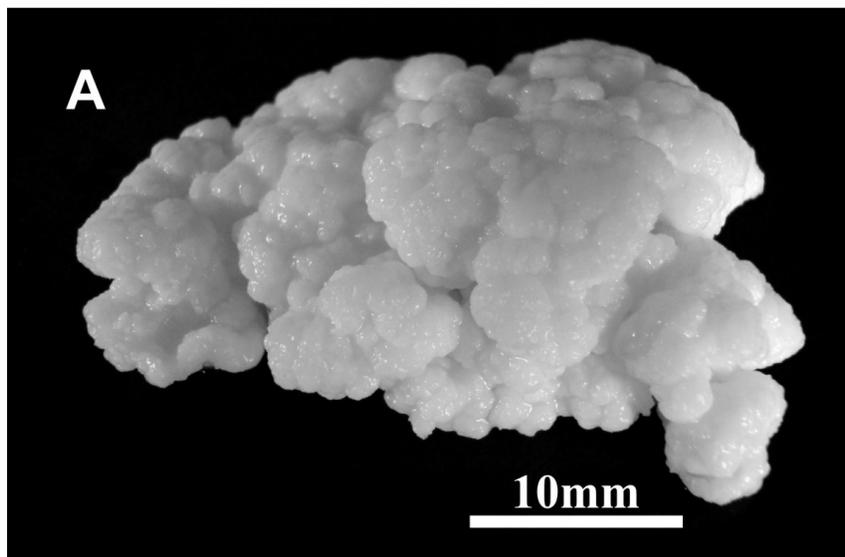


FIGURA 1 Eletromicrografia de varredura de grãos de quefir do leite. A - Grão de quefir. B – Superfície externa do grão de quefir

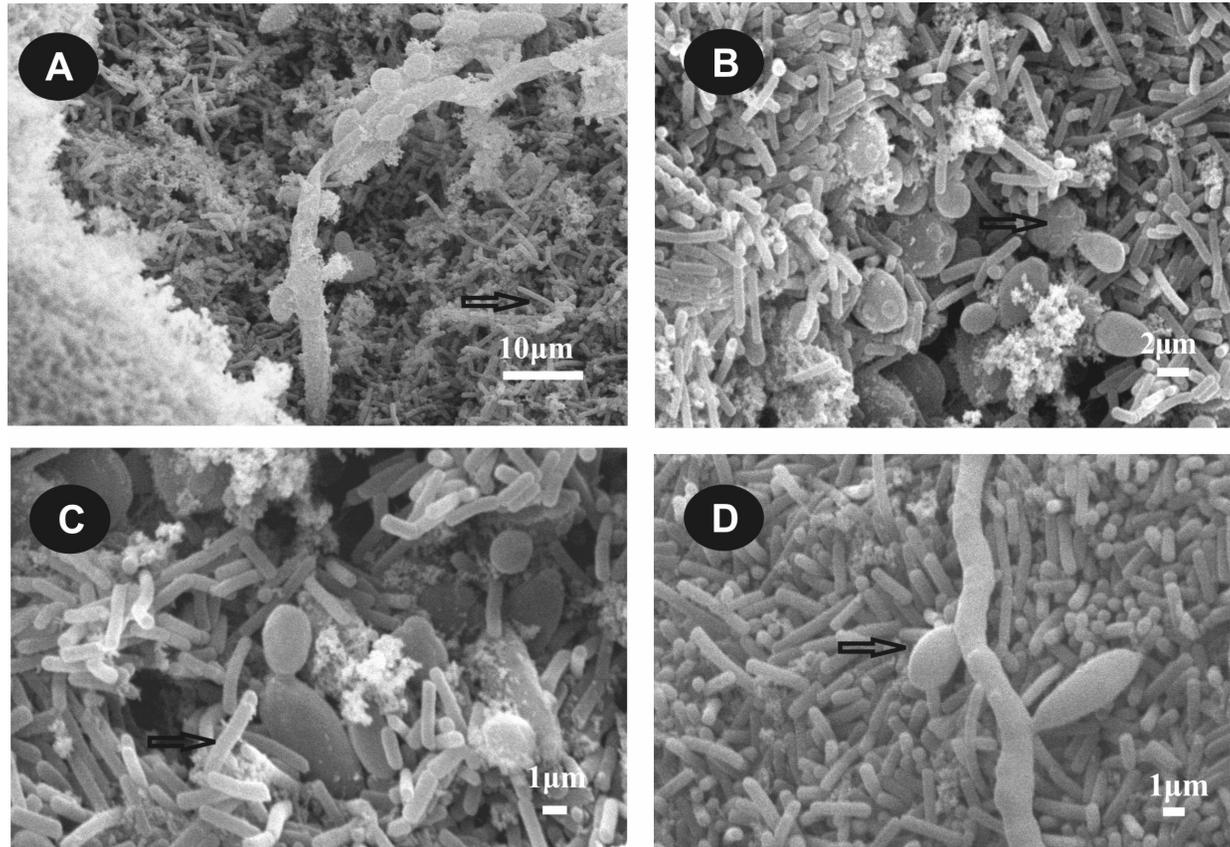


FIGURA 2 Eletromicrografia de varredura de grãos de quefir do leite. A,B,C,D – Superfície externa do grão de quefir

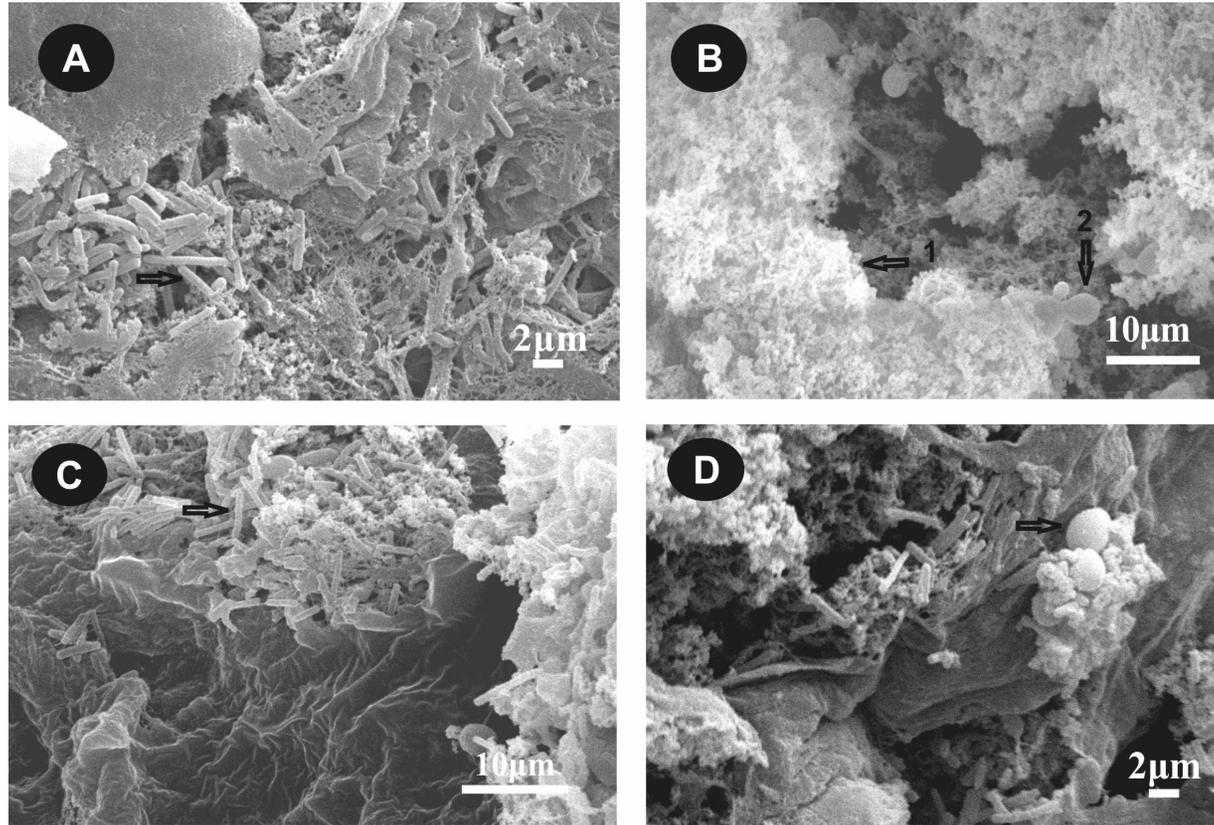


FIGURA 3 Eletromicrografia de varredura de grãos de quefir do leite. A,B,C,D – Superfície interna do grão de quefir

3.4 Caracterização química da bebida fermentada quefir

O valor do pH decresceu durante o período de 24 horas de fermentação da bebida quefir de leite, com valor inicial de 5,6 e alcançando 3,4 no fim do processo de fermentação (Tabela 3). O pH é um importante fator que pode fortemente afetar a qualidade do produto, durante o processo de fermentação. A alteração nos valores de pH afetou os níveis de dióxido de carbono produzidos durante a fermentação da bebida quefir. Adicionalmente, o tempo de fermentação e os níveis de compostos aromáticos formados foram significativamente influenciados pelo valor do pH da bebida, refletindo possíveis variações nas características sensoriais do produto final (Athanasiadis et al., 2004). Durante todo o período de fermentação, foram encontrados diversos microrganismos produtores de ácidos orgânicos. A presença destes microrganismos proporcionou o aumento da acidez titulável, que alcançou 93°D, em 24 horas.

O conteúdo de proteína (Tabela 3) aumentou durante o período de 24 horas de fermentação da bebida. Este resultado pode ser explicado, principalmente, pelo aumento da biomassa microbiana ocorrida durante o processo. A ação metabólica de alguns microrganismos anaeróbios facultativos, registrados na literatura como fixadores de nitrogênio, como algumas espécies do gênero *Klebsiella*, também pode contribuir para o aumento de proteína no substrato (Rubio et al., 1993).

O conteúdo de gordura da bebida quefir apresentou um decréscimo durante o período de 24 horas de fermentação (Tabela 3). Segundo Vujicic et al. (1992), o decréscimo no nível de gordura pode ter ocorrido devido à produção de lipases, por microrganismos presentes na bebida quefir, durante o processo de fermentação. Irigoyen et al. (2005) não encontraram diferenças significativas no teor de gordura da bebida quefir de leite, fermentada por 24 horas. O tipo de

leite utilizado como substrato ou a porcentagem de grãos de quefir inoculados podem influenciar no conteúdo de gordura do produto final.

O teor de cálcio não apresentou diferença no período de 24 horas de fermentação (Tabela 3). O conteúdo de ferro aumentou de 0,1% para 2,9%. Isto pode ser devido à presença da lactoferrina, proteína do leite que se une ao ferro e o transporta, aumentando a sua biodisponibilidade no meio (Sánchez et al., 1992). Este fato ocorre quando o pH está baixo e o meio se encontra ácido (Sánchez et al., 1992) e pode ser explicado pelo aumento da concentração de ferro na bebida quefir. Isso porque, durante o período de 24 horas de fermentação, o substrato tornou-se ácido, possibilitando a ação da lactoferrina. No presente estudo não foi detectada vitamina C na bebida quefir.

O teor de umidade e de matéria seca da bebida não apresentou diferenças em seus valores, durante o período de 24 horas de fermentação (Tabela 3). Resultados semelhantes foram encontrados em estudos feitos por Irigoyen et al. (2005), com grãos de quefir cultivados em leite.

O conteúdo de cinzas na bebida quefir não apresentou diferença em análises realizadas com o produto, no início e no fim do período de 24 horas de fermentação (Tabela 3). Wszolek et al. (2001) também não encontraram diferenças significativas no teor de cinzas, nos produtos fermentados pelos grãos de quefir, no período de 24 horas, em três distintas espécies de leite (bovino, caprino e ovino).

Os ácidos orgânicos podem ocorrer em produtos leiteiros como resultado da hidrólise de ácidos graxos, processos bioquímicos ou metabolismo microbiano (Guzel-Seydim et al., 2000). A lactose foi consumida durante as 24 horas de fermentação (Figura 4), decrescendo, em nível constante, de 46,9 mg/mL para 31,7 mg/mL. Irigoyen et al. (2005) também relataram resultados semelhantes em leites fermentados com grãos de quefir com 5% de inóculo e resultados inferiores de consumo da lactose em leite fermentado com 1% de

inóculo. Assadi et al. (2000) fabricaram a bebida quefir usando 5% de inóculo e encontraram níveis baixos de consumo de lactose. A porcentagem de grãos de quefir inoculados no substrato ou o método de cultivo podem influenciar no conteúdo de lactose no fermentado (Irigoyen et al., 2005).

O teor de ácido láctico aumentou notavelmente durante as 12 horas finais do processo de fermentação (Figura 4), alcançando sua maior concentração às 24 horas (17,4 mg/mL). Cabe mencionar que, durante este período, a população de bactérias lácticas também aumentou. A presença deste ácido em fermentação láctica é de suma importância porque é capaz de proporcionar sabor agradável e inibir o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis ou patogênicos, por proporcionar o aumento da acidez e diminuir o valor de pH do substrato em que se encontram (Rubio et al., 1993).

Leveduras são primariamente responsáveis pela produção de álcool na bebida quefir. As leveduras mais comuns isoladas do quefir e responsáveis pela produção de etanol são as do gênero *Saccharomyces*, *Candida*, *Kluyveromyces* e *Torulaspota* (Guzel-Seydim et al., 2000). Embora as leveduras sejam comumente reorganizadas por habilidade em produzir etanol, algumas bactérias dos gêneros *Lactococcus* e *Lactobacillus* também possuem esta capacidade. Representantes dos gêneros *Lactococcus* e *Lactobacillus* possuem atividade da enzima álcool-desidrogenase, que converte acetaldeído em etanol (Beshkova et al., 2003).

A concentração de etanol durante as 24 horas de fermentação apresentou aumento de 0,10 mg/mL para 0,48 mg/mL (Figura 4). Cabe mencionar que, durante este período, a população de leveduras também aumentou. Guzel-Seydim et al. (2000) também notaram ligeiro aumento na concentração de etanol, no período de 24 horas de fermentação do quefir de leite.

A concentração de ácido acético aumentou durante o tempo de fermentação, apresentando ligeiras variações (Figura 4). O ácido acético

quantificado na fermentação pode ter sido produzido por bactérias heteroláticas (Rubio et al., 1993) ou por representantes do gênero *Acetobacter*, que não foram identificadas neste trabalho. A acumulação deste metabólito no substrato torna-o ácido e exerce um efeito inibitório a microrganismos patógenos, maior que o ácido láctico (Rubio et al., 1993).

Ainda não há informações disponíveis sobre os processos fermentativos, a microbiota envolvida e os componentes nutricionais, da bebida quefir de leite consumida no Brasil. Portanto, o estudo realizado foi importante para um conhecimento da constituição microbiológica e química desta bebida. Porém, estudos futuros devem ser realizados sobre os benefícios nutricionais e terapêuticos da bebida quefir de leite consumida no Brasil.

TABELA 3 Valores de acidez total titulável, pH, proteína, gordura, vitamina C, Ca, Fe, umidade, matéria seca e cinza, contidos na bebida fermentada quefir

TF (h)	ATT (°D)	pH	Proteína (%)	Gordura (%)	Vitamina C (%)	Ca (%)	Fe (%)	Umidade (%)	Matéria seca (%)	Cinza (%)
T0	26±1	5,6±0,2	2,1±0,8	3,6±0,6	*ND	0,2±0,1	0,1±0,1	88,2±0,2	9,8±0,2	0,7±0,3
T24	93±1	3,4±0,1	3,9±0,2	2,3±0,5	*ND	0,2±0,1	2,9±0,3	90,5±0,3	9,5±0,3	0,6±0,4

TF = Tempo de fermentação, ATT = Acidez total titulável, Ca = Cálcio, Fe = Ferro, *ND = Não detectado.
Os dados são médias de três replicatas ± desvio padrão.

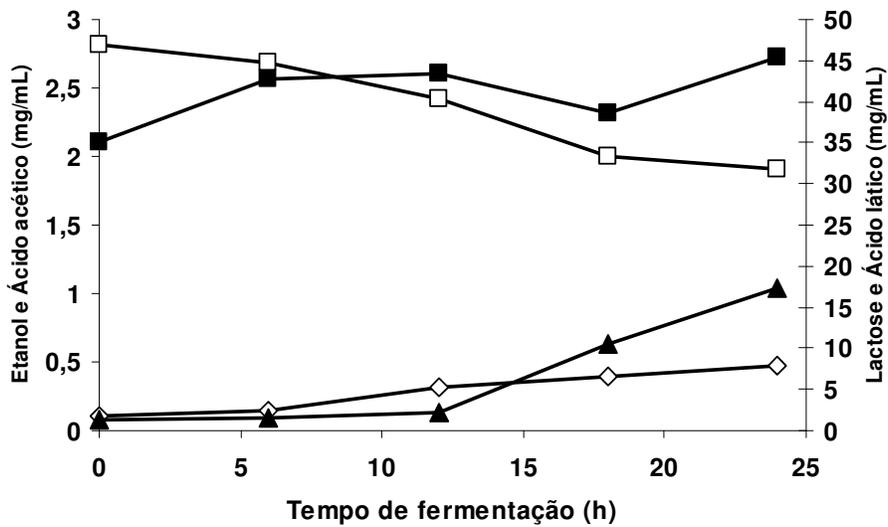


FIGURA 4 Etanol (◇), ácido acético (■), ácido láctico (▲) e lactose (□) contidos na bebida fermentada quefir, durante o processo de 24 horas de fermentação.

4 CONCLUSÃO

A espécie bacteriana dominante foi *Lactobacillus fermentum* e *Candida kunwiensis* foi à espécie de levedura dominante durante as 24 horas de fermentação da bebida quefir de leite.

Durante o processo de fermentação, foram observadas três distintas populações microbianas. As bactérias lácticas predominaram, seguidas pelas leveduras e bactérias Gram-negativas.

Os grupos de microrganismos presentes na bebida realizaram três tipos de fermentação durante o processo: láctica, alcoólica e acética.

Os grãos de quefir indicaram maior colonização de bactérias e leveduras na superfície externa dos grãos, em análises realizadas usando o método de Microscopia Eletrônica de Varredura.

Foi possível observar que o aumento da população de bactérias lácticas proporcionou aumento na concentração de ácido láctico na bebida.

Com o maior número de leveduras também se pôde observar que a concentração de etanol aumentou.

A fermentação da bebida quefir que ocorreu de forma não controlada, iniciada com inóculo de população mista de microrganismos e os processos de fermentações realizados, que também ocorreram de maneira mista, foram similares.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de estudos para Karina Teixeira Magalhães e à Cooperativa Agrícola Alto Rio Grande Ltda., em Lavras, MG, Brasil, pelo fornecimento do leite para a execução do experimento. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), pelo suporte financeiro.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, E.G.; RACHID, C.C.T.C.; SCHWAN, R.F. Microbial population present in fermented beverage 'cauim' produced by Brazilian Ameridians. **International Journal of Microbiology**, v 120, p. 146-151, 2007.

ANGULO, L.; LOPEZ, E.; LEMA, C. Microflora present in kefir grains of the Galician Region (North-West of Spain). **Journal of Dairy Research**, v. 60, p. 263-267, 1993.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMIST. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist**. 16thed. Washington, 1995.

ASSADI, M.M.; POURAHMAD, R.; MOAZAMI, N. Use of isolated kefir starter cultures in kefir production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 16, p. 541-543, 2000.

ATHANASIADIS, I.; PARASKEVOPOULOU, A.; BLEKAS, G.; KIOSSEOGLOU, V. Development of a Novel Whey Beverage by Fermentation with Kefir Granules. Effect of Various Treatments. **Biotechnology**, v. 20, p. 1091-1095, 2004

BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. **Yeast – characteristic and Identification**. 3rded. Cambridge: Cambridge University, 2000.

BENKERROUM, N.; MISBAH, M.; SANDINE, W.E.; ELARAKI, A.T. Development and use of a selective médium for isolation of *Leuconostoc* spp. From vegetables and dairy products. **Applied Environmental Microbiology**, v. 59, n. 2, p. 607-609, 1993.

BESHKOVA, D.M.; SIMOVA, E.D.; FRENGOVA, G.I.; SIMOV, Z.I.; DIMITROV, Z.H.P. Production of volatile aroma compounds by kefir stater cultures. **International Dairy Journal**, v. 13, p. 529-535, 2003.

CHEIRSILP, B.; SHIMIZU, H.; SHIOYA, S. Enhanced kefir production by mixed culture of *Lactobacillus kefiranofaciens* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biotechnology**, v. 100, p. 43-53, 2002.

CHEIRSILP, B.; SHOJI, H.; SHIMIZU, H.; SHIOYA, S. Interactions between *Lactobacillus kefiranofaciens* and *Saccharomyces cerevisiae* in mixed culture

for kefir production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 96, n. 3, p. 279-284, 2003.

FOOD DRUGS ADMINISTRATION. **Bacteriological analytical manual**. Washington: AOAC, 1972.

GARROTE, G.L.; ABRAHAM, A.G.; ANTONI, G.L. de. Preservation of kefir grains, a comparative study. **Technological, Lebensm**, v. 30, p. 77-84, 1997.

GUZEL-SEYDIM, Z.B.; SEYDIM, A.C.; GREENE, A.K.; BODINE, A.B. Determination of Organic Acids and Volatile Flavor Substances in Kefir during Fermentation. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 13, p. 35-43, 2000.

GUZEL-SEYDIM, Z.; WYFFELS, J.T.; SEYDIM, A.C.; GREENE, A.K. Turkish kefir and kefir grains: microbial enumeration and electron microscopic observation. **International Journal of Dairy Technology**, v. 58, n. 1, p. 25-29, 2005.

HAMMES, N.W.; WEISS, N.; HOLZAPFEL, W. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: BALLOWS . (Ed.). **The prokaryotes**. New York: Springer-Verlang, 1991. v. 2, p. 1535-1594.

HERTZLER, S.R.; CLANCY, S.M. Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. **Journal Diet Association**, v. 103, p. 582-587, 2003.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9.ed. Baltimore: Williams &Wilkins, 1994. 787 p.

HONG, S.G.; BAE, K.S.; HERZBERG, M.; TITZE, A.; LACHANCE, M.A. *Candida kunwiensis* sp. Nov., a yeast associated with flowers and bumblebees. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 367-372. 2003.

IRIGOYEN, A.; ARANA, I.; CASTIELLA, M.; TORRE, P.; IBÁÑEZ, F.C. Microbiological, physicochemical, and sensory characteristics of kefir during storage. **Food Chemistry**, v. 90, p. 613-620, 2005.

KOOIMAN, P. The chemical structure of kefiran, the water-soluble polysaccharide of the kefir grain. **Carbohydrate Research**, v. 7, p. 200-211, 1968.

KOROLEVA, N.S. Technology of kefir and kumys. **Bulletin of the International Dairy Federation**, v. 227, p. 96-100, 1988.

KURTZMAN, C.P.; BOEKHOUT, T.; ROBERT, V.; FELL, W.J.; DEAK, T. Methods to identify yeasts. In: ROBERT, V. (Ed.). **Yeasts in food: beneficial and detrimental aspects**. Hamburg: B. Beh's Verlag GmbH, 2003. p. 69-117.

LAPPE, P.; MONROY, M.T.R.; VEGA, C.A.; ULLOA, M. Especies de levaduras aisladas de tибicos cultivados en soluciones azucaradas de piloncillo y de melaza. **Micologya**, v. 5, p. 1-10, 1992.

LEE, M.Y.; AHN, K.S.; KWON, O.K.; KIM, M.J.; KIM, M.K.; LEE, I.Y.; OH, S.R.; LEE, H.K. Anti-inflammatory and anti-allergic effects of kefir in mouse asthma model. **Immunobiology**, v. 212, p. 647-654, 2007.

LIN, C.W.; KUO, C.Y. Identification and characterization of lactic acid bacteria and yeasts isolated from kefir grains in Taiwan. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 54, p. 14-18, 1999.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de brock**. 10.ed. Tradução de Cynthia Maria Kiaw. São Paulo: Prentice Hall, 2004.

MEDRANO, M.; PÉREZ, P.F.; ABRAHAM, A.G. Kefiran antagonizes cytopathic effects of *Bacillus cereus* extracellular factors. **International Journal of Food Microbiology**, p. 122,1-7. 2008.

OTLES, S.; CAGINDI, O. Kefir: a probiotic dairy-composition, nutritional and therapeutic aspects. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 2, n. 2, 54-59, 2003.

PELCZAR Jr, J. M.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2.ed. 1996. v. 1, 524.

PINTADO, M.E.; SILVA, J.A.L. da; FERNANDES, P.B.F.; MALCATA, F.X.; HOGG, T.A. Microbiological and rheological studies on Portuguese kefir grains. **International Journal of Food science and Technology**, v. 31, p. 15-26, 1996.

REA, M.C.; LENNARTSSON, T.; DILON, P.; DRINAN, F.D.; REVILLE, W.J.; HEAPES, M.; COGAN, T.M. Irish kefir like grains: their structure,

microbial composition and fermentation kinetics. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 81, p. 83-94, 1996.

RIMADA, P.S.; ABRAHAM, A.G. Kefiran improves rheological properties of glucono- δ -lactone induced skim milk gels. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 33-39, 2006.

RODRIGUES, K.L.; CAPUTO, L.R.G.; CARVALHO, J.C.T.; EVANGELISTA, J.; SCHNEEDORF, J.M. Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 25, p. 404-408, 2004.

RODRIGUES, K.L.; CARVALHO, J.C.; SCHNEEDORF, J.M. Anti-inflammatory properties of kefir and its polysaccharide extract. **Inflammopharmacology**, v. 32, p. 1124-1127. 2005.

RUBIO, M.T.; LAPPE, P.; WACHER, C., ULLOA, M. Estudio microbiano y químico de la fermentación de soluciones de pílono inoculadas con tíficos. **Latina-American Microbiological**, v. 35, p. 19-31, 1993.

SÁNCHEZ, L.; CALVO, M.; BROCK, J.H. Biological role of lactoferrin. **Archimed Child**, v. 67, p. 657-661, 1992.

SANTOS, A.; SAN MAURO, M.; SANCHES, A.; TORRES, J.M.; MARQUINA, D. The antimicrobial Properties of Different Strains of *Lactobacillus* spp. Isolated from Kefir. **Systematic Applied Microbiological**, v. 26, p. 434-437, 2003.

TOBA, T.; ARIHARA, K.; ADACHI, S. Distribution of microorganisms with particular referent to encapsulated bacteria in kefir grains. **International Journal of food Microbiology**, Amsterdam, v. 10, p. 219-224, 1990.

TOMAS, J.M.; CIURANA, B.; JOFRE, J. T. New, Simple médium for selective, differential recovery of *Klebsiella* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 51, n. 6, p. 1361-1363. 1986.

VINDEROLA, C.G., DUARTE, J., TANGAVEL, D., PERDIGÓN, G., FARNWORTH, E., MATAR, C. Immunomodulating capacity of kefir. **Journal of Dairy Research**, v. 72, p. 195-202. 2004.

WITTHUHN, R.C., SCHOEMAN, T., BRITZ, T.J. Characterisation of the microbial population at different stages of kefir production and kefir grain mass cultivation. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 383-389. 2004a.

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, p. 33-37. 2004b.

WSZOLEK, M.; TAMINE, A.Y.; MUIR, D.D.; BARCLAY, M.N.I. Properties of Kefir made in scotland and poland using bovine, caprine and ovine milk with different starter cultures. **Technological**, v. 34, p. 251-261, 2001.

YÜKSEKDAG, Z.N., BEYATLI, Y., ASLIM, B. Determination of some characteristics coccoid forms of lactic acid bacteria isolated from Turkish kefirs with natural probiotic. **Technological**, v. 37, p. 663-667. 2004.

CAPÍTULO 2

Estudo químico e microbiano da bebida quefir de açúcar mascavo

RESUMO

MAGALHÃES, Karina Teixeira. **Estudo químico e microbiano da bebida quefir de açúcar mascavo.** In: _____. Caracterização microbiológica e química da bebida quefir de leite e açúcar mascavo. 2008. Cap.2, p.68-106. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

A bebida fermentada quefir de açúcar mascavo é produzida pela adição dos grãos de quefir em solução de açúcar mascavo, sendo popularmente consumida no Brasil. A bebida pronta é composta por uma diversidade microbiana que inclui bactérias ácido lácticas, leveduras e seus metabólitos. O objetivo da realização deste estudo foi identificar a população microbiana presente na bebida quefir de açúcar mascavo, além de caracterizar quimicamente o produto. Um inóculo de 250g de grãos de quefir foi adicionado em 2.250mL de solução de açúcar mascavo a 5%. A fermentação aeróbica, com temperatura de 25°C, ocorreu em um período de 24 horas. Durante o período de fermentação, foram retiradas amostras da bebida para análises químicas e diluições decimais seriadas, para a caracterização microbiológica. Um total de 414 isolados microbianos foi identificado. Os isolados se dividiram em bactérias Gram-positivas (63,5%), bactérias Gram-negativas (12,5%) e leveduras (24%). O gênero *Lactobacillus* foi o mais freqüente (52%) durante todo o período de fermentação. As espécies bacterianas identificadas foram dos gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Corynebacterium*, *Serratia* e *Klebsiela*. Os isolados de leveduras incluíram espécies dos gêneros *Candida*, *Torulaspora*, *Pichia*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Lachancea*, *Zygorulaspora*, *Dekkera*, *Metschnikowia* e *Issatchenkia*. A espécie bacteriana dominante foi *Lactobacillus paracasei* ssp *paracasei* 1 e *Candida kunwiensis* foi a espécie de levedura dominante durante as 24 horas de fermentação. Os grãos de quefir indicaram maior colonização de bactérias e leveduras na superfície externa dos grãos, em análises realizadas usando a Microscopia Eletrônica de Varredura. Os grupos de microrganismos identificados na bebida quefir de açúcar mascavo realizaram três tipos de fermentação durante o processo: láctica, alcoólica e acética. O pH diminuiu nas 24 horas de fermentação e o conteúdo de proteína aumentou. O estudo proporcionou um conhecimento da constituição química e microbiológica da bebida quefir de açúcar mascavo, consumida no Brasil.

*Comitê Orientador: Dra. Rosane Freitas Schwan – UFLA (Orientadora), Dra. Patrícia Gomes Cardoso – UFLA

ABSTRACT

MAGALHÃES, Karina Teixeira. **Chemical and microbial study of the brown sugar kefir beverage.** In: _____. Microbiological and chemical characterization of milk and brown sugar kefir beverage. 2008. Cap.2, p.68-106. Dissertation (Master Program in Agricultural Microbiology) – Federal University of Lavras, - Lavras – MG - Brazil.

The brown sugar kefir fermented beverage is produced by adding kefir grains to brown sugar solution. The beverage is commonly consumed in Brazil. The beverage consists of a microbial diversity that includes lactic acid bacteria, yeasts and their metabolites. The objective of this study was to identify the microbial population present in the brown sugar kefir beverage and characterize the product chemically. A 250g inoculate of kefir grains were added to 2250 mL 5% brown sugar solution. Aerobic fermentation, at 25°C occurred in a 24-hour period. During the fermentation period, samples of the beverage were removed for chemical analyses and serial decimal dilution, for microbiological characterization. A total of 414 microbial isolates were identified. The isolates were divided into positive Gram positive bacteria (63.5%), Gram negative bacteria (12.5%) and yeast (24%). The *Lactobacillus* genus was the most frequent (52%) throughout the fermentation period. The bacterial species identified were the *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Corynebacterium*, *Serratia* and *Klebsiela* genera. The yeast isolates included species from the *Candida*, *Torulaspora*, *Pichia*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Lachancea*, *Zygorulaspora*, *Dekkera*, *Metschnikowia* and *Issatchenkia* genera. The dominant bacterial species was *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* 1 and *Candida kunwiensis* was the dominant yeast species during the 24 hours of fermentation. The kefir grains indicated a greater bacteria and yeast colonization on the external surface of the grains, in analyses with electronic scanning microscopy. The microorganism groups identified in the brown sugar kefir beverage carried out three types of fermentation during the process: lactic, alcoholic and acetic. The pH decreased in the 24 hours of fermentation while the protein content increased. The study provided understanding of the chemical and microbiological constitution of the brown sugar kefir beverage consumed in Brazil.

*Guidance Comitee: Dra. Rosane Freitas Schwan – UFLA (Major Professor), Dra. Patrícia Gomes Cardoso – UFLA

1 INTRODUÇÃO

A bebida quefir de açúcar mascavo é elaborada pela adição dos grãos de quefir em solução de açúcar mascavo. Os grãos de quefir cultivados em açúcar mascavo são um tipo de macrocolônias consistentes em massa compacta e gelatinosa de coloração amarelada, translúcida, de forma irregular e tamanho variável de 3 a 35mm em diâmetro (Lappe et al., 1992). Os grãos são compostos principalmente por água e uma matriz insolúvel, onde se encontram embebidas diversas bactérias e leveduras que constituem uma associação simbiótica muito estável (Ulloa et al., 1994).

Os grãos de quefir cultivados em açúcar mascavo têm sido utilizados popularmente no México para produzir bebidas refrescantes de baixo teor alcoólico e acético, chamada de bebida de tibicos, quando o tempo de fermentação é curto, não excedendo a 2 dias (Rubio et al., 1993). A bebida fermentada pronta inclui ácido láctico, ácido acético, CO₂, álcool e compostos aromáticos (Otlés & Cagindi, 2003). Porém, quando o tempo de fermentação se prolonga, esta bebida refrescante se transforma em outra, alcoólica e acética, denominada vinagre de tibicos (Rubio et al., 1993). Algumas pessoas consomem a bebida de tibicos com o objetivo de reduzir o peso, combater a arteriosclerose e prevenir males cardíacos (Rubio et al., 1993). No entanto, não existem bases científicas para recomendá-la (Rubio et al., 1993).

O estudo microbiano da bebida quefir de açúcar mascavo foi iniciado por Lutz, em 1999, o qual indentificou a levedura *Saccharomyces radaisii* e a bactéria *Bacillus mexicanus* (Lappe et al., 1992). Em estudos atuais, Raimundo et al. (2005) analisaram a bebida quefir de açúcar mascavo, incubada em aerobiose e à temperatura ambiente. Em suas análises, concluíram que a bebida apresenta microbiota bastante complexa de bactérias e leveduras. Os autores revelaram, ainda, que as bactérias identificadas na bebida apresentam efeito de

antagonismo potente *in vitro* em espécies bacterianas como *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Proteus mirabilis*, *Bacillus cereus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Na Europa, os grãos de quefir cultivados em solução de açúcar mascavo são empregados na elaboração de bebidas fermentadas ácidas, ligeiramente alcoólicas, conhecidas como tibi ou sugary Kefir (Lappe et al., 1992). Em estudos da bebida quefir de açúcar mascavo, Pidoux (1989) identificou leveduras como *Zygosaccharomyces florentinus*, *Torulaspota pretoriensis*, *Candida valida*, *Cândida lambica* e *Kloeckera apiculada*. Também foram identificadas as bactérias lácticas *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus casei* ssp. *casei*, *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Streptococcus lactis* e *Streptococcus cremoris*.

Os microrganismos presentes nos grãos de quefir, os compostos químicos do substrado empregado e a tecnologia de produção são fatores que influenciam nas características microbiológicas, fisicoquímicas e sensoriais da bebida quefir durante o processo de fermentação (Irigoyen et al., 2005).

No Brasil, a bebida quefir de açúcar mascavo é produzida apenas de forma doméstica e não há relatos de sua constituição microbiológica e química. O presente estudo foi realizado com o objetivo de identificar a população microbiana presente nesta bebida e de realizar a sua caracterização química. Este estudo é de destacada importância por ser o primeiro relato científico da constituição microbiológica e química da bebida quefir de açúcar mascavo consumida no Brasil.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Preparo do inóculo e fermentação do quefir

Para o preparo do inóculo, os grãos de quefir foram provenientes de cultivo doméstico em açúcar mascavo, para produção da bebida quefir. Os grãos foram oriundos de domicílios da cidade de Lavras, MG, Brasil. O inóculo (grãos) foi adaptado numa solução aquosa de açúcar mascavo incubada em aerobiose e à temperatura ambiente, durante 7 dias. Posteriormente à adaptação dos grãos ao novo substrato, estes foram cultivados em solução de açúcar mascavo (5%), com troca de substrato em intervalos de 24 horas, até que o inóculo atingisse o volume necessário para o experimento. Os grãos (250g) utilizados foram lavados em água mineral estéril e, posteriormente, transferidos assepticamente para Erlenmeyers contendo 2250mL do substrato (solução de açúcar mascavo a 5%).

Os Erlenmeyers contendo os grãos de quefir foram incubados aerobicamente, à temperatura de 25°C, sem agitação, por um período de 24 horas. Amostras da bebida foram coletadas para as análises químicas e microbiológicas. Foram feitas seis coletas, assim denominadas: SSI - substrato sem inóculo; T0 – 0 hora após a adição do inóculo; T6 – 6 horas após a adição do inóculo; T12 – 12 horas após a adição do inóculo; T18 – 18 horas após a adição do inóculo e T24 – 24 horas após a adição do inóculo. De cada tempo, foram coletadas três amostras de um mesmo Erlenmeyer.

2.2 Análises químicas

A acidez titulável foi determinada por titulometria com solução de NaOH 0,01N, utilizando como indicador a fenolftaleína e o resultado expresso em g/100mL (Association of Official Analytical Chemist, AOAC, 1995). O teor de sólidos solúveis totais foi determinado por refratometria, conforme normas da

AOAC (1995), utilizando-se o refratômetro digital ATAGO PR-1000, com compensação de temperatura automática e resultados expressos em graus Brix (°Brix). O pH foi determinado no fermentado de quefir, utilizando-se potenciômetro Micronal modelo B474, segundo técnica estabelecida pela AOAC (1995). A determinação de proteína bruta foi calculada em função da concentração de nitrogênio total pelo método Kjeldahl e os conteúdos de vitamina C (ácido ascórbico), de cinza e de ferro foram determinados segundo normas da AOAC (1995). Umidade e matéria seca da bebida fermentada e dos grãos de quefir (inóculo) também foram determinadas segundo normas da AOAC (1995). Etanol, ácidos orgânicos (ácido lático e ácido acético) e carboidratos (sacarose, glicose e frutose) foram analisados durante o período de fermentação do quefir. As amostras do fermentado foram centrifugadas e o sobrenadante filtrado em membrana de 0,45µm.

Para análise dos carboidratos (sacarose, glicose e frutose), foram injetados 20µL no cromatógrafo a líquido Shimadzu, com detetor por índice de refração. Coluna: Microsorb 100-5 amino 250 x 4,6 mm (Varian). Fase móvel: cetonitrila/água (80:20). Fluxo: 1,4 mL/min. Para as análises dos ácidos orgânicos e etanol (padronização interna), foram utilizadas as mesmas amostras, tendo apenas sido adicionados 100µL de uma solução aquosa do padrão interno (butanol 1.38 mg/mL) a 400 µL das amostras. Foram injetados 2 µL no cromatógrafo a gás Varian GP-3380. Coluna: HP-FFAP 25 m x 0,25 mm (Agilent). Programação de temperatura na coluna 70°C, 0 min, 10°C/min, 140°C, 0 min, 15°C/min, 240°C. Injetor: 260°C. Split: 1/100. Detector de ionização de chamas: 260°C.

2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

Os grãos de quefir foram observados em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). As amostras foram coletadas para a visualização das

superfícies externas e internas dos grãos. Foram feitas as utilizações de dois grãos de quefir cultivados por 24 horas, a 25°C, em solução de açúcar mascavo, a 5%.

Posteriormente às coletas das amostras, os grãos foram imersos em solução fixativa (Karnovisks modificada), pH 7,2, por 24 horas. A seguir, uma das amostras foi transferida para glicerol 30%, por 30 minutos e imersa em nitrogênio líquido para posterior fratura em superfície metálica resfriada pelo mesmo. Ambas as amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1%, desidratadas em gradiente de acetona (25%, 50%, 75%, 90% e 100%), por três vezes e secas em máquina de ponto crítico (Bal-tec CPD 030). Foram montados os *stubs* e cobertos com ouro no metalizador (Bal-tec SDC 050). Ao final deste procedimento, os *stubs* foram examinados em microscópio eletrônico de varredura (Leo EVO 040), localizado no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultra-Estrutural (LME), no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

2.4 Caracterização microbiológica

Para a determinação da contagem total de bactérias e leveduras foi utilizada uma alíquota de 100 µL de cada diluição em triplicata que, em seguida, foi espalhada com Alça de Drigalsky, utilizando-se a técnica de plaqueamento por superfície. A enumeração de microrganismo foi realizada utilizando-se sete meios de cultura: **ágar nutriente (AN)** (g/litro extrato de carne (Merck - Brasil) 3,0g; peptona (Himedia) 5,0g; ágar (Merck - Brasil) 12g e água destilada), acrescido de 400 mg/1.000mL de nistatina (Sigma, St. Louis, USA) para contagem de bactérias mesófilas; **MRS (OXOID Brasil Ltda)** (em g. L⁻¹: peptona 10,0; extrato de carne 8,0; extrato de levedura 4,0; glicose 20,0; monooleato de sorbitano (Tween 80) 1,0; K₂HPO₄ 2,0; acetato de sódio 3,0; citrato de amônia 2,0; sulfato de magnésio 0,01; sulfato de manganês 0,036)

acrescido de 400 mg/1.000mL de nistatina (Sigma, St. Louis, USA) para contagem de *Lactobacillus*; **M17 (OXOID Brasil Ltda.)** (g/litro peptona balanceada 5g; peptona de soja, 5g; extrato de levedura, 2,5g; extrato de carne, 5g; lactose, 5g; glicerolfosfato de sódio, 19g; sulfato de magnésio, 0,25g; ácido ascórbico, 0,5g; ágar, 15g); acrescido de 400 mg/1.000mL de nistatina (Sigma, St. Louis, USA) e pH 7,1 para contagem de *Lactococcus*; **Meio 254 (DSMZ)** (g/litro extrato de malte, 15g; extrato de levedura, 5g; ágar, 15g; 60mL de etanol) acrescido de 400 mg/1.000mL de nistatina (Sigma, St. Louis, USA) para contagem de *Acetobacter*; meio **Edwards (modified) (EM) (OXOID)** acrescido de 400 mg/1.000mL de nistatina (Sigma, St. Louis, USA) para a contagem de *Streptococcus*; meio **LUSM** (Benkerroum et al., 1993) acrescido de 400 mg/1.000mL de nistatina (Sigma, St. Louis, USA) para contagem de *Leuconostoc* e **(YEPG)** (1% extrato de levedura (Merck); 1% peptona (Himedia); 1,3% ágar (Merck - Brasil); 2% de glicose (Merck - Brasil)), acrescido de 100 mg/1.000mL cloranfenicol (Sigma, St. Louis, USA).

Foram feitas diluições seriadas de base 10 para o plaqueamento nos referidos meios de cultivo com as seguintes diluições: 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 e 10^9 , para os meios MRS, ágar nutriente, M17, meio 254, Edwards (modified) e LUSM. Para o meio YEPG, as diluições utilizadas foram 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 e 10^7 . As diluições e os plaqueamentos foram feitos em câmara de fluxo laminar e as placas incubadas em BOD, a 28°C, durante 48 horas, para crescimento bacteriano e 5 dias para crescimento de leveduras.

Após o período de incubação, as colônias crescidas nas placas foram classificadas de acordo com as características e as estruturas morfológicas, buscando caracterizar os diferentes morfotipos crescidos nos meios de cultivo. Foi realizada contagem total dos morfotipos encontrados, identificando-se o tipo de meio cultivado, a amostra, a diluição e a triplicata. A partir da contagem total, foi escolhida, para morfologia de colônia, uma placa de cada meio e diluição

cuja contagem se encontrasse entre 30 e 300 colônias. O número de isolados que foram selecionados para identificação foi determinado pelo cálculo da raiz quadrada do número total de isolados, contados conforme mencionado no *Bacteriological Manual for Foods* (Food Drugs Administration, FDA, 1972). Os isolados foram purificados por meio de sucessivas repicagens e as leveduras separadas de bactérias por meio de exame microscópico. Para a certificação da pureza das bactérias, foram realizados testes pela técnica de coloração diferencial de Gram, descrita em Madigan et al. (2004) e Pelczar et al. (1996). A identificação dos isolados de leveduras foi realizada por testes convencionais, descritos por Kurtzman et al. (2003) e Barnett et al. (2000). As leveduras identificadas foram verificadas para as chaves descritas por Barnett et al. (2000) e segundo o software disponível em <http://www.cbs.knaw.nl/>. As bactérias Gram-positivas foram submetidas à realização de testes específicos: catalase, motilidade, oxidase e produção de ácido e gás a partir da glicose. As interpretações dos resultados e das provas bioquímicas para a identificação dos isolados seguiram instruções do “*Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology*” (Holt et al., 1994) e “*The Prokaryotes*” (Hammes et al., 1991). A identificação foi realizada por meio do sistema API 50CHL (Bio Mérieux). As bactérias Gram-positivas não formadoras de esporos, por indução a esta formação (aquecimento a 80°C por 10 minutos), foram identificadas por testes bioquímicos recomendados por “*Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology*” (Holt et al., 1994) e confirmados por meio do sistema API Coryne (Bio Mérieux). Para a identificação das bactérias Gram-negativas utilizaram-se kits Bac-Tray I e II (Difco, USA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Composição química da bebida fermentada quefir

As amostras analisadas indicaram um aumento da acidez titulável depois de 24 horas de fermentação da bebida quefir de açúcar mascavo. O valor inicial foi de 0,01 g/100mL, alcançando o valor final de 0,07 g/100mL (Tabela 1). A presença de bactérias lácticas na bebida pode ter proporcionado este aumento.

O valor do pH decresceu durante o período de 24 horas de fermentação da bebida quefir, com valor inicial de 5,6 e final de 4,0 (Tabela 1). O pH é um importante fator que pode fortemente afetar a qualidade do produto durante o processo de fermentação. Tem sido informado que o pH afeta os níveis de dióxido de carbono produzidos durante a fermentação da bebida quefir. Adicionalmente, o tempo de fermentação e os níveis de compostos aromáticos formados são significativamente influenciados pelo valor do pH da bebida, refletindo possíveis variações nas características sensoriais do produto final (Athanasiadis et al., 2004).

O valor do Brix durante a fermentação decresceu (Tabela 1). O substrato iniciou com 5,2°Brix e finalizou com 4,1°Brix, ao fim de 24 horas de fermentação. Brix é uma medida total de sólidos solúveis. Os sólidos solúveis se constituem, basicamente, de açúcares (sacarose, frutose e glicose) e, por isso, o Brix é considerado, basicamente, como a porcentagem de açúcar presente em uma bebida. O fato de o valor de estes sólidos solúveis ter decrescido pode ser atribuído à presença de grupos de microrganismos que consumiram tais compostos.

O conteúdo de proteína (Tabela 1) aumentou durante o período de 24 horas de fermentação. Este fato se explica, principalmente, pelo aumento da biomassa microbiana ocorrida durante o processo de fermentação da bebida. A ação metabólica de alguns microrganismos anaeróbios facultativos, registrados

na literatura como fixadores de nitrogênio, como algumas espécies do gênero *Klebsiella*, também pode contribuir para o aumento de proteína no substrato (Rubio et al., 1993). Segundo Otles & Cagindi (2003), a bebida quefir possui valores nutricionais, pois apresenta alguns minerais e vitaminas, benéficos para o corpo humano, como vitamina B, cálcio, ferro e vitamina K. Porém, no presente estudo, a bebida fermentada quefir de açúcar mascavo não apresentou diferença no teor de ferro em relação ao substrato. Não foi detectada vitamina C na bebida quefir.

O teor de umidade e de matéria seca da bebida quefir de açúcar mascavo não apresentou diferenças durante o período de 24 horas de fermentação (Tabela 1). Resultados semelhantes foram encontrados em estudos feitos por Irigoyen et al. (2005), em análise de bebida fermentada quefir de leite. Para a comparação dos resultados, análises de umidade e de matéria seca foram realizadas nos grãos de quefir, nos períodos inicial e final da fermentação (Tabela 2). Observou-se um aumento no conteúdo de umidade dos grãos de quefir, em 24 horas de fermentação.

Os grãos de quefir são uma matriz cuja constituição é formada, em parte, por dextranas, que são polímeros de glicose capazes de reter água durante o processo de fermentação (Rubio et al., 1993). Este fato explica o aumento do conteúdo de umidade dos grãos durante o processo de fermentação da bebida.

O teor de matéria seca dos grãos de quefir também apresentou um aumento em 24 horas de fermentação da bebida. Este comportamento se deve ao fato de que, durante o processo de fermentação, estavam disponíveis nutrientes necessários para que os microrganismos realizassem suas funções metabólicas. Portanto, houve aumento populacional nos grãos de quefir e, por consequência, aumento da biomassa. Este fato explica a maior concentração de matéria seca encontrada nos grãos de quefir.

Em estudos realizados por Rubio et al. (1993) também foi encontrada maior concentração de umidade e matéria seca em grãos de quefir cultivados em açúcar mascavo, após o período de fermentação.

O conteúdo de cinza analisado no substrato inicial e, posteriormente, na bebida fermentada, não apresentou diferenças em seus teores (Tabela 1). Resultados semelhantes foram encontrados por Wszolek et al. (2001), em bebida fermentada quefir, porém, utilizando leite como substrato. Os autores avaliaram o teor de cinzas nos produtos fermentados pelos grãos de quefir, no período de 24 horas, em três distintas espécies de leite (bovino, caprino e ovino).

A concentração dos carboidratos redutores (glicose e frutose) aumentou e o carboidrato sacarose diminuiu, durante o período de 24 horas de fermentação (Figura 1B). Este fato indica que a sacarose foi hidrolizada durante este tempo. Portanto, o conteúdo de sacarose decresceu durante as 24 horas, apresentando pequenas variações. O valor inicial foi de 39,9 mg/mL e, após 24 horas de fermentação, o valor foi de 36,5 mg/mL (Figura 1B). Resultados semelhantes foram encontrados por Rubio et al. (1993), em quefir cultivado em solução de açúcar mascavo (5%).

A concentração de ácido láctico na bebida fermentada quefir diminuiu gradativamente, durante o período de 24 horas (Figura 1A). Este decréscimo pode ser explicado pelo fato de que parte deste produto formado pode ter sido metabolizada por microrganismos presente na bebida. Microrganismos heteroláticos, como *Lactobacillus buchneri* (não identificados neste estudo), podem consumir ácido láctico. O ácido láctico é considerado substrato para o *Lactobacillus buchneri* produzir ácido acético (Oude Elferink et al., 2001).

A concentração de ácido acético aumentou, apresentando ligeiras variações durante o período de fermentação (Figura 1A). O ácido acético quantificado na fermentação pode ser elaborado por representantes de bactérias heteroláticas, assim como por algumas leveduras e ou bactérias ácido acéticas

(não identificadas no trabalho). Resultados semelhantes foram encontrados por Rubio et al. (1993), em estudos realizados também com a bebida quefir de açúcar mascavo. Os autores afirmam, em seus estudos, que a produção de ácido acético na bebida foi elaborado por bactérias heteroláticas, assim como pela levedura *Brettanomyces clausenii*, identificadas em seus estudos. Os autores afirmam ainda que a acumulação deste metabólito no substrato o torna ácido e exerce efeito inibitório a microrganismos patógenos.

A concentração de etanol, durante as 12 horas iniciais de fermentação, apresentou um aumento de 1,16 mg/mL para 1,49 mg/mL (Fig. 1A). O etanol foi produzido, principalmente, por alguns representantes leveduriformes, como informado por Guzel-Seydim et al. (2000). As leveduras mais comuns isoladas da bebida quefir e responsáveis pela produção de etanol são as do gênero *Saccharomyces*, *Candida*, *Kluyveromyces* e *Torulaspota* (Guzel-Seydim et al., 2000). Porém, alguns representantes bacterianos dos gêneros *Lactococcus* e *Lactobacillus* também podem ter produzido parte da concentração de etanol na bebida analisada. Algumas espécies de *Lactococcus* e *Lactobacillus* possuem a habilidade de produzir etanol em bebida fermentada (Beshkova et al., 2003). Eles possuem atividade da enzima álcool-desidrogenase, que converte acetaldeído em etanol (Beshkova et al., 2003). Após 12 horas de fermentação, a concentração de etanol decresceu de 1,49 mg/mL para 1,25 mg/mL (Figura 1A). Este decréscimo pode ser devido ao consumo deste metabólito por parte de alguns microrganismos. Uma parte do conteúdo de etanol pode ter sido convertida em ácido acético por bactérias heterofermentativas ou bactérias do gênero *Acetobacter*, que não foram identificadas neste trabalho. Rubio et al. (1993) notaram decréscimo do conteúdo de etanol, posteriormente, a 96 horas de fermentação da bebida quefir de açúcar mascavo. Guzel-Seydim et al. (2000) observaram ligeiro aumento na concentração de etanol durante as 24 horas de fermentação da bebida quefir fermentada em leite.

TABELA 1 Valores de acidez total titulável, pH, °Brix, proteína, vitamina C, Fe, umidade, matéria seca e cinza contidos na bebida fermentada quefir de açúcar mascavo

TF (h)	ATT (g/100mL)	pH	°Brix	Proteína (%)	Vitamina C (%)	Fe (%)	Umidade (%)	Matéria seca (%)	Cinza (%)
T0	0,01±0,01	5,6±0,1	5,2±0,2	0,1±0,1	*ND	2,4±0,2	95,3±0,1	4,7±0,1	0,1±0,1
T24	0,07±0,01	4,1±0,1	4,1±0,1	0,4±0,1	*ND	2,5±0,2	95,3±0,1	4,7±0,1	0,1±0,2

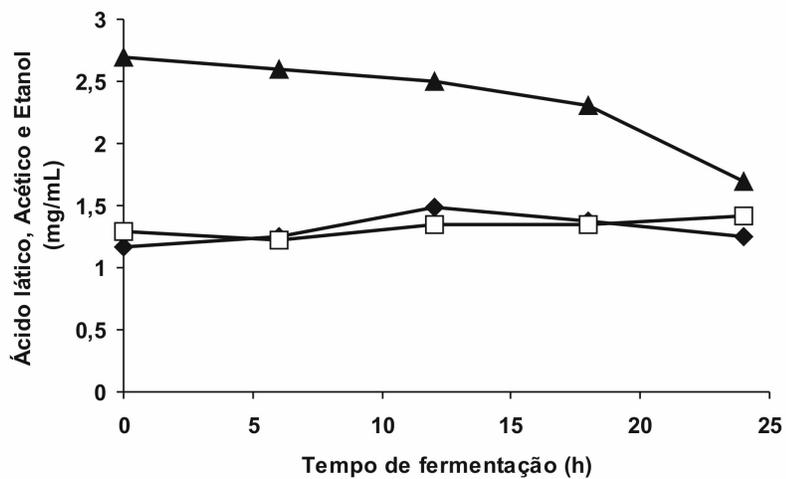
TF = Tempo de fermentação, ATT = Acidez total titulável, Fe = Ferro, *ND = Não detectado.
Os dados são médias de três replicatas ± desvio padrão.

TABELA 2 Concentração de matéria seca e umidade dos grãos de quefir cultivados em solução de açúcar mascavo (5%)

Tempo de Fermentação (horas)	Umidade (%)	Matéria seca (%)
T0	80,5±0,1	13,1±0,2
T24	91,5±0,5	22,1±0,3

Os dados são médias de três replicatas ± desvio padrão.

(A)



(B)

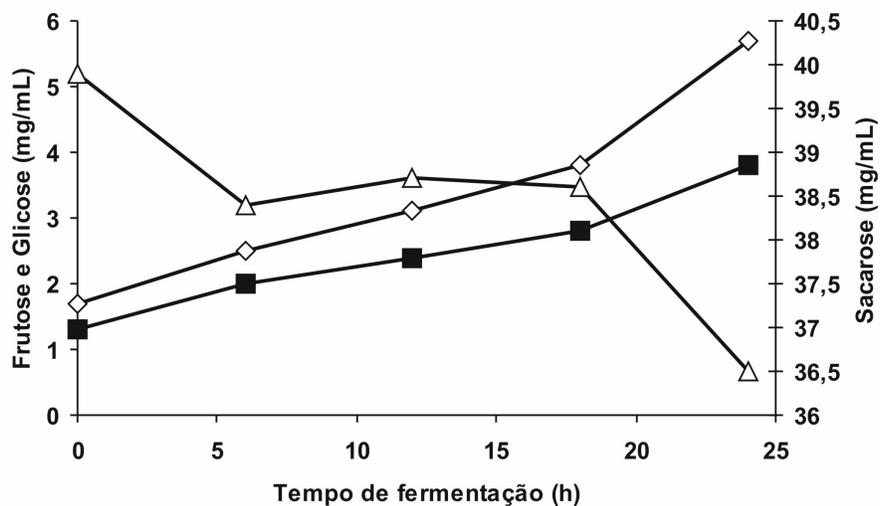


FIGURA 1 (A) - Ácido láctico (▲), ácido acético (□), etanol (◆). (B) - frutose (◇), glicose (■) e sacarose (△) contidos na bebida quefir de açúcar mascavo.

3.2 Observação, enumeração e diversidade microbiana encontrada na bebida fermentada quefir de açúcar mascavo

Os resultados deste estudo indicaram que o processo de fermentação foi iniciado a partir da inoculação dos grãos de quefir no substrato. O estudo indicou, ainda, a presença de uma abundante microbiota. A população microbiana (\log_{10} ufc/mL) da bebida quefir de açúcar mascavo foi obtida durante o processo de 24 horas de fermentação. A população bacteriana nos meios ágar nutriente, 254 e Edwards modified foi semelhante quanto ao aspecto morfológico, apresentando somente 1 morfotipo. Nos meios M17 e LUSM, foram detectados dois morfotipos bacterianos e, no meio MRS, três morfotipos aparentemente distintos de bactérias foram observados e isolados para posterior caracterização. No meio YEPG, foram observados três morfotipos diferentes de leveduras, confirmando a observação feita por outros autores que relatam a existência de bactérias e leveduras na bebida quefir de açúcar mascavo (Rubio et al., 1993; Lappe et al., 1992; Pidoux, 1989; Raimundo et al., 2005).

Todos os gêneros microbianos mostraram um aumento no número populacional durante o período de 24 horas de fermentação, apresentando ligeiras variações (Tabela 3). Os valores variaram entre um mínimo de $5,63 \log_{10}$ ufc/mL e um máximo de $6,82 \log_{10}$ ufc/mL, no tempo 0 de fermentação. Após 24 horas de fermentação, a população variou entre $7,31 \log_{10}$ ufc/mL a $8,61 \log_{10}$ ufc/mL. O substrato sem conter o inóculo não apresentou crescimento microbiano. Em estudos realizados por Rubio et al. (1993), a população microbiana da bebida quefir de açúcar mascavo também não mostrou aumento populacional durante todo o período de cultivo. Estes autores analisaram a variação da comunidade microbiana da bebida quefir de açúcar mascavo, em um período de 264 horas de fermentação.

Representantes do gênero *Lactobacillus* estiveram presentes em todos os tempos de fermentação analisados (Tabela 4), podendo ser classificados como

um grupo de importância para a produção do quefir. Os representantes dos gêneros bacterianos (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*) e os representantes dos gêneros de leveduras, *Kluyveromyces*, *Debaryomyces*, *Candida* (Lee et al., 2007), *Torulaspota* (Angulo et al., 1993) e *Pichia* (Lin & Kuo, 1999), identificados neste estudo, foram previamente descritos na bebida quefir. Porém, para os representantes dos gêneros microbianos, *Corynebacterium*, *Klebsiela*, *Serratia*, *Metschnikowia*, *Lachancea*, *Dekkera* e *Issatchenkia*, não foram encontrados relatos na literatura, sobre serem representantes da microbiota do quefir. Não foi identificada a presença de bactérias ácido acéticas (BAA) neste estudo, as quais são consideradas como contaminantes de bebidas fermentadas, por alguns pesquisadores (Ângulo et al., 1993).

Um total de 414 isolados microbianos foi identificado na bebida quefir de açúcar mascavo (Tabela 4). Os isolados se dividiram em bactérias Gram-positivas (63,5%), bactérias Gram-negativas (12,5%) e leveduras (24%). O gênero *Lactobacillus* foi o mais freqüente (52%) durante todo o período de fermentação e incluiu espécies como *Lactobacillus paracasei* ssp *paracasei* 1 (134 isolados), *Lactobacillus paracasei* ssp *paracasei* 3 (15 isolados), *Lactobacillus curvatus* (19 isolados), *Lactobacillus fermentum* 1 (12 isolados), *Lactobacillus plantarum* (9 isolados), *Lactobacillus acidophilus* (7 isolados), *Lactobacillus lindneri* (3 isolados), *Lactobacillus brevis* 3 (2 isolados) e *Lactobacillus paracasei* (2 isolados).

Segundo Kooiman (1968), a presença de *Lactobacillus brevis* na bebida fermentada do quefir é de grande importância para a produção do polissacarídeo quefiram. Além dos *Lactobacillus*, outras bactérias lácticas foram isoladas. Dentre elas, *Leuconostoc citreum* (11 isolados), *Lactococcus lactis* ssp *lactis* 1 (4 isolados) e *Leuconostoc lactis* (3 isolados). As bactérias lácticas identificadas neste estudo foram previamente isoladas e identificadas em bebida fermentada

quefir, porém, cultivada em leite (Assadi et al., 2000; Santos et al., 2003; Yüksekdağ et al., 2004; Witthuhn et al., 2004b; Witthuhn et al., 2004a).

Serratia plymuthica (8 isolados) foi detectada durante as primeiras 12 horas de fermentação. Esta espécie Gram-negativa é comumente encontrada no ambiente e foi detectada em bebida fermentada indígena (cauim) (Almeida et al., 2007). *Klebsiella ozaenae* (30 isolados) também foi achada na bebida fermentada Kefir e foi encontrada durante todo o processo de fermentação. Esta espécie é também encontrada no ambiente e foi achada em amostras de água, em estudos realizados por Tomas et al. (1986).

Serratia plymuthica e *Klebsiella ozaenae* não foram descritas anteriormente como presentes na microbiota do quefir e não foram encontrados relatos sobre os papéis clínicos e ecológicos que estas espécies representam. Vinte e cinco isolados gram-positivos não formadores de esporos foram encontrados nas amostras durante a fermentação do quefir e foram classificados para o gênero *Corynebacterium*. *Corynebacterium vitarumen* (17 isolados) e *Corynebacterium flavescens* (8 isolados) foram as espécies identificadas. A distribuição destas espécies foi homogênea durante a fermentação (Tabela 4) e estas não foram descritas anteriormente como presentes na microbiota do quefir. Portanto, a presença destes microrganismos na bebida quefir pode ser devido à manipulação dos grãos de quefir, para seu cultivo. Linhagens de *Corynebacterium* foram isoladas em fermentação de mandioca no Brasil (Carvalho et al., 1999).

A espécie *Corynebacterium vitarumen* foi encontrada na bebida indígena fermentada, cauim, também no Brasil, em estudos realizados por Almeida et al. (2007). *Corynebacterium flavescens* foi encontrada em superfície de queijos, em estudos realizados por Brennan et al. (2002). Algumas espécies do gênero *Corynebacterium* são tidas como patogênicas ao homem, porém, algumas espécies são produtoras de aminoácidos (ácido glutâmico, lisina,

triptofano, treonina e isoleucina) através de vias fermentativas (Silva et al., 2005). Portanto, mesmo que as *Corynebacterium* não sejam um grupo comum encontrado na bebida quefir, a presença destes microrganismos na bebida pode proporcionar a produção de alguns metabólitos, podendo, assim, influenciar nas características químicas, organolépticas e, mesmo protéicas, da bebida quefir.

Os isolados de leveduras foram identificados como *Candida kunwiensis* (52 isolados), *Torulaspora delbrueckii* (13 isolados), *Pichia sydowiorum* (10 isolados), *Debaryomyces occidentalis* var. *occidentalis* (6 isolados), *Kluyveromyces marxianus* (4 isolados), *Kluyveromyces lactis* var. *lactis* (4 isolados), *Lachancea fermentati* (3 isolados), *Debaryomyces hansenii* var. *fabryii* (2 isolados), *Dekkera anomala* (2 isolados), *Metschnikowia koreensis* (2 isolados) e *Issatchenkia hamoiensis* (1 isolado) (Tabela 4).

As espécies *Debaryomyces occidentalis* var. *occidentalis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces lactis* var. *lactis* e *Debaryomyces hansenii* var. *fabryii*, encontradas na bebida quefir de açúcar mascavo, foram também relatadas, por alguns autores, em análises da bebida quefir, porém, cultivada em leite (Lappe et al., 1992; Angulo et al., 1993; Lin & Kuo, 1999; Lee et al., 2007). As espécies *Lachancea fermentati*, *Candida kunwiensi*, *Dekkera anomala*, *Metschnikowia koreensis* e *Issatchenkia hamoiensis* não foram identificadas anteriormente na bebida fermentada quefir. A espécie dominante, *Candida kunwiensi*, é encontrada no ambiente e foi isolada de amostras de flores em estudos realizados por Hong et al. (2003). *Dekkera anomala* foi isolada da fermentação natural de azeitonas pretas francesas, em estudos realizados por Coton et al. (2006) e de amostra de vinho espanhol (Dias et al., 2003). *Issatchenkia hamoiensis* foi isolada, durante o período de fermentação, de um tipo de vinho italiano (Di Maro et al., 2007). *Metschnikowia koreensis* foi identificada em molho de soja japonês (Sasahara &

Izumori, 2005) e representantes do gênero *Lachancea* foram encontrados em fermentação natural de azeitonas pretas francesas (Coton et al., 2006).

TABELA 3 Enumeração (\log_{10} ufc/mL) microbiana durante o período de fermentação da bebida quefir de açúcar mascavo

Grupo preditivo de microrganismos	Tempo de fermentação (h)					
	SSI	T0	T6	T12	T18	T24
<i>Streptococcus</i>	*ND	6,41±0,01	6,71±0,01	7,44±0,02	7,33±0,07	8,61±0,11
Bactérias mesófilas	*ND	5,81±0,07	5,62±0,09	6,53±0,04	7,12±0,01	8,21±0,12
<i>Leuconostoc</i>	*ND	6,03±0,04	6,61±0,21	7,62±0,01	7,43±0,01	8,41±0,06
<i>Acetobacter</i>	*ND	6,11±0,05	6,92±0,01	7,62±0,01	7,63±0,01	8,31±0,06
<i>Lactobacillus</i>	*ND	6,82±0,01	6,94±0,01	7,82±0,01	7,62±0,01	8,32±0,04
<i>Lactococcus</i>	*ND	6,62±0,01	6,54±0,01	7,41±0,02	7,52±0,01	8,41±0,08
Leveduras	*ND	5,63±0,01	6,14±0,03	6,31±0,01	6,91±0,05	7,31±0,07

SSI = Substrato sem inoculo, *ND = Não detectado

Os dados são médias de três replicatas \pm desvio padrão

TABELA 4 Identificação dos isolados presentes na bebida fermentada quefir de açúcar mascavo

TF (h)	Isolados identificados	NI	
T0	Bactéria Gram-positiva	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp <i>paracasei</i> 1	25
		<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp <i>paracasei</i> 3	19
		<i>Lactobacillus lindneri</i>	3
		<i>Corynebacterium vitarumen</i>	3
		<i>Corynebacterium flavescens</i>	2
	Bactéria Gram-negativa	<i>Klebsiella ozaenae</i>	9
	Levedura	<i>Candida kunwiensis</i>	14
		<i>Torulaspora delbrueckii</i>	5
		<i>Metschnikowia koreensis</i>	2
	T6	Bactéria Gram-positiva	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp <i>paracasei</i> 1
<i>Lactobacillus paracasei</i>			2
<i>Lactobacillus brevis</i> 3			2
<i>Corynebacterium vitarumen</i>			4
Bactéria Gram-negativa		<i>Klebsiella ozaenae</i>	3
Levedura		<i>Kluyveromyces marxianus</i>	4
		<i>Torulaspora delbrueckii</i>	8
		<i>Debaryomyces occidentalis</i> var. <i>occidentalis</i>	4
		<i>Candida kunwiensis</i>	19
		<i>Pichia sydowiorum</i>	5

TF – Tempo de fermentação, NI = Número de isolados.

... Continua ...

TABELA 4 cont.

T12	Bactéria Gram-positiva	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp <i>paracasei</i> 1	16
		<i>Lactobacillus plantarum</i>	9
		<i>Lactobacillus curvatus</i>	8
		<i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>lactis</i> 1	4
		<i>Leuconostoc citreum</i>	4
		<i>Corynebacterium vitarumen</i>	7
		<i>Corynebacterium flavescens</i>	4
	Bactéria Gram-negativa	<i>Klebsiella ozaenae</i>	9
		<i>Serratia plymuthica</i>	8
	Levedura	<i>Debaryomyces occidentalis</i> var. <i>occidentalis</i>	2
<i>Candida kunwiensis</i>		10	
<i>Dekkera anomala</i>		2	
T18	Bactéria Gram-positiva	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp <i>paracasei</i> 1	27
		<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp <i>paracasei</i> 3	8
		<i>Lactobacillus fermentum</i> 1	12
		<i>Lactobacillus acidophilus</i>	7
		<i>Lactobacillus curvatus</i>	5
		<i>Leuconostoc lactis</i>	3
		<i>Corynebacterium vitarumen</i>	5
<i>Corynebacterium flavescens</i>	2		

... Continua ...

TABELA 4 cont.

T18	Bactéria gram-negativa	<i>Klebsiella ozaenae</i>	9
	Levedura	<i>Pichia sydowiorum</i>	5
		<i>Lachancea fermentati</i>	3
		<i>Issatchenkia hanoiensis</i>	1
		<i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>fabryii</i>	2
T24	Bactéria Gram-positiva	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp <i>paracasei</i> 1	32
		<i>Lactobacillus curvatus</i>	6
		<i>Leuconostoc citreum</i>	7
		<i>Corynebacterium vitarumen</i>	3
	Bactéria Gram-negativa	<i>Klebsiella ozaenae</i>	14
Levedura	<i>Candida kunwiensis</i>	9	
	<i>Kluyveromyces lactis</i> var. <i>lactis</i>	4	

Com o auxílio da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), a eletromicrografia dos grãos de quefir cultivados em solução de açúcar mascavo foi realizada observando-se toda a região externa e interna dos grãos. Trinta e duas eletromicrografias foram analisadas e nas Figuras 2, 3 e 4 são mostradas as superfícies externa e interna dos grãos de quefir analisados. A superfície externa dos grãos de quefir foi revelada coberta por um aglomerado de microrganismos (Figura 2B), mesmo que, quando observados a olho nu, os grãos de quefir mostrem uma superfície lisa (Figura 2A). Bastonetes, leveduras e o polissacarídeo foram observados, a 2000x, na parte exterior do grão (Figura 2B). O polissacarídeo pode ser devido à presença de quefiran, como informado em estudos feitos por Guzel-Seydim et al. (2005) com grãos de quefir cultivados em leite. Não foi observada a presença de polissacarídeo no interior dos grãos (Figura 4).

Guzel-Seydim et al. (2005) observaram, em seus estudos com grãos cultivados em leite, um aumento progressivo de polissacarídeo para o interior do grão. A ausência de polissacarídeo no interior dos grãos de quefir analisados neste estudo pode ser devido à ausência de células bastonetes, também nesta porção. Segundo Kooiman (1968) e Tada et al. (2007), algumas espécies de bastonetes, como, por exemplo, o *Lactobacillus brevis*, são os principais produtores do polissacarídeo nos grãos de quefir.

O quefir cultivado em açúcar mascavo, observado neste estudo, apresentou menor população de bastonetes que os grãos cultivados em leite, analisados em estudos feitos por Guzel-Seydim et al. (2005). Neste estudo, bastonetes foram observados na parte externa do grão (seta da Figura 3A) e também se observou a presença células de leveduras no exterior do grão de quefir (seta da Figura 3D). Na parte interna do grão, a observação de levedura foi menor, comparada à parte externa (Figura 4). As setas da Figura 4 (A, B, C e

D) indicam a presença de células de leveduras na porção interna dos grãos de quefir.

O presente estudo mostrou que a microbiota do quefir é mais evidente na superfície externa dos grãos. Toba et al. (1990) também observaram que os microrganismos predominam na parte externa dos grãos de quefir cultivados em leite. Não foram observados cocos em qualquer porção dos grãos de quefir cultivados em açúcar mascavo. Guzel-Seydim et al. (2005) também não detectaram cocos nos grãos do quefir, porém, cultivados em leite. Neve & Heller (2002) informaram que cocos estavam presentes em suas amostras de grãos de quefir fermentado em solução de açúcar mascavo. Mesmo não havendo visualização de cocos nos grãos analisados, bactérias dos gêneros *Lactococcus* e *Leuconostoc* foram identificadas na bebida quefir fermentada por estes grãos. As células em formas de cocos, aderidas nos grãos de quefir, podem ter sido liberadas para o substrato durante o período de fermentação e, portanto, não foi possível visualizar sua presença nos grãos.

Em comparação com os microrganismos identificados na bebida analisada neste estudo, pôde-se notar que o número de bactérias foi superior ao número de leveduras presentes na bebida quefir analisada. E, na visualização dos grãos de quefir, usados como inóculo para fermentar a bebida quefir, pôde-se observar, em MEV, que o número de bactérias distribuídas nos grãos foi inferior ao número de leveduras distribuídas nos mesmos grãos. Este fato pode ser atribuído à maior liberação de células bacterianas, dos grãos de quefir para o substrato, durante o período de fermentação. O aspecto visual dos grãos de quefir cultivados em açúcar mascavo, quanto à distribuição de microrganismos, foi distinto do dos grãos cultivados em leite. Grãos de quefir cultivados em leite apresentam maior distribuição de células bacterianas nas porções externas e internas dos grãos, em relação à distribuição de células de leveduras (Guzel-Seydim et al., 2005). No entanto, neste estudo, as células de leveduras

dominaram a porção externa dos grãos e não foi possível a visualização de células bacterianas na porção interna destes mesmos grãos.

A falta de informações disponíveis sobre os processos fermentativos, a microbiota envolvida e os componentes nutricionais da bebida quefir de açúcar mascavo consumida no Brasil foi uma relevante justificativa para a realização deste estudo. Portanto, o estudo realizado foi importante para um melhor conhecimento químico e microbiológico da bebida quefir de açúcar mascavo. Por outro lado, é necessário estudar a interação existente entre leveduras e bactérias lácticas, o que permitirá conhecer as características desta associação microbiana. Considera-se, ainda, de grande importância determinar quais são os microrganismos essenciais que constituem o quefir e avaliar o possível uso destes organismos em diversos processos biotecnológicos para a obtenção de alimentos fermentados e subprodutos da fermentação, como etanol, ácido láctico e ácido acético. Também é necessária a realização de estudos referentes aos benefícios nutricionais e terapêuticos da bebida quefir de açúcar mascavo consumida no Brasil.

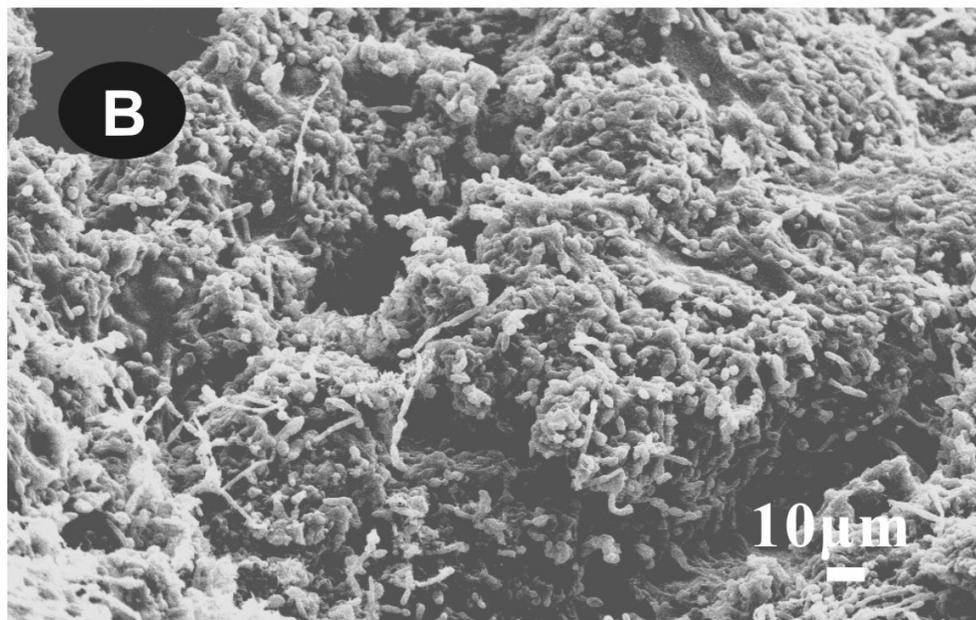
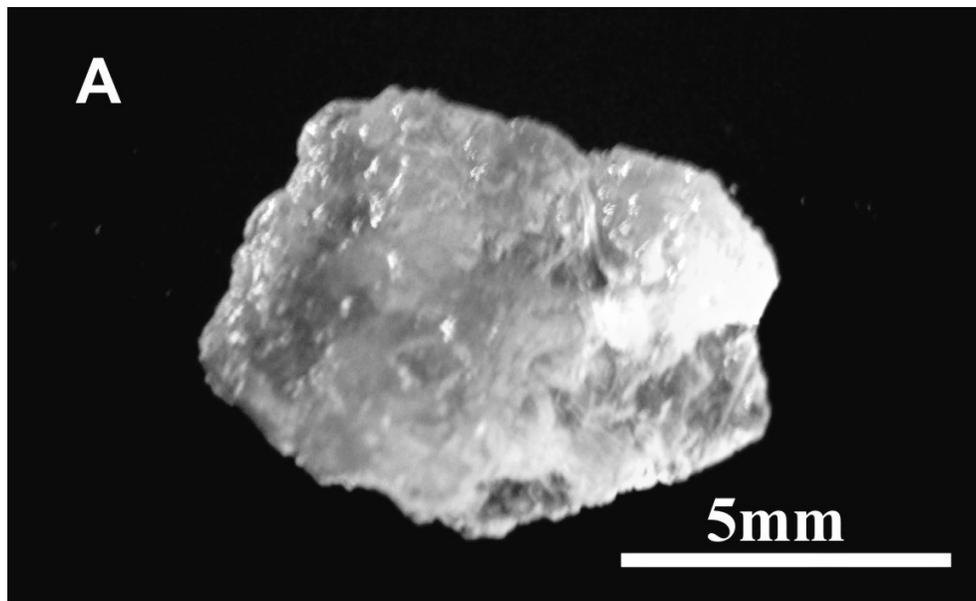


FIGURA 2 Eletromicrografia de varredura de grãos de quefir de açúcar mascavo. A - Grão de quefir. B – Superfície externa do grão de quefir

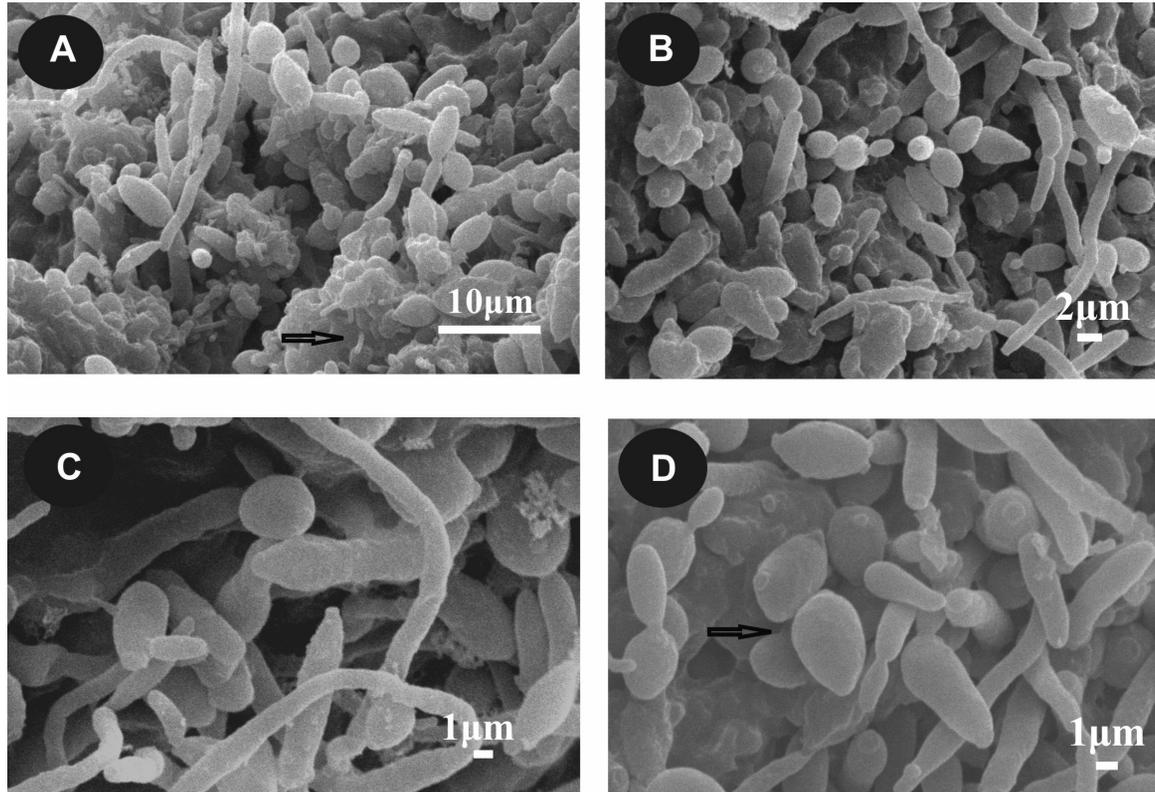


FIGURA 3 Eletromicrografia de varredura de grãos de quefir de açúcar mascavo. A,B,C,D – Superfície externa do grão de quefir

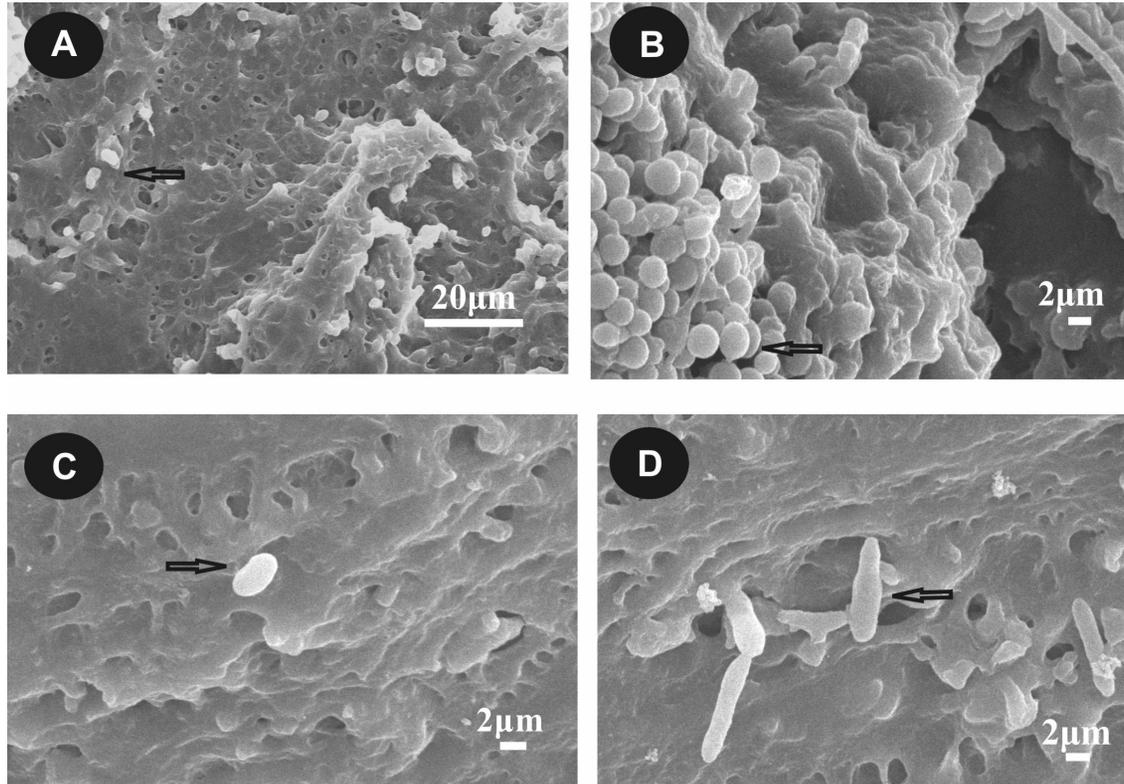


FIGURA 4 Eletromicrografia de varredura de grãos de quefir de açúcar mascavo. A,B,C,D – Superfície interna do grão de quefir

4 CONCLUSÃO

A espécie bacteriana dominante foi *Lactobacillus paracasei* ssp *paracasei* 1 e *Candida kunwiensis* foi a espécie de levedura dominante, durante as 24 horas de fermentação da bebida.

Durante o processo de fermentação, foram observadas quatro distintas populações microbianas. As bactérias láticas predominaram, seguidas pelas leveduras, bactérias Gram-negativas e espécies de *Corynebacterium*.

Os grupos de microrganismos identificados na bebida quefir de açúcar mascavo realizaram três tipos de fermentação durante o processo: lática, alcoólica e acética.

Em análises realizadas usando a Microscopia Eletrônica de Varredura, os grãos de quefir mostraram maior colonização de leveduras e bactérias na superfície externa dos grãos, comparada à superfície interna desses mesmos grãos. Não foi possível a visualização de células bacterianas na superfície interna dos grãos.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de estudos para Karina Teixeira Magalhães. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), pelo suporte financeiro.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, E.G.; RACHID, C.C.T.C.; SCHWAN, R.F. Microbial population present in fermented beverage 'cauim' produced by Brazilian Ameridians. **International Journal of Microbiology**, v 120, p. 146-151, 2007.
- ANGULO, L.; LOPEZ, E.; LEMA, C. Microflora present in kefir grains of the Galician Region (North-West of Spain). **Journal of Dairy Research**, v. 60, p. 263-267, 1993.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMIST. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemist**. 16thed. Washington, 1995.
- ASSADI, M.M.; POURAHMAD, R.; MOAZAMI, N. Use of isolated kefir starter cultures in kefir production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 16, p. 541-543, 2000.
- ATHANASIADIS, I.; PARASKEVOPOULOU, A.; BLEKAS, G.; KIOSSEOGLOU, V. Development of a Novel Whey Beverage by Fermentation with Kefir Granules. Effect of Various Treatments. **Biotechnological**, v. 20, p. 1091-1095, 2004.
- BARNETT, J.A.; PAYNE, R.W.; YARROW, D. **Yeast** – characteristic and identification. 3rded. Cambridge: Cambridge University, 2000.
- BENKERROUM, N.; MISBAH, M.; SANDINE, W.E.; ELARAKI, A.T. Development and use of a selective médium for isolation of *Leuconostoc* spp. From vegetables and dairy products. **Microbiology Applied Microbiological**, v. 59, n. 2, 607-609, 1993.
- BESHKOVA, D.M.; SIMOVA, E.D.; FRENGOVA, G.I.; SIMOV, Z.I. DIMITROV, Z.H.P. Production of volatile aroma compounds by kefir stater cultures. **International Dairy Journal**, v. 13, p. 529-535, 2003.
- BRENNAN, N.M.; WARD, A.C.; BERESFORD, T.P.; FOX, P.F.; GOODFELLOW, M.; COGAN, T. Biodiversity of bacterial flora on the surface of a smear cheese. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 2, 820-830, 2002.

- CARVALHO, E.P.; CANHOS, V.P.; VILELA, E.R.; ASQUERI, E.R.; CARVALHO, H.P. Determinacion de la flora microbiana de la fécula de yuca fermentada (polvillo azedo) durante las diferentes etapas de procesamiento. **Alimentaria**, Madrid, v. 305, p. 97-103, 1999.
- COTON, E.; COTON, M.; LEVERT, D.; CASAREGOLA, S.; SOHIER, D. Yeast ecology in french cider and black olive natural fermentations. **International Journal Food Microbiology**, v. 108, p. 130-135, 2006.
- DIAS, L.; DIAS, S.; SANCHO, T.; STENDER, H.; QUEROL, A.; MALFEITO-FERREIRA, M.; LOUREIRO, V. Identification of yeast isolated from wine-related environments and capable of producing 4-ethylphenol. **Food Microbiology**, v. 20, p. 567-574, 2003.
- DI MARO, E.; ERCOLINI, D.; COPPOLA, S. Yeast dynamics during spontaneous wine fermentation of the Catalanesca grape. **International Journal of Food Microbiology**, v. 117, p. 201-210, 2007.
- FOOD DRUGS ADMINISTRATION. **Bacteriological analytical manual**. Washington: AOAC International, 1972.
- GUZEL-SEYDIM, Z.B.; SEYDIM, A.C.; GREENE, A.K.; BODINE, A.B. Determination of organic acids and volatile flavor substances in kefir during fermentation. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 13, p. 35-43, 2000.
- GUZEL-SEYDIM, Z.; WYFFELS, J.T.; SEYDIM, A.C.; GREENE, A.K. Turkish kefir and kefir grains: microbial enumeration and electron microscobic observation. **International Journal of Dairy Technology**, v. 58, n. 1, 25-29, 2005.
- HAMMES, N.W.; WEISS, N.; HOLZAPFEL, W. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: BALLOWS . (Ed.). **The prokaryotes**. New York: Springer-Verlang, 1991. v. 2, p. 1535-1594.
- HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9.ed. Baltimore: Williams &Wilkins, 1994. 787 p.
- HONG, S.G.; BAE, K.S.; HERZBERG, M.; TITZE, A.; LACHANCE, M.A. *Candida kunwiensis* sp. Nov., a yeast associated with flowers and bumblebees.

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 53, p. 367-372, 2003.

IRIGOYEN, A.; ARANA, I.; CASTIELLA, M.; TORRE, P.; IBÁÑEZ, F.C. Microbiological, physicochemical, and sensory characteristics of kefir during storage. **Food Chemistry**, v. 90, p. 613-620, 2005.

KOOIMAN, P. The chemical structure of kefiran, the water-soluble polysaccharide of the kefir grain. **Carbohydrate Research**, v. 7, p. 200-211, 1968.

KURTZMAN, C.P.; BOEKHOUT, T.; ROBERT, V.; FELL, W.J.; DEAK, T.; Methods to identify yeasts. In: ROBERT, V. (Ed.). **Yeasts in food: beneficial and detrimental aspects**. Hamburg: B. Beh's Verlag GmbH, 2003. p. 69-117.

LAPPE, P.; MONROY, M.T.R.; VEGA, C.A.; ULLOA, M. Especies de levaduras aisladas de tibicos cultivados en soluciones azucaradas de piloncillo y de melaza. **Micological**, v. 5, p. 1-10, 1992.

LEE, M.Y.; AHN, K.S.; KWON, O.K.; KIM, M.J.; KIM, M.K.; LEE, I.Y.; OH, S.R.; LEE, H.K. Anti-inflammatory and anti-allergic effects of kefir in mouse asthma model. **Immunobiology**, v. 212, p. 647-654, 2007.

LIN, C.W.; KUO, C.Y. Identification and characterization of lactic acid bacteria and yeasts isolated from kefir grains in Taiwan. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 54, p. 14-18, 1999.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de brock**. 10.ed. Tradução de Cynthia Maria Kiaw. São Paulo. Prentice Hall, 2004.

NEVE, H.; HELLER, K.J. The microflora of water kefir: a glance by scanning electron microscopy. **Kieler Milch-wirtschaftliche Forschungsberichte**, v. 54, p. 337-349, 2002.

OTLES, S.; CAGINDI, O. Kefir: a probiotic dairy-composition, nutritional and therapeutic aspects. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 2, n. 2, 54-59, 2003.

OUDE ELFERINK, S.J.W.H.; KROONEMAN, J.; GOTTSCHAL, J.C. Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1,2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*. **Applied and Environmental Microbiology**, 67, 125-132. 2001.

PELCZAR Jr, J. M.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R.; **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2. ed. v. 1, 524 p. 1996.

PIDOUX, M. The microbial flora of sugary kefir grain (the gingerbeer plant): biosynthesis of the grain from *Lactobacillus hilgardii* producing a polysaccharide gel. **Mircen Journal**, v. 5, p. 223-238, 1989.

RAIMUNDO, I. C.; FREITAS, F. A.; MATOS, A. M.; CRISPIM, S. M.; NARDI, R. M. D.; NICOLI, J. R. Análise da microbiota de quefir e sua ação antagonista contra microrganismos patogênicos. In: **XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia**, Santos, SP. Anais, v. 1, p. 195-195. 2005.

RUBIO, M.T.; LAPPE, P.; WACHER, C.; ULLOA, M. Estudio Microbiano y Químico de la Fermentación de Soluciones de Piloncillo Inoculadas con Tibicos. **Latina-American Microbiological**, v. 35, p. 19-31. 1993.

SANTOS, A.; SAN MAURO, M.; SANCHES, A.; TORRES, J.M.; MARQUINA, D. The antimicrobial Properties of Different Strains of *Lactobacillus* spp. Isolated from Kefir. **Applied Microbiological**, v. 26, p. 434-437. 2003.

SASAHARA, H.; IZUMORI, K. Production of L- Talitol from L- Psicose by *Metschnikowia koreensis* LA1 isolated from Soy Sauce mash. **Journal of Bioscience And Bioengineering**, v. 100, n. 3, p. 335-338. 2005.

SILVA, D.D.V.; CARVALHO, W.; CANILHA, L.; MANCILHA, I.M. Aditivos alimentares produzidos por via fermentativa Parte 2: Aminoácidos e vitaminas. **Revista Analytica**, v. 19, p. 62-73. 2005.

TADA, S.; KATAKURA, Y.; NINOMIYA, K.; SHIOYA, S. Fed-Batch Coculture of *Lactobacillus kefirifaciens* with *Saccharomyces cerevisiae* for Effective Production of Kefiran. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 103, n. 6, p. 557-562. 2007.

TOBA, T.; ARIHARA, K.; ADACHI, S. Distribution of microorganisms with particular referente to encapsulated bacteria in kefir grains. **International Journal of food Microbiology**, Amsterdam, Elsevier Science Publishers, v. 10, p. 219-224. 1990.

TOMAS, J.M.; CIURANA, B.; JOFRE, J. T. New, Simple Médium for Selective, Differential Recovery of *Klebsiella* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 51, n. 6, p. 1361-1363. 1986.

ULLOA, M.; LAPPE, P.; TABOADA, J.; DÍAS-GARCÉS, J. Mycobiotaof the Tibi grains used to ferment Pulque in Mexico. **Revista Mexicana de Micología**, v. 10, p. 153-159. 1994.

WITTHUHN, R.C.; SCHOEMAN, T.; BRITZ, T.J. Characterisation of the microbial population at different stages of kefir production and kefir grain mass cultivation. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 383-389. 2004a.

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, p. 33-37. 2004b.

WSZOLEK, M.; TAMINE, A.Y.; MUIR, D.D.; BARCLAY, M.N.I. Properties of Kefir made in Scotland and Poland using Bovine, Caprine and Ovine Milk with Different Starter Cultures. **Technology, Lebensm**, v. 34, p. 251-261. 2001.

YÜKSEKDAG, Z.N.; BEYATLI, Y.; ASLIM, B. Determination of some characteristics coccoid forms of lactic acid bacteria isolated from Turkish kefir with natural probiotic. **Technology, Lebensm**, v. 37, p. 663-667. 2004.

ANEXO

	Pag
ANEXO A.....	108

ANEXO A

AGRADECIMENTOS

