

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia

Karen Costa

**OBTENÇÃO DE CULTURAS INICIADORAS PARA PRODUÇÃO DE KEFIR DE
LEITE ADICIONADAS OU NÃO DE LINHAGEM PROBIÓTICA**

Belo Horizonte

2023

Karen Costa

**OBTENÇÃO DE CULTURAS INICIADORAS PARA PRODUÇÃO DE KEFIR DE
LEITE ADICIONADAS OU NÃO DE LINHAGEM PROBIÓTICA**

Versão final

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciências biológicas (Microbiologia).

Orientadora: Profa. Dra. Elisabeth Neumann

Belo Horizonte
2023

043

Costa, Karen.

Obtenção de culturas iniciadoras para produção de kefir de leite adicionadas ou não de linhagem probiótica [manuscrito] / Karen Costa. – 2023. 131 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientação: Profa. Dra. Elisabeth Neumann.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Kefir. 3. Alimento funcional. 4. Fermentação. 5. Probióticos. I. Neumann, Elisabeth. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 579

Ficha Catalográfica elaborada por Jéssica Patrícia Silva de Sá CRB 6 3430

“Observação: o conteúdo da tese está em processo de registro via Know How devendo assim, matéria sensível da tecnologia ser protegida e mantida sob sigilo.”



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DE DEFESA DE TESE

ATA DA DEFESA DE TESE DE KAREN COSTA

Nº REGISTRO: 2019703887

Às 14:00 horas do dia 05 de maio de 2023, reuniu-se, por via remota, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Jacques Robert Nicoli (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG), Marcelo Resende de Souza (Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG), Mirian Pereira Rodarte (Universidade Federal de Juiz de Fora), Andreia Marçal da Silva (Universidade Federal de São João Del Rey) e a Profa. Dra. Elisabeth Neumann (Orientadora), para julgar o trabalho final "Obtenção de culturas iniciadoras para a produção de kefir de leite, adicionadas ou não de linhagem probiótica" da aluna Karen Costa, requisito final para a obtenção do Grau de DOUTORA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Dra. Elisabeth Neumann, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada APROVADA. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. A candidata tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da tese ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Belo Horizonte, 05 de maio de 2023

Membros da Banca:

Prof. Dr. Jacques Robert Nicoli
Prof. Dr. Marcelo Resende de Souza
Profa. Dra. Mirian Pereira Rodarte
Dra. Andreia Marçal da Silva

De acordo:

Profa. Dra. Elisabeth Neumann
(Orientadora)

Profa. Dra. Daniele da Glória de Souza
(Coordenadora do Programa de Pós-graduação
em Microbiologia)



Documento assinado eletronicamente por Jacques Robert Nicoli, Professor Magistério Superior - Voluntário, em 09/05/2023, às 09:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Elisabeth Neumann, Professora do Magistério Superior, em 09/05/2023, às 09:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Andréia Marçal da Silva, Usuário Externo, em 09/05/2023, às 13:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Marcelo Resende de Souza, Professor do Magistério Superior, em 09/05/2023, às 20:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Daniele da Glória de Souza, Coordenador(a) de curso de pós-graduação, em 10/05/2023, às 12:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Mirian Pereira Rodarte, Usuária Externa, em 12/05/2023, às 16:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 1943947 e o código CRC 854C5715.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pelo dom da vida e pela saúde para concluir mais esta etapa. Não foram de fato tempos fáceis, mas olhando para trás agora consigo me orgulhar da trajetória que dediquei estes anos à pesquisa.

Agradeço à minha orientadora, professora Elisabeth Neumann, pela oportunidade concedida de orientação no mestrado e no doutorado, pela confiança e por todo conhecimento compartilhado. Muito obrigada por acreditar e não desistir do nosso trabalho. Obrigada por me manter motivada durante este tempo. O seu apoio foi fundamental para que este trabalho pudesse ser desenvolvido.

Agradeço ao professor Jacques Robert Nicoli pela atenção, incentivo e apoio a este projeto. Foi sempre um prazer poder contar com todas as suas considerações nos trabalhos que pude desenvolver. Tenho grande apreço e respeito pelo senhor.

Agradeço à professora Andreia Marçal pelo amparo durante a minha graduação, por me guiar nas escolhas para seguir a carreira acadêmica e me proporcionar conhecer pesquisadores incríveis, como os já citados por exemplo. Sou muito grata pela confiança e é um prazer contar com sua avaliação nesta reta final. Também agradeço aos professores membros titulares e suplentes da banca de avaliação desta tese, pelo tempo dedicado a leitura e as considerações feitas ao trabalho realizado.

Agradeço aos amigos e colegas que a UFMG me trouxe, em especial a Gabriele, Mariana, César, Gustavo e Livia pela amizade e as palavras de carinho nos momentos que mais precisei. O incentivo e convivência com vocês permitiram que o doutorado se tornasse mais leve e agradável. Obrigada pelos momentos incríveis e pelas boas risadas juntos.

Agradeço aos colaboradores e parceiros que auxiliaram de alguma maneira para execução deste trabalho. Sou grata por ter aprendido tanto com vocês. Em especial os técnicos Jamil e Ronália, aos alunos da pós-graduação da Escola de Farmácia Vinícius Correia e Isabela pelo auxílio e suporte com a análise sensorial e as alunas de iniciação científica Sara, Tainá Lobo e Mariana.

Sou grata à minha mãe Vera, irmã Denise, prima Caroline e ao meu companheiro Leandro por me incentivarem e acreditarem que eu seria capaz de superar os obstáculos que a vida me apresentou. Obrigada por sempre estarem ao meu lado, por todo apoio emocional e por me encorajarem a crescer profissionalmente.

Agradeço aos órgãos financiadores deste trabalho, em especial a CAPES, por conceder a bolsa. Também agradeço à Universidade Federal de Minas Gerais e aos docentes com quem tive contato durante os anos de pós-graduação, por todo aprendizado, trocas e incentivos a percorrer o caminho da pesquisa científica.

De modo geral, a todas as pessoas que de alguma maneira contribuíram para que este trabalho fosse realizado ou que me apoiaram e torceram por mim durante esta jornada, muito obrigada!

*“Não considere nenhuma prática como imutável.
Mude e esteja pronto a mudar novamente.
Não aceite verdade eterna. Experimente.”
(Skinner, 1969, p.viii)*

Resumo

Kefir é uma bebida fermentada produzida por meio da inoculação dos grãos de kefir em substratos como o leite. Estes grãos são constituídos por uma microbiota diversificada de bactérias lácticas, acéticas e leveduras. Apesar de vários estudos demonstrarem efeitos benéficos à saúde advindos da ingestão de kefir, no Brasil o consumo da bebida ainda é incipiente e a produção é majoritariamente em ambiente doméstico, com inoculação direta dos grãos no substrato que se deseja fermentar. A bebida resultante desta fermentação não é padronizada e pode apresentar características sensoriais e reológicas que variam de acordo com as condições de cultivo e manutenção dos grãos. Uma alternativa para contornar este problema é o uso de culturas iniciadoras como inóculo. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi otimizar o processo de obtenção de culturas iniciadoras que possam ser empregadas na produção de kefir de leite. Foram testados liofilização e *spray drying* como métodos de preservação de bactérias ácido lácticas (*Bac1*, *Bac2*; *Bac3*) e levedura (*Lev1*) e foram propostas duas culturas iniciadoras contendo as culturas desidratadas. A cultura C1 foi composta pelas três bactérias lácticas e a levedura e na C2 substituiu-se a linhagem *Bac1* pela linhagem bacteriana P1, com potencial probiótico já conhecido. O efeito dos métodos de desidratação de culturas sobre a viabilidade e padrão de crescimento destas linhagens foi investigado. As amostras liofilizadas com o crioprotetor II apresentaram melhor manutenção da viabilidade (contagens acima de 9,0 log UFC/g para as bactérias lácticas e 8,0 log UFC/g para a levedura) e menor fase de latência após armazenamento por 180 dias sob refrigeração. A produção das bebidas foi padronizada pelo emprego das culturas iniciadoras C1 e C2, com fermentação de 13 horas até atingir o pH desejável (4,6). Além dessas duas bebidas, preparou-se uma terceira (C3), na qual foi adicionada a linhagem probiótica P1. As bebidas C1 e C3 apresentaram concentração mínima de bactérias lácticas totais e leveduras que caracterizam o kefir de leite, segundo a Instrução Normativa nº 46, de 2007. Além disso, apresentaram resultados de parâmetros físico-químicos (pH, composição centesimal e compostos orgânicos) semelhantes aos obtidos para o controle (KLCU) e, na avaliação sensorial tiveram maior aceitação quando comparadas ao kefir controle (KLCU) e preferência ($p < 0,05$) dos avaliadores, quanto aos atributos textura, sabor e impressão global. Segundo os avaliadores, em caso de comercialização destes leites fermentados, foi indicada maior intenção de compra para as bebidas preparadas com as culturas C1 e C3 ($p < 0,05$). A ingestão diária das bebidas fermentadas C1 e C3 por camundongos convencionais desafiados com *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sor. Typhimurium não resultou em sobrevivência estatisticamente diferente do grupo controle ($p > 0,05$), sendo observada uma maior sobrevivência apenas para o grupo tratado com KLCU ($p = 0,0183$). A não proteção observada para C3, pode ser atribuída à baixa concentração da linhagem com propriedades probióticas na dose diária administrada aos camundongos, o que precisa ser melhor investigado. Nossos resultados permitem concluir que foi possível desenvolver, de forma inovadora, uma cultura iniciadora, composta por microrganismos isolados de grãos de kefir circulantes no Brasil. Esta cultura foi capaz de gerar uma bebida dentro dos padrões de identidade determinados pela legislação, quanto às propriedades microbiológicas e físico-químicas, e bem aceita por um painel de avaliadores. Importante ressaltar ainda que a adição da linhagem probiótica P1 não afetou nenhum dos parâmetros avaliados para a bebida produzida com a cultura iniciadora C1.

Palavras-chave: Kefir. Leite fermentado. Alimento funcional. Cultura iniciadora. *Freeze-drying*. *Spray-drying*. Características probióticas. *Salmonella* Typhimurium.

Abstract

Kefir is a fermented beverage produced by inoculating of kefir grains in substrates such as milk. These grains consist of a diverse microbiota of lactic and acetic acid bacteria and yeasts. Despite several studies demonstrating the health benefits of consuming kefir, its consumption in Brazil is still incipient, and production is mostly carried out in domestic environments with direct inoculation of grains in the substrate to be fermented. The resulting drink is not standardized and may present sensory and rheological characteristics that vary according to the cultivation and maintenance conditions of the grains. An alternative to overcome this problem is the use of starter cultures as inoculum. Therefore, the aim of this study was to optimize the process of obtaining starter cultures that can be used in milk kefir production. Freeze drying and spray drying were tested as methods for preserving lactic acid bacteria (*Bac1*, *Bac2*, *Bac3*) and yeast (*Lev1*), and two starter cultures containing the dehydrated cultures were proposed. Culture C1 was composed of the three lactic acid bacteria and yeast, and in C2, the *Bac1* strain was replaced by the bacterial strain P1, a strain with known probiotic potential. The effect of the culture dehydration methods on the viability and growth pattern of these strains using cryoprotectants (freeze drying) or carriers (spray drying) was investigated. Freeze dried samples with skim milk and sucrose cryoprotectant had better viability maintenance (counts above 9.0 log CFU/g for lactic acid bacteria and 8.0 log CFU/g for yeast) and a shorter lag phase after 180 days of refrigerated storage. The production of the beverages was standardized by using starter cultures C1 and C2, and fermentation was carried out for 13 hours until reaching the desired pH (4.6). In addition to these two drinks, a third one was prepared (C3) was prepared, in which the probiotic strain P1 was added. The C1 and C3 beverages exhibited a minimum concentration of total lactic acid bacteria and yeasts that characterize milk kefir, according to Normative Instruction No. 46 of 2007. Moreover, they presented similar physicochemical parameters (pH, centesimal composition, and organic compounds) to those obtained for the control (KLCU) and were more preferred by in the sensory evaluation ($p < 0.05$) in terms of texture, flavor, and overall impression attributes. According to the evaluators, in case of commercialization of these fermented milks, there was a higher intention to buy the beverages prepared with C1 and C3 cultures ($p < 0.05$). The daily ingestion of fermented beverages C1 and C3 by conventional mice challenged with *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sor. Typhimurium did not result in statistically different survival rates compared to the control group ($p > 0.05$), only the group treated with KLCU showing higher survival ($p = 0.0183$). The lack of protection observed for C3 may be attributed to the low concentration of the strain with probiotic properties in the daily dose administered to the mice, which needs to be further investigated. Our results allow us to conclude that it was possible to develop an innovative starter culture composed of microorganisms isolated from circulating kefir grains in Brazil. This culture was able to produce a beverage within the identity standards determined by legislation, regarding microbiological and physicochemical properties, and well accepted by a panel of evaluators. It is also important to emphasize that the addition of the probiotic strain P1 did not affect any of the parameters evaluated for the beverage produced with the starter culture C1.

Keywords: Kefir. Fermented milk. Functional food. Starter culture. Freeze-drying. Spray drying. Probiotic characteristics. *Salmonella* Typhimurium.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema de um liofilizador (A). Diagrama de fases da água, com destaque para sublimação, etapa que caracteriza o processo de liofilização (B)	27
Figura 2 - Esquema de funcionamento, variáveis do processo, materiais carreadores e estratégias de pré-tratamento para aumentar a viabilidade após secagem em <i>spray dryer</i>	29
Figura 3 - Viabilidade (log UFC/g) das linhagens de bactérias lácticas (A) Bac2, (B) Bac3, (C) Bac1, (D) P1, e da linhagem de levedura Lev1 (E), logo após secagem no <i>spray dryer</i> (T0) e ao longo do armazenamento refrigerado de 90 e 180 dias	50
Figura 4 - Padrão de crescimento de Bac2 logo após a secagem por atomização (A) e ao longo do armazenamento refrigerado de 90 dias (B) e 180 dias (C)	52
Figura 5 - Padrão de crescimento de Bac3 logo após a secagem por atomização (A) e ao longo do armazenamento refrigerado de 90 dias (B) e 180 dias (C)	53
Figura 6 - Padrão de crescimento de (Bac1) logo após a secagem por atomização (A) e ao longo do armazenamento refrigerado de 90 dias (B) e 180 dias (C)	54
Figura 7 - Padrão de crescimento de P1 logo após a secagem por atomização (A) e ao longo do armazenamento refrigerado de 90 dias (B) e 180 dias (C)	55
Figura 8 - Padrão de crescimento de Lev1 logo após a secagem por atomização (A) e ao longo do armazenamento refrigerado de 90 dias (B) e 180 dias (C)	56
Figura 9 - Viabilidade (log UFC/g) das linhagens de bactérias lácticas (A) Bac2, (B) Bac3, (C) Bac1, (D) P1, e da linhagem de levedura Lev1 (E) e (F), logo após a liofilização (T0) e ao longo do armazenamento refrigerado de 90 e 180 dias	58
Figura 10 - Padrão de crescimento de Bac2 logo após a liofilização (A) e ao longo do armazenamento refrigerado de 90 (B) e 180 dias (C).	60
Figura 11 - Padrão de crescimento de Bac3 logo após a liofilização (A) e ao longo do armazenamento refrigerado de 90 (B) e 180 dias (C)	61
Figura 12 - Padrão de crescimento de Bac1 logo após a liofilização (A) e ao longo do armazenamento refrigerado de 90 (B) e 180 dias (C)	62
Figura 13 - Padrão de crescimento de P1 logo após a liofilização (A) e ao longo do armazenamento refrigerado de 90 (B) e 180 dias (C)	63
Figura 14 - Padrão de crescimento de Lev1 logo após a liofilização (A) e ao longo do armazenamento refrigerado de 90 (B) e 180 dias (C)	64
Figura 15 - Padrão de crescimento de Lev1 logo após a liofilização (A) e ao longo do armazenamento refrigerado de 90 (B) e 180 dias (C)	65

Figura 16 - Perfil de acidificação das linhagens liofilizadas inoculadas isoladamente em leite integral reconstituído a 10% e contagem de células viáveis (Log UFC/mL) ao final de 24 horas de fermentação, (n=2).	67
Figura 17 - Perfil de acidificação das culturas iniciadoras C1 e C2 empregando diferentes proporções de inóculos Z; Y e X em leite integral reconstituído 10%	67
Figura 18 - Contagem total de bactérias lácticas (A) e leveduras (B) no kefir preparado com os grãos (KLCU) ou com as culturas iniciadoras C1 e C3, recém liofilizadas ou após armazenamento.	70
Figura 19 - Concentração (log UFC/mL) de P1 adicionada a bebida C3 na proporção de X, ao longo do armazenamento refrigerado de 28 dias (n=2).....	71
Figura 20 - Concentração (log UFC/mL) de P1 adicionada ao kefir C3 na proporção de Z e Y, ao longo do armazenamento refrigerado de 28 dias. As bebidas fermentadas foram preparadas com culturas recém liofilizadas (T0 dias)	72
Figura 21 - Concentração (log UFC/mL) de P1 adicionada ao kefir C3 na proporção de Z e Y, ao longo do armazenamento refrigerado de 28 dias.....	73
Figura 22 - Percentual (%) de sobrevivência de camundongos Balb/C infectados com <i>S. Typhimurium</i> , tratados ou não com kefir preparado com grãos KLCU (▲) ou com as culturas iniciadoras C1 (▼) e C2 (□), (n=11)	80
Figura 23 - Variação do peso percentual de camundongos Balb/C tratados ou não com kefir preparado com os grãos de leite de Curitiba KLCU (▲) ou com as culturas iniciadoras C1 (▼) e C2 (□) e desafiados com <i>S. Typhimurium</i> (inóculo intragástrico único de 10^5 UFC).....	80
Figura 24 - Perfil de crescimento das linhagens de (A) Bac2 e (B) Bac3 em caldo MRS após 2h de exposição a solução de salina 0,85% (●) ou a solução de suco gástrico simulado (▪)	83
Figura 25 - Colônias mucoides, demonstrando a produção de EPS por Bac3 em MRS adicionado de sacarose.	83
Figura 26 - Sobrevivência (%) de camundongos Balb/C tratados ou não com as linhagens Bac2 (●) e Bac3 (■) isolados de grãos de kefir de leite, e desafiados com <i>S. Typhimurium</i> (inóculo intragástrico único de 10^5 UFC).....	87
Figura 27 - Variação média do percentual de peso de camundongos Balb/C tratados ou não com as linhagens Bac2 (●) e Bac3 (■) isolados de grãos de kefir de leite e desafiados com <i>S. Typhimurium</i> (inóculo intragástrico único de 10^5 UFC)	88
Figura 28 - Curva padrão para cálculo da concentração da linhagem P1 (log UFC/mL), construída a partir de amostras extraídas do crescimento de 1×10^9 UFC/mL em caldo MRS em função do <i>Cycle Threshold</i> da qPCR.	113
Figura 29 - Curva padrão para cálculo da concentração da linhagem P1 (log UFC/mL), construída a partir de amostras extraídas do crescimento de 1×10^9 UFC/mL em caldo MRS em função do <i>Cycle Threshold</i> da qPCR.	113

Figura 30 - Curva padrão para determinação da concentração (mg/mL) de ácido lático por HPLC nas amostras de kefir de leite.....	114
Figura 31 - Percentual (%) de sobrevivência de camundongos Balb/C infectados com <i>S. Typhimurium</i> , tratados ou não com kefir preparado com grãos KLCU (▲) ou com as culturas iniciadoras C1 (▼) e C2 (◆), (n=10).....	122
Figura 32 - Variação do peso percentual de camundongos Balb/C tratados ou não com kefir preparado com os grãos de leite de Curitiba KLCU(▲) ou com as culturas iniciadoras C1 (▼) e C2 (◆) e desafiados com <i>S. Typhimurium</i> (inóculo intragástrico único de 10^5 UFC).....	123
Figura 33 - Antagonismo <i>in vitro</i> entre linhagens que compõem a cultura iniciadora proposta para produção de kefir adicionada de linhagem probiótica	125
Figura 34 - Foto de eletroforese em gel de agarose 1% mostrando a presença ou ausência do produto de PCR do gene <i>Holin</i> nos microrganismos que compõem as culturas iniciadoras C1 e C3.....	127

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Linhagens de bactérias lácticas e leveduras utilizadas no estudo.	35
Tabela 2 - Culturas iniciadoras, composição microbiana e suas principais diferenças.	38
Tabela 3 - Média ($\pm$ SD) do número de células viáveis (log UFC/mL) antes do processo de <i>spray drying</i> (T'), (n=2).	49
Tabela 4 - Média ($\pm$ SD) do número de células viáveis (log UFC/mL) antes do processo de liofilização (T').	57
Tabela 5 - Contagens de bactérias lácticas totais e leveduras (log UFC/mL) de diferentes inóculos (Z, Y e X) para o preparo de kefir (C1 e C2), após adição em leite integral reconstituído 10% (T0) e ao final da fermentação (TF), (n=2).	68
Tabela 6 - Características físico-químicas do kefir produzido com grãos (KLCU) ou com culturas iniciadoras liofilizadas (C1 e C3), durante 28 dias de armazenamento das bebidas sob refrigeração. .	76
Tabela 7 - Compostos químicos quantificados por análise de HPLC durante produção de kefir pelos grãos (KLCU) ou culturas iniciadoras (C1 e C3), durante 28 dias de armazenamento das bebidas sob refrigeração.	77
Tabela 8 - Aceitação sensorial e intenção de compra de formulações de kefir de leite.	78
Tabela 9 - Perfil de crescimento das linhagens de Bac2 e Bac3 em ágar MRS acrescido de diferentes concentrações de sais biliares (Oxgall, Difco).	81
Tabela 10 - Atividade antimicrobiana (medida pelo diâmetro médio das zonas de inibição em mm) das linhagens de Bac2 e Bac3 contra patógenos.	85
Tabela 11 - Porcentagem (%) de auto-agregação e co-agregação com bactérias patogênicas de Bac2 e Bac3.	86
Tabela 12 - Contagem total de bactérias ácido-láticas (UFC/mL) no kefir preparado com grãos (KLCU) e com culturas iniciadoras (C1 e C3), recém liofilizadas (T0) e após seis meses de armazenamento refrigerado (T180).	121
Tabela 13 - Contagem total de leveduras (UFC/mL) no kefir preparado com grãos (KLCU) e com culturas iniciadoras (C1 e C3), recém liofilizadas (T0) e após seis meses de armazenamento refrigerado (T180).	121
Tabela 14 - Perfil de acidificação do kefir preparado com grãos (KLCU) e com as culturas iniciadoras (C1 e C3), recém liofilizadas (T0) e após seis meses de armazenamento refrigerado (T180).	122
Tabela 15 - Datas de óbito dos camundongos Balb/C tratados ou não com kefir, após infecção por <i>S. Typhimurium</i> , (n=10).	123
Tabela 16 - Datas de óbito dos camundongos Balb/C tratados ou não com kefir produzido com as culturas iniciadoras X, após infecção por <i>S. Typhimurium</i> , (n=11).	124

Tabela 17 - Atividade antagonista entre as linhagens que compõem as culturas iniciadoras, medidas através de halos de inibição (mm)..... 125

Tabela 18 - Datas de óbito dos camundongos BALB/C após infecção por *S. Typhimurium*, (n=10)..126

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

%	porcentagem
°C	graus Celsius
µL	microlitros
µm	micrômetros
µg	microgramas
~	aproximadamente
ABS	absorbância
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ARDRA	<i>Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis</i>
ATCC	<i>American Culture Type Collection</i>
BAL	bactérias ácido-láticas
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
DNA	ácido desoxirribonucleico
CEUA	Comissão de ética no Uso de Animais
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
cm	centímetros
CO ₂	dióxido de carbono
Ct	“ <i>Cycle threshold</i> ” – limiar do ciclo
DII	Doença Inflamatória Intestinal
DVS	<i>Direct Vat Set</i>
dNTP	dioxinucleotídeos
DO	densidade ótica
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
g	gramas
g/L	gramas/litro
gDNA	DNA genômico
h	horas
KAAS	<i>KEGG Automatic Annotation Server</i>
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
KL	kefir de leite
KLCU	kefir de leite de Curitiba/PR
L	litro
LEFM	Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos
Log	logaritmo
MATS	<i>Microbial Adhesion to Solvents</i>
MAL	leite desnatado 10% + maltose 10%
mM	mili molar
mm	milímetros

min.	minutos
mL/min	mililitro/minuto
mmol/L	milimol/litro
m/m	massa/massa
mg/mL	miligramas/mililitro
m/v	massa/volume
mg	miligramas
mL	mililitros
Mpa	megapascal
MRS	<i>de Man, Rogosa and Sharpe</i>
Na ₂ HPO ₄	fosfato dissódico
ng	nanogramas
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
nm	nanômetros
Pa	Pascal
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	potencial hidrogeniônico
p/v	peso/volume
qPCR	PCR quantitativa
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RNA	ácido ribonucleico
rpm	rotações por minuto
RTIQ	Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade
S.	<i>Salmonella</i>
	
SDS	dodecilsulfato de sódio
SKM	leite desnatado 10%
subsp.	subespécie
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
v/v	volume/volume
YPG	<i>Yeast Peptone Glucose</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

LABORATÓRIOS E COLABORADORES ENVOLVIDOS

Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos (LEFM), Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

- *Prof. Dr. Jacques Robert Nicoli*

Laboratório de Apoio do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Laboratório de Genética Molecular de Protozoários Parasitas, Departamento de Genética, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

- *Prof. Dr. Álvaro Cantini Nunes*

Laboratório de Genética Molecular de Protozoários Parasitas (LGMPP), Departamento de Genética, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

- *Prof. Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo*

Laboratório de Bromatologia, Departamento de Alimentos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais

- *Profa. Dra. Scheilla Vitorino Carvalho de Souza Ferreira*

Laboratório de Análise Sensorial e Estudos com Consumidor, Departamento de Alimentos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais

- *Profa. Dra. Camila Argenta Fante*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Kefir: definição, padrão de identidade e qualidade	19
1.2. Kefir como potencial veículo de linhagens probióticas	20
1.3. Kefir: métodos de produção.....	22
1.4. Culturas iniciadoras (<i>starters</i>)	23
1.5. Métodos de preservação de microrganismos	26
1.5.1. Liofilização (<i>Freeze-drying</i>).....	26
1.5.2. <i>Spray drying</i>	28
2. JUSTIFICATIVA.....	31
3. OBJETIVO	33
3.1. Objetivo geral	33
3.2. Objetivos específicos.....	33
4. METODOLOGIA	34
4.1. Microrganismos e condições de cultivo.....	34
4.2. Avaliação do potencial biotecnológico dos microrganismos.....	35
4.2.1. Preparo das culturas para desidratação	35
4.2.2. Secagem em <i>spray dryer</i>	35
4.2.3. Liofilização	36
4.2.4. Viabilidade celular	36
4.2.5. Padrão de crescimento <i>in vitro</i>	36
4.3. Composição das culturas iniciadoras.....	37
4.4. Capacidade de acidificação das linhagens e das culturas iniciadoras.....	37
4.5. Elaboração de kefir de leite com culturas liofilizadas: definição de inóculo e condições de fermentação	38
4.6. Caracterização do kefir produzido com culturas iniciadoras.....	38
4.6.1. Análises Microbiológicas.....	39
4.6.2. Análises físico-químicas	41
4.6.3. Análise sensorial	42
4.7. Avaliação do efeito da administração oral de kefir preparado com culturas iniciadoras sobre a sobrevivência de camundongos em modelo de infecção por <i>S. Typhimurium</i>	42
4.8. Avaliação do potencial probiótico das linhagens Bac2 e Bac3	43
4.9. Ensaios <i>in vitro</i>	43
4.8.1. Ensaios <i>in vivo</i> - Avaliação do efeito da administração oral das linhagens Bac2 e Bac3 sobre a sobrevivência de camundongos em modelo de infecção por <i>S. Typhimurium</i>	47

4.9. Análises estatísticas	48
5. RESULTADOS.....	49
5.1. Avaliação da resistência das linhagens ao processo de secagem em <i>Spray dryer</i>	49
5.1.1. Viabilidade.....	49
5.1.2. Padrão de crescimento	50
5.2. Avaliação da resistência das linhagens ao processo de liofilização.....	57
5.2.1. Viabilidade.....	57
5.2.2. Padrão de crescimento	59
5.3. Capacidade de acidificação das linhagens.....	66
5.4. Elaboração de kefir de leite com culturas iniciadoras: definição de inóculo e condições de fermentação	66
5.5. Caracterização de kefir produzido com as culturas iniciadoras.....	69
5.5.1. Microbiológica.....	69
5.5.2. Físico-química.....	72
5.5.3. Sensorial.....	74
5.5.4. Efeito da administração oral de kefir preparado com culturas iniciadoras liofilizadas sobre a sobrevivência de camundongos em modelo de infecção por <i>Salmonella Typhimurium</i>	79
5.6. Avaliação do potencial probiótico <i>in vitro</i> das linhagens Bac2 e Bac3	81
5.6.1. Aspectos de segurança - atividade hemolítica	81
5.6.2. Aspectos funcionais	81
5.6.3. Aspectos benéficos.....	82
5.7. Efeito da administração oral de Bac2 e Bac3 liofilizadas sobre a sobrevivência de camundongos em modelo de infecção por <i>Salmonella Typhimurium</i>	87
6. DISCUSSÃO.....	89
7. CONCLUSÃO	100
PERSPECTIVAS	101
REFERÊNCIAS	102
APÊNDICES	113

1. INTRODUÇÃO

1.1. Kefir: definição, padrão de identidade e qualidade

Kefir é um produto lácteo fermentado resultante da ação conjunta de uma mistura de bactérias e leveduras que se encontram envolvidas por uma matriz polissacarídica e proteica, denominada kefirano (Garrote et al., 2010; Magalhães et al., 2011; John; Deeseenthum, 2015; Prado et al., 2015). Estas estruturas constituem os chamados grãos de kefir. O metabolismo simbiótico destes microrganismos durante a fermentação é o responsável pela produção de ácido láctico, ácido acético, ácido succínico, ácido cítrico, dióxido de carbono, etanol e compostos aromáticos, que atribuem à bebida fermentada propriedades e características organolépticas únicas (Otlés; Cagindi, 2003). Acredita-se que este produto, tradicionalmente artesanal, já era consumido pelos russos nas montanhas do Cáucaso no final do século XIX e atualmente tem sido bastante difundido como alimento funcional natural complexo, em função basicamente de sua microbiota estável e dos compostos bioativos formados pelo metabolismo microbiano, que podem conferir benefícios nutricionais e terapêuticos quando regularmente consumidos pelo hospedeiro (Farnworth, 2005; Garrote et al., 2010; Leite et al., 2012).

Segundo o *Codex Alimentarius* (2018), kefir pode ser preparado a partir de culturas de microrganismos iniciadores dos grãos de kefir, *Lentilactobacillus kefiri*, espécies dos gêneros *Lactococcus*, *Leuconostoc* e *Acetobacter* que crescem em forte associação simbiótica, produzindo não só ácido láctico, mas também etanol e dióxido de carbono. A bebida kefir também apresenta em sua composição microbiológica leveduras fermentadoras de lactose como a espécie de *Kluyveromyces marxianus* e não fermentadoras de lactose, como as espécies de *Saccharomyces unisporus*, *Lev1* e *Saccharomyces exigus* (*Codex Alimentarius*, 2018). Por outro lado, a legislação brasileira ressalta ainda a presença de outros microrganismos, tais como *Lactocaseibacillus casei*, *Bifidobacterium* sp. e *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* (Brasil, 2007). A concentração total de microrganismos no kefir deve ser de, no mínimo, 10^7 UFC/g e 10^4 UFC/g de bactérias lácticas totais e leveduras, respectivamente (Brasil, 2007; John; Deeseenthum, 2015; *Codex Alimentarius*, 2018).

Com relação às características físico-químicas, o *Codex Alimentarius* (2018) também preconiza alguns parâmetros que contemplam o kefir de leite, tais como a presença de no mínimo 2,7% m/m de proteínas do leite, conteúdo de gorduras menor que 10% m/m e acidez titulável expressa em % m/m de ácido láctico de no mínimo 0,6. Em contrapartida, no Brasil, a concentração de ácido láctico na bebida fermentada pelos grãos de kefir não deve exceder 1% m/m do volume total e a legislação também determina que a porcentagem de etanol nas bebidas

esteja entre 0,5 e 1,5 % m/v (Brasil, 2007), o que não é especificado no documento de padronização internacional de alimentos pela Organização Mundial de Saúde (WHO) e Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO).

Os parâmetros físico-químicos e microbiológicos gerais do kefir são bem estabelecidos, porém algumas variações podem ocorrer dependendo da microbiota presente nos grãos e do substrato empregado como matéria-prima (Kazou et al., 2021). No entanto, vale ressaltar que as composições microbiológicas dos grãos de kefir e da bebida fermentada pelos grãos são bem similares (Kolakowski; Ozimkiewicz, 2012). Acredita-se que populações de bactérias lácticas e leveduras bastante específicas presentes nos grãos contribuam para características sensoriais peculiares verificadas no produto fermentado (Leite et al., 2012). Sendo assim, conhecer a composição microbiológica dos grãos de kefir e as características físico-químicas da bebida corresponde ao primeiro passo para se investigar e programar uma produção industrial de kefir em larga escala (Magalhães et al., 2011).

1.2. Kefir como potencial veículo de linhagens probióticas

Microrganismos probióticos são definidos como aqueles que quando administrados em quantidades adequadas oferecem benefícios ao hospedeiro (FAO/WHO, 2002). Segundo a RDC nº 241 de 2018 (Brasil, 2018) alguns critérios devem ser avaliados para comprovação da segurança e dos benefícios dos probióticos utilizados nos alimentos, tais como: a identificação da espécie, caracterização da linhagem através de métodos genotípicos e fenotípicos, especificação da origem da linhagem e seu histórico de uso seguro, ausência de fatores de patogenicidade relevantes para saúde humana, bem como a ausência de resistência potencialmente transferível de antibióticos de importância clínica. Além disso, a linhagem deve ser susceptível a pelo menos dois antimicrobianos. Os benefícios alegados podem ser de caráter geral ou específico e devem ser investigados através de ensaios de demonstração da sobrevivência às condições do trato gastrointestinal humano e de evidências dos efeitos da administração da linhagem utilizando um grupo representativo da população de interesse ou grupo em que os resultados gerados possam ser extrapolados aqueles de interesse. Outro aspecto relevante é a concentração mínima sugerida para obtenção do benefício alegado e a avaliação dos desfechos relevantes para o benefício.

Grande parte dos produtos contendo probióticos comercializados é de origem láctea (Ranadheera et al., 2010). Por apresentar em sua constituição linhagens já caracterizadas em diversos estudos de avaliação de potencial probiótico, o consumo adequado (com relação à frequência e quantidade) de kefir é constantemente associado a inúmeros benefícios à saúde.

Já foram relatados efeitos positivos da ingestão de kefir, tais como: capacidade de redução dos sintomas de intolerância à lactose, estimulação do sistema imunológico, redução do colesterol, propriedades antialérgicas, utilidade na terapia de feridas, propriedades mutagênicas e anticarcinogênicas, modulação intestinal, além dos efeitos antibacterianos contra bactérias Gram positivo e Gram negativo (Otlles et al., 2003; Liu et al., 2006; Guzel-Seydim et al., 2011; Nielsen et al., 2014; Arslan et al., 2015; Hatmal et al., 2018; Slattery et al., 2019; Farag et al., 2020). Os benefícios, entretanto, dependem da composição microbiológica, que varia em função da matéria-prima utilizada como substrato, origem dos grãos de kefir ou uso de culturas iniciadoras, temperatura de incubação, agitação e tamanho do inóculo (Irygoen et al., 2003; Prado et al., 2015; Kazou et al., 2021). Sendo assim, o conhecimento acerca da composição microbiana do kefir é fundamental, a fim de determinar com segurança a caracterização da bebida e possibilitar o estudo de seus benefícios. Considerando os inúmeros potenciais benefícios para saúde do hospedeiro, cresce o interesse industrial de produção de kefir (Kim et al., 2018).

Algumas pesquisas têm investigado os efeitos da administração de kefir *in vivo*, como por exemplo o estudo realizado por Erdogan et al. (2019) que compararam a microbiota intestinal de camundongos Balb/C alimentados com kefir produzidos a partir dos grãos de kefir ou por cultura iniciadora comercial. Foi observado aumento de bactérias lácticas na microbiota fecal de camundongos tratados com kefir produzido pelos grãos e este aumento foi associado à alta diversidade e conteúdo microbiano dos grãos de kefir, bem como a capacidade de resistência destes microrganismos, que sobreviveram ao trato gastrointestinal podendo assim desempenhar propriedades probióticas no intestino. Além disso, foram relatados efeitos antifúngicos e antioxidantes do kefir tradicional. Já o kefir industrializado não melhorou o conteúdo de bactérias ácido lácticas da microbiota fecal dos animais e altos valores de MPO (níveis de mieloperoxidase) foram identificados, sugestivo de uma possível inflamação do intestino delgado dos animais. Yilmaz et al. (2019) avaliaram o efeito da administração de kefir na microbiota fecal e nos sintomas de pacientes com doença inflamatória intestinal (DII). O kefir foi capaz de modular a microbiota intestinal e melhorou a qualidade de vida dos pacientes em um curto prazo. Análise fecal mostrou aumento na contagem de lactobacilos fecais em relação ao grupo não tratado. Estas bactérias potencialmente probióticas seriam capazes de fornecer uma barreira contra patógenos por meio de mecanismos tais como competição por nutrientes e produção de compostos antimicrobianos (Yilmaz et al., 2019; Gut et al., 2021).

1.3. Kefir: métodos de produção

O método tradicional comumente difundido e aplicado para obtenção de kefir corresponde à inoculação direta dos grãos em leite. No entanto, a produção pode ser feita utilizando-se a bebida fermentada para uma nova produção ou ainda empregando culturas iniciadoras isoladas ou não de grãos de kefir. Beshkova et al. (2002) investigaram diferentes métodos de produção de kefir. No método tradicional, leite com 3% de gordura foi homogeneizado a 12,5-17,5 MPa, pasteurizado a 92 °C durante 15 minutos e em seguida resfriado a 22 °C para adição do inóculo (3% de grãos de kefir). Em seguida, a mistura foi incubada a 22 °C por 22 horas ou até atingir pH 4,7. Durante este período foram realizadas 3-5 agitações manuais. Após a formação do coágulo, resfriou-se lentamente (20 horas) o produto final da fermentação até 10 °C. Os grãos de kefir foram recuperados e lavados com água destilada estéril utilizando peneira. Ao final do processo, 400 mL da bebida fermentada foram distribuídas em garrafas de vidro e acondicionadas a 4 °C. O grande diferencial em relação aos demais leites fermentados é que na produção de kefir os grãos inoculados são recuperados ao final do processo de fermentação (Guzel-Seydim et al., 2011).

A aplicação do método tradicional não é interessante do ponto de vista industrial, uma vez que a necessidade de recuperação dos grãos ao final do processo é laboriosa e pouco prática. Outro fator que dificulta sua utilização pela indústria é a diversidade da microbiota dos grãos de kefir, que gera fermentações lentas, irregulares e prejudica diretamente a padronização do produto final (Assadi et al., 2000; Nielsen et al., 2014; Nambou et al., 2014; Nejati et al., 2020).

Kim et al. (2018) utilizaram um método industrial baseado na utilização de pequeno volume do próprio kefir fermentado com os grãos como inóculo. Este método, denominado *backslopping*, tem por objetivo ampliar a produção de kefir em larga escala mantendo a microbiota original dos grãos de kefir. Chucrute, massa azeda e kumys são exemplos de alimentos que pouco se conhece a respeito da ecologia microbiana e que são produzidos através da aplicação de *backslopping*. Os autores observaram aumento de 50 vezes no rendimento da produção da bebida. Além disso, as características microbiológicas, nutricionais e físico-químicas (exceto contagens de *Lentilactobacillus kefir*, % de carboidrato e pH) foram semelhantes ao kefir produzido com os grãos. Entretanto, uma desvantagem apontada neste estudo e por outros autores é que o processo pode gerar alterações microbianas no produto final e algumas espécies-chave da fermentação podem ser perdidas ao longo do tempo, como *Lentilactobacillus kefir*, *Lactobacillus kefirianofaciens* e *Lentilactobacillus parakefir* (Simova et al., 2002; Nielsen et al., 2014). Segundo Garafolo et al. (2020), a microbiota dominante do

kefir preparado pelo método *backslopping* foi bastante semelhante a microbiota dos grãos de kefir, no entanto observaram uma redução na contagem de leveduras na bebida fermentada. Contudo, Kim et al., (2018) atribuíram alguns benefícios do ponto de vista comercial a esta diminuição de leveduras, devido a taxa reduzida de fermentação que prolonga a vida útil da bebida.

Outro método para produção industrial de kefir emprega culturas puras isoladas ou não de grãos de kefir. Beshkova et al. (2002) realizaram dois tipos distintos de fermentação. Na fermentação simultânea foi utilizado leite pasteurizado, homogeneizado e suplementado com 0,45% de sacarose, no qual foram inoculados, ao mesmo tempo, os seguintes isolados: *S. thermophilus* T15 e *L. bulgaricus* HP1 (2% m/v); *L. helveticus* MP12 (2% m/v); *L. lactis* C15 (1%) e *S. cerevisiae* A13 (0,5% m/v). Por outro lado, na fermentação sucessiva, o leite nas mesmas condições foi adicionado das culturas iniciadoras de iogurte (*S. thermophilus* T15 e *L. bulgaricus* HP1 a 2% m/v); *L. helveticus* MP12 (2% m/v) e *Lac. lactis* C15 (1% m/v). O leite inoculado foi incubado a ■ °C até pH 4,7. Após resfriamento do coágulo formado foi adicionado sacarose (0,45%) e a levedura *S. cerevisiae* A13 (0,5% m/v). A mistura foi agitada, envasada e incubada a 20 °C por mais 16 horas.

Independentemente do método empregado, os parâmetros microbiológicos, a composição química e sensorial (textura, aroma, sabor levemente ácido) podem ser afetados diretamente pela quantidade e concentração do inóculo adicionado ao substrato, pela aplicação de agitação, temperaturas de incubação, duração do resfriamento e maturação após o processo fermentativo (Farwnworth, 2005; Kazou et al., 2021). Desta maneira, diante das inúmeras variáveis que podem envolver o processo de produção de kefir, a bebida industrializada pode se tornar única.

1.4. Culturas iniciadoras (*starters*)

A utilização de culturas puras (isoladas ou não de grãos de kefir) como inóculo para produção de kefir já foi descrita por diversos autores (Assadi et al., 2000; Magalhães et al., 2011; Nambou et al., 2014; Gul et al., 2015; Sarlak et al., 2017). Neste sentido, as culturas puras funcionam como culturas iniciadoras (*starters*), que são microrganismos empregados pela indústria de alimentos para promover a fermentação de matérias-primas, permitindo não só a preservação e qualidade de alimentos perecíveis, mas sobretudo maior padronização e segurança da produção. O emprego destas culturas se tornou bastante usual no final do século

XIX, impulsionando a produção de cervejas, vinagre e pão (Hansen, 2002; Ammor; Mayo, 2007; O' Sullivan et al., 2019).

As bactérias ácido-láticas (BAL) são os microrganismos mais amplamente aplicados na produção de alimentos em todo mundo e representam a maior parte das culturas iniciadoras conhecidas. São estes microrganismos os responsáveis inicialmente pela conversão dos carboidratos em metabólitos desejáveis como álcool, ácido lático, ácido acético e dióxido de carbono. A produção destes compostos é importante, pois além de conservantes naturais são os responsáveis pelo aroma, sabor e textura dos produtos fermentados de modo geral (Hansen, 2002; Rattray; O'Connell, 2011). A maioria das empresas envolvidas na produção de culturas iniciadoras é fornecedora para laticínios. Nota-se aumento da demanda de culturas que sejam responsáveis não só pela produção de ácidos, mas que também desempenhem outras funções no produto. Sendo assim, as linhagens probióticas têm ganhado espaço no mercado, atraindo a atenção dos consumidores por promoverem saúde mediante consumo adequado destes produtos fermentados (Hasen, 2002; Ammor; Mayo, 2007; Nami et al., 2018). Vale ressaltar também que as leveduras são importantes iniciadores responsáveis pela produção de álcool e aumento de massas nos produtos de panificação (O' Sullivan et al., 2019).

As culturas iniciadoras de bactérias lácticas destinadas à produção de leites fermentados podem ser classificadas quanto à temperatura ótima de crescimento em: termofílicas (incubadas a 37- 45 °C) e mesofílicas (incubadas a 25 – 30 °C). As culturas termofílicas são empregadas na produção de iogurte, *buttermilk*, leite acidófilo ou leite cultivado e exemplos destes microrganismos são as espécies: *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei*. Já as culturas mesofílicas geralmente envolvem a presença de *Bac2* subsp. *cremoris*, além de espécies de *Leuconostoc* e são aplicadas na produção de kumys, viili e kefir (Surono; Hosono, 2011).

Diferentes tipos de culturas iniciadoras existem e são classificadas como: líquidas, congeladas, liofilizadas e secas ao ar ou por atomização em *spray dryer*, sendo as culturas congeladas e liofilizadas as mais amplamente usadas na indústria alimentícia (Parente et al., 2017). A aplicação de culturas líquidas, congeladas e liofilizadas pode apresentar algumas desvantagens por serem procedimentos que demandam tempo, pois muitas vezes é necessário realizar a propagação das culturas em meios de crescimento (mínimo três vezes) antes da incubação nos tanques de fermentação. Além disso, a aplicação exige habilidade de operadores para evitar contaminações e, para as culturas líquidas e congeladas, tem-se maior custo com

transporte (Do Carmo, 2006; Surono; Hosono, 2011). Cultivos sucessivos também podem favorecer o surgimento de linhagens mutantes ou mesmo levar a perda de certos plasmídeos funcionais (por exemplo, *Lac⁻* e *Prt⁻*), alterando assim as características do produto final. Desta maneira, as empresas geralmente mantêm estoques da cultura iniciadora para recorrer em caso de identificação de falhas no processo de produção (Surono; Hosono, 2011).

As culturas superconcentradas (10^{12} UFC/g) congeladas ou liofilizadas são comumente preferidas para fabricação de derivados lácteos, pois podem ser adicionadas diretamente nos tanques de fermentação devido à viabilidade e alta concentração de células. Além disso, tem como vantagem maior controle da contaminação por fagos, pois não requerem propagação na planta (Parente et al., 2017; O' Sullivan et al., 2019). São chamadas culturas DVI (*Direct Vat Inoculation*) ou DVS (*Direct Vat Set*). São obtidas a partir da centrifugação para concentração inicial das células microbianas, seguido do processo de desidratação, por meio da aplicação de técnicas como a liofilização ou *spray-drying* (Do Carmo, 2006; Surono; Hosono, 2011).

Ratray e O'Connell (2011) descreveram produção de kefir a partir da aplicação comercial de culturas iniciadoras (DVS). O emprego de culturas DVS na produção de kefir é mais vantajoso para industrialização, pois simplifica o processo de obtenção da bebida e, desde que os microrganismos sejam cuidadosamente selecionados, permite chegar a um produto final com qualidade e propriedades sensoriais aceitáveis. Não obstante, apesar de a diversidade microbiana ser normalmente inferior, a vida útil do produto é estendida (cerca de 28 dias), quando comparado à bebida adquirida artesanalmente com os grãos de kefir (3-12 dias) (Ratray; O'Connell, 2011).

Nos últimos anos, observou-se um aumento na demanda global de produção de culturas iniciadoras desidratadas, em função da maior estabilidade e flexibilidade de aplicações na indústria de alimentos, ração e farmacêutica (Huang et al., 2017). O uso de tecnologias baseadas nas diferentes metodologias de secagem vem sendo empregado há várias décadas na preservação de culturas microbianas de modo geral, pois são capazes de manter a viabilidade dos microrganismos durante longos períodos de armazenamento. Por exemplo, métodos como a liofilização e secagem em *spray dryer* têm sido preferidos para estabilização de culturas probióticas, pois proporcionam maior facilidade de estocagem, transporte, manuseio e aplicação destas culturas no desenvolvimento de alimentos funcionais. A liofilização é até então a tecnologia mais bem descrita e utilizada para secagem de culturas iniciadoras e potencialmente probióticas (Morgan et al., 2006; Meng et al., 2008; Fonseca et al., 2021; Obradović et al., 2022). No entanto, a tecnologia de secagem em *spray dryer* tem crescido como

alternativa ao congelamento e à liofilização por ser mais viável economicamente (Peighambardoust et al., 2011).

1.5. Métodos de preservação de microrganismos

1.5.1. Liofilização (*Freeze-drying*)

O princípio básico da liofilização consiste na mudança do estado físico da matéria, no qual se tem a conversão de água congelada diretamente para o estado de vapor por sublimação (Broeckx et al., 2016; Fellows, 2017). A técnica ocorre em três etapas: congelamento, secagem primária e secagem secundária sob vácuo com aplicação lenta de calor, de maneira a promover sublimação da água presente no material a ser desidratado (Morgan et al., 2006; Meng et al., 2008; Tripathi; Giri, 2014). A figura 1 ilustra o esquema de um liofilizador e o diagrama de fases da água.

As células microbianas em processos típicos de liofilização são submetidas ao congelamento a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, utilizando nitrogênio líquido, e em seguida são desidratadas por sublimação a vácuo por 12 a 16 horas, resultando em pós com menos de 1% de umidade (Bozoglu et al., 1987; Meng et al., 2008). O congelamento rápido pode minimizar os danos causados às células, devido principalmente a formação de cristais de gelo, capazes de provocar injúrias na membrana plasmática e parede celular, que levariam ao rompimento destas estruturas presentes nos microrganismos (Fowler; Toner, 2005; Broeckx et al., 2016). Assim como as demais tecnologias de desidratação, a liofilização também é influenciada por uma série de parâmetros, tais como linhagem microbiana utilizada (Morgan et al., 2006; Montel Mendonza et al., 2014; Abatemarco, 2016; Huang et al., 2017; Costa, 2019, Rishabh et al., 2021), fase de crescimento em que se encontra, concentração inicial antes do processo, agentes crioprotetores utilizados para minimizar os efeitos deletérios durante a fase de congelamento, reidratação e condições de armazenamento após a liofilização (Morgan et al., 2006; Meng et al., 2008; Kök Tas, 2014; Broeckx et al., 2016). Recomenda-se para este processo que as culturas de microrganismos estejam concentradas acima de 10^7 células/mL, visando garantir sobrevivência suficiente não só depois do processo, mas também durante longos períodos de estocagem, permitindo reconstituição e propagação satisfatória das linhagens liofilizadas (Bozoglu et al., 1987; Morgan et al., 2006).

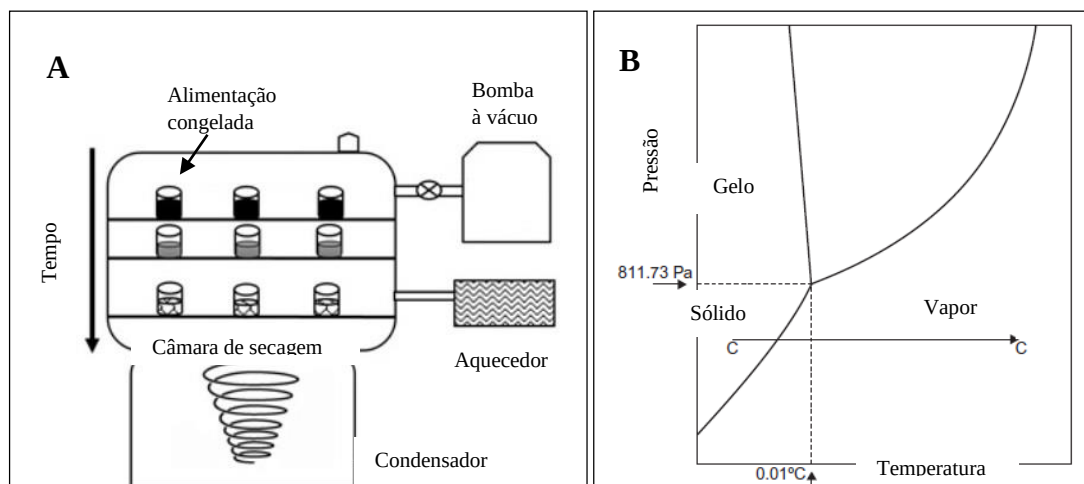


Figura 1 - Esquema de um liofilizador (A). Diagrama de fases da água, com destaque para sublimação, etapa que caracteriza o processo de liofilização (B). Adaptado de Broeckx et al. (2016) e Fellows (2017).

Além dos danos físicos devido à formação de cristais de gelo, a liofilização pode gerar danos relacionados ao estresse osmótico, uma vez que à medida que a água cristaliza, os solutos presentes na fração descongelada remanescente se concentram, levando a alterações osmóticas e químicas. Sabe-se que a água tem papel fundamental na integridade e estabilidade das células, portanto, a sua retirada causa danos consideráveis às proteínas de superfície, parede celular e membrana plasmática, que reflete na viabilidade celular quando amostras liofilizadas sofrem reidratação (Broeckx et al., 2016). Diversos crioprotetores podem ser adicionados durante a liofilização, visando minimizar os efeitos deletérios do processo aos microrganismos. São comumente utilizados leite em pó, proteínas de soro, trealose, glicerol, betaína, adonitol, sacarose, glicose, lactose, maltose e polímeros como dextrano e polietilenoglicol (Hubalek, 2003; Morgan et al., 2006; Meng et al., 2008; Broeckx et al., 2016). Entretanto, para Morgan et al. (2006) o tipo de crioprotetor depende diretamente do microrganismo, mas existem aqueles que parecem funcionar bem para uma gama de espécies. Na literatura já está bem documentado o papel protetor dos carboidratos em bactérias probióticas durante a liofilização. Dependendo da compatibilidade dos crioprotetores eles podem se acumular dentro das células e equilibrar a diferença osmótica entre os ambientes interno e externo, contornando o estresse osmótico causado pela liofilização (Meng et al., 2008).

Alguns trabalhos já investigaram os efeitos gerados pela aplicação da tecnologia de liofilização em culturas isoladas de grãos de kefir. Bolla et al. (2010) avaliaram os efeitos causados pela técnica na viabilidade e propriedades probióticas de uma mistura contendo bactérias lácticas e leveduras isoladas de grãos de kefir (*Lentilactobacillus kefir*,

Lactiplantibacillus plantarum, *Lactococcus lactis*, *S. cerevisiae* e *K. marxianus*) (MM). Além disso, o produto resultante da fermentação de leite por esta mistura também foi liofilizado (FMM) e, posteriormente verificou-se o efeito do armazenamento na viabilidade tanto dos microrganismos da mistura (MM), quanto do produto fermentado após liofilizado (FMM), ambos mantidos a 4 °C por 180 dias. Como resultado, a mistura microbiana liofilizada apresentou maiores taxas de sobrevivência para cada linhagem quando comparado ao produto fermentado liofilizado. Dessa forma, houve avanço ao obter uma mistura liofilizada com diferentes linhagens de bactérias e leveduras isoladas do kefir, com potencial aplicação industrial para adquirir um novo produto que possuísse as características da bebida artesanal fermentada.

1.5.2. *Spray drying*

A secagem em *spray dryer* se define como procedimento térmico (Atalar; Dervisoglu, 2014) contínuo em que um líquido de alimentação é aspergido sob a forma de pequenas gotículas (10-150 µm) no interior de um compartimento que recebe uma corrente de ar seco e aquecido (temperatura aproximadamente de 150 – 250 °C), promovendo assim a evaporação instantânea da água. O tempo de secagem e consequentemente de exposição do microrganismo às condições estressantes de temperatura é curto, o que permite manutenção de células viáveis após o processo (Boza et al., 2004; Peighambardoust et al., 2011). O processo se divide em quatro etapas. Inicialmente, a alimentação líquida sofre atomização em *spray* (1) que entra em contato com ar quente da câmara de secagem (2). Posteriormente, ocorre a secagem das gotículas e formação das partículas secas em uma temperatura mais baixa (3), sendo por fim separadas do ar de secagem (4). Partículas secas mais pesadas ficam retidas na base da câmara de secagem devido a força gravitacional e as mais finas são separadas por uso de ciclones ou filtros (Broeckx et al., 2016). O esquema apresentado na figura 2 ilustra o equipamento e as etapas do processo.

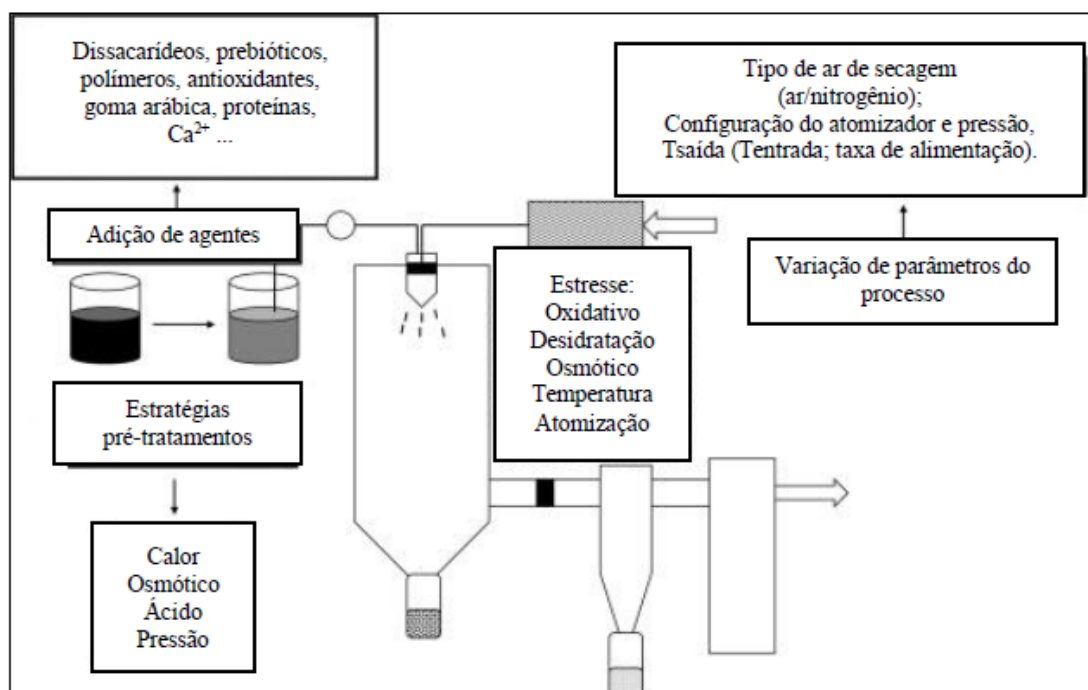


Figura 2 - Esquema de funcionamento, variáveis do processo, materiais carreadores e estratégias de pré-tratamento para aumentar a viabilidade após secagem em *spray dryer*. Adaptado de Broeckx et al., (2016).

O processo de secagem em *spray dryer* é um dos mais importantes empregados na indústria de alimentos, destinado à produção, por exemplo, de leite em pó, café solúvel, enzimas e proteínas, mas também pode ser aplicado em outros setores industriais, tal como na indústria farmacêutica (Peighambardoust et al., 2011; Huang et al., 2017). Os primeiros relatos da aplicação da técnica de secagem em *spray dryer* de microrganismos datam de 1914, com estudos de Rogers sobre a desidratação de culturas de bactérias ácido lácticas (Peighambardoust et al., 2011). A utilização de *spray drying* para produção de culturas iniciadoras e de probióticos secos tem sido destacada em diversos estudos publicados, que buscam avaliar os parâmetros para otimizar este processo (Meng et al., 2008; Schuck et al., 2013; Atalar et al., 2014; Ferreira et al., 2017; Rajam e Subramanian, 2022, Sharma et al., 2022).

Variáveis operacionais como teor de sólidos totais, número e tamanho das partículas, viscosidade do líquido de entrada, tipo e modo de funcionamento do atomizador, velocidade de secagem, temperatura do ar de entrada e saída influenciam diretamente as características do produto em pó final (Gava, 2008; Atalar; Dervisoglu, 2014). Além disso, fatores como concentração inicial de microrganismos, tolerância intrínseca da cultura, meios de crescimento, condições de indução ao estresse, uso de agentes de proteção, condições de reidratação, embalagens e condições de armazenamento refletem na taxa de sobrevivência microbiana após *spray drying* (Peighambardoust et al., 2011; Broeckx et al., 2016). Entretanto, a temperatura de

saída do *spray dryer* corresponde ao parâmetro que mais afeta a viabilidade dos microrganismos, sendo as maiores taxas de sobrevivência encontradas nas temperaturas de saída mais baixas, entre 60 - 70 °C (Boza et al., 2004; Meng et al., 2006; Atalar; Dervisoglu, 2014).

As espécies isoladas de grãos de kefir por Golowczyc et al., (2010), *Lentilactobacillus kefir* CIDCA 8348, *Lactiplantibacillus plantarum* CIDCA 83114 e *Saccharomyces lipolytica* CIDCA 812 foram avaliadas quanto à resistência a secagem em *spray dryer* e armazenamento prolongado, aplicando leite desnatado 11% como material carreador. Notou-se diferença entre as taxas de sobrevivência dos microrganismos, que dependeu da temperatura do ar de saída durante o processo. A linhagem *Lactiplantibacillus plantarum* apresentou os melhores resultados para sobrevivência após secagem em *spray dryer* e durante o armazenamento.

Durante a secagem em *spray dryer*, os microrganismos sofrem diversos tipos de estresse, como por exemplo estresse pelo calor devido exposição a altas temperaturas na câmara de secagem e simultaneamente o estresse pela desidratação, no qual tem-se a remoção das moléculas de água da célula, fator que limita seu metabolismo e reações químicas. Neste sentido, também podem ocorrer alterações de estruturas como da bicamada lipídica da membrana plasmática, levando à morte celular. Outro possível dano é causado pela tensão de cisalhamento durante a atomização da amostra na câmara de secagem (Broeckx et al., 2016). Há ainda danos causados pela exposição às espécies reativas de oxigênio (ROS) e o estresse osmótico que pode gerar danos em ácidos nucleicos, lipídios e proteínas (desnaturação e oxidação lipídica de componentes de membrana), culminando na morte celular (Meng et al., 2006; Santivarangkna et al., 2008; Broeckx et al., 2016). Visando contornar os problemas gerados pelo processo, podem ser adotadas estratégias como adição de materiais carreadores como glicose, frutose, sacarose, trealose, lactose, goma acácia, maltodextrina, dextrinas, goma arábica, assim como leite e soro de leite (Hubalek et al., 2003; Meng et al., 2006; Santivarangkna et al., 2006; Santivarangkna et al., 2008; Peighambardoust et al., 2011; Broeckx et al., 2016), testar os parâmetros ótimos do processo, bem como expor culturas às condições de estresse (pH ácido, temperaturas elevadas) antes da secagem (Meng et al., 2006; Broeckx et al., 2016).

2. JUSTIFICATIVA

O kefir produzido pelo método tradicional, por meio da inoculação dos grãos de kefir no leite é ainda um produto basicamente artesanal no Brasil. Em virtude da alta diversidade da microbiota presente nos grãos de kefir, a indústria de alimentos encontra entraves para produção industrial padronizada desta bebida fermentada. Desta maneira, métodos alternativos vêm surgindo com a finalidade de aperfeiçoar a produção de kefir, como por exemplo, os que utilizam culturas puras de microrganismos isolados ou não dos grãos de kefir. Estimativas apresentadas por Shabandeh et al. (2020), indicavam que em 2023 a produção global de kefir alcançará rendimento de 1,85 bilhões de dólares, sendo, portanto, bastante atrativo o mercado desta bebida para o setor de produtos lácteos.

Neste sentido, em trabalhos anteriores, algumas linhagens de bactérias lácticas e leveduras previamente isoladas de grãos de kefir circulantes no Brasil (Zanirati et al., 2012) foram submetidas ao processo de liofilização na presença de diferentes agentes crioprotetores e constatou-se comportamento linhagem-dependente das culturas ao processo de liofilização (Abatemarco, 2014; Costa, 2019). Ensaio anteriores também demonstraram que essas linhagens, em diferentes combinações, foram capazes de compor culturas iniciadoras que geraram bebidas fermentadas de leite com características físico-químicas e microbiológicas bem próximas às de kefir produzido de forma tradicional, com os grãos (Costa, 2019). No entanto, tendo em vista a possibilidade futura de delinear culturas iniciadoras que possam de fato serem utilizadas para produção de kefir de leite pela indústria de alimentos, ficou evidente que, para se conseguir atingir esse objetivo, era necessário avaliar e aprimorar parâmetros tecnológicos importantes. Dentre esses parâmetros destacam-se os métodos que permeiam o processo de desidratação das linhagens e aqueles envolvidos na geração da bebida fermentada com cultura iniciadora composta pelas linhagens desidratadas. Os experimentos propostos para esta tese de doutorado foram delineados com o objetivo de responder essas questões, de modo a se obter uma cultura iniciadora tecnológica e comercialmente atraente.

Um outro ponto não menos importante é que nos últimos anos houve aumento da demanda por produtos que ofereçam benefícios além dos nutricionais, em virtude principalmente da busca acentuada pela população por melhor saúde e qualidade de vida. Na literatura científica já têm sido relatados diversos benefícios relacionados ao consumo de kefir, desde que seja regularmente consumido. No entanto, a microbiota abundante e diversa do kefir, originária dos grãos utilizados no processo de produção tradicional das bebidas, tem levado a diferentes resultados no que se refere às suas propriedades benéficas. Isso é mais um fator que

estimula a polêmica sobre indicar ou não o consumo rotineiro da bebida e compromete a sua comercialização. Nesse contexto, este projeto se propôs a investigar eventuais características probióticas das linhagens que compõem a cultura iniciadora que se pretende oferecer ao mercado, bem como avaliar se a bebida fermentada produzida com essa cultura iniciadora era capaz de veicular uma linhagem probiótica, P1, mantendo sua viabilidade e função, sem alterar o padrão de identidade e as características sensoriais do produto, o que o tornaria ainda mais atraente em termos comerciais.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Obtenção de culturas iniciadoras para produção de kefir de leite, adicionadas ou não de linhagem probiótica.

3.2. Objetivos específicos

i. Avaliar a resistência à [REDACTED] [REDACTED] de linhagens de bactérias lácticas e levedura que constituem as culturas iniciadoras propostas neste estudo para produção de kefir de leite, utilizando os crioprotetores/material de parede.

ii. Acompanhar a viabilidade e o padrão de crescimento das linhagens desidratadas por cada um dos processos de desidratação, durante o armazenamento [REDACTED] [REDACTED] para determinação da melhor condição de conservação durante 6 meses;

iii. Determinar a capacidade de acidificação das culturas isoladas para definição do inóculo utilizado na elaboração de kefir de leite adicionado ou não de linhagem probiótica;

iv. Caracterização das bebidas fermentadas com as culturas iniciadoras pela determinação das características microbiológicas e físico-químicas, com culturas logo após a desidratação (T0) e ao final 6 meses de armazenamento;

iv. Avaliação sensorial das bebidas quanto a aceitação e intenção de compra, após 7 dias de armazenamento refrigerado;

v. Avaliar o potencial probiótico *in vitro* das linhagens Bac2 e Bac3, bem como a sobrevivência de camundongos Balb/C tratados isoladamente com cada uma destas linhagens em modelo de infecção murina por *S. Typhimurium*;

vi. Analisar o efeito da administração de kefir preparado com as culturas iniciadoras, acrescido ou não de linhagem probiótica, em modelo de infecção murina por *S. Typhimurium*.

4. METODOLOGIA

Os experimentos foram realizados em sua maioria nos laboratórios do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), sendo eles: Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos (LEFM), Laboratório de Genética Molecular de Protozoários Parasitas (LGMPP), Laboratório de Apoio do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Laboratório de Genética Celular e Molecular (LGCM). Por sua vez, as análises físico-químicas e sensorial foram conduzidas no Laboratório de Bromatologia e Laboratório de Análise Sensorial e Estudos com Consumidor (LASEC), da Faculdade de Farmácia (FAFAR), UFMG.

4.1. Microrganismos e condições de cultivo

Os microrganismos foram selecionados anteriormente nos trabalhos de Abatemarco (2014) e Costa (2019), a partir dos resultados do perfil de resistência à liofilização e ao armazenamento prolongado (180 dias). Estas linhagens foram isoladas de grãos de kefir de leite e de água de cinco cidades brasileiras. A identificação foi realizada conforme descrito em Zanirati (2012) através das técnicas de PCR ARDRA ou sequenciamento parcial do 16S rRNA, para as bactérias lácticas, e por PCR *fingerprinting*, no caso das leveduras. Também foi utilizada a linhagem potencialmente probiótica P1, isolada de um suíno saudável por Alvim et al. (2015) e identificada por PCR ARDRA 16S-23S e sequenciamento do gene 16S do rRNA. Suas propriedades probióticas foram avaliadas *in vitro* e *in vivo* em modelos animais distintos de infecção e inflamação (Alvim et al., 2015; Moura, 2018; Fonseca et al., 2019; Marchiori, 2020; Prado et al., 2020; Sandes et al., 2020).

Todas as culturas pertencem à coleção do laboratório LEFM e estão mantidas a [REDACTED] em caldo [REDACTED] para bactérias lácticas ou caldo [REDACTED] [REDACTED] para leveduras, acrescidos de [REDACTED]. Antes de cada experimento, realizaram-se [REDACTED] repiques [REDACTED] das bactérias lácticas em [REDACTED] [REDACTED]. A levedura foi [REDACTED] [REDACTED] As linhagens e suas respectivas origens de isolamento estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Linhagens de bactérias lácticas e leveduras utilizadas no estudo

Linhagem	Origem
<i>Bac1</i>	Kefir água Curitiba/PR
<i>Bac2</i>	Kefir de leite de Divinópolis/MG
<i>Bac3</i>	Kefir de leite de Viçosa/MG
<i>Lev1</i>	Kefir de leite de Curitiba/PR
P1	Cavidade nasal de suíno saudável

4.2. Avaliação do potencial biotecnológico dos microrganismos

4.2.1. Preparo das culturas para desidratação

Os caldos com cultivos após crescimento microbiano foram centrifugados (centrífuga Thermo Scientific – Heraeus Megafuge 8R) a [REDACTED] em seguida lavados [REDACTED] com [REDACTED]). O *pellet* de cada cultura foi concentrado, sendo ressuscitado nos seguintes crioprotetores: I, II e III. Antes do processo de liofilização ou secagem em *spray dryer*, alíquotas das suspensões microbianas foram diluídas serialmente em solução [REDACTED] e plaqueadas em ágar MRS, para bactérias lácticas, seguindo incubação a [REDACTED] °C por [REDACTED] horas. A levedura foi plaqueada em ágar YPG e incubada a [REDACTED] °C por [REDACTED] dias.

4.2.2. Secagem em *spray dryer*

O equipamento utilizado foi o *Spray dryer* modelo MSDi 1.0 (LabMaq, Brasil). Inicialmente realizou-se a desinfecção do equipamento com a passagem de 200 mL de etanol 70% e a normalização do sistema com a passagem de água destilada durante 15 minutos. Em seguida, as amostras de [REDACTED] de cada microrganismo foram ressuscitadas nos respectivos materiais carreadores testados, e submetidas ao processo de secagem por atomização. Os parâmetros para normalização e operação do equipamento foram baseados nos trabalhos de Chagas (2018) e Huang et al. (2017) com adaptações, sendo eles: [REDACTED]

[REDACTED] O pó gerado em cada processo foi coletado pelo ciclone separador e armazenado em [REDACTED], [REDACTED]. [REDACTED]. As amostras foram analisadas durante o armazenamento

refrigerado por 180 dias para determinação do número de células viáveis após o processo. Para cada material testado, preparam-se 6 embalagens. O experimento foi realizado em duplicata.

Amostras de microrganismos secas [REDACTED] foram pesadas e diluídas em solução salina [REDACTED] de modo a se obter a diluição [REDACTED].

4.2.3. Liofilização

A técnica de liofilização foi realizada segundo descrito por Li et al. (2011) e Bolla et al. (2011), com adaptações. Todos os microrganismos listados na Tabela 1 foram cultivados individualmente, segundo as condições de crescimento já mencionadas. [REDACTED] alíquotas de [REDACTED] de cada suspensão microbiana [REDACTED] foram distribuídas em tubos de [REDACTED], previamente esterilizados, e os conteúdos foram congelados [REDACTED]. Em seguida, as amostras foram distribuídas no liofilizador (modelo K10, Liotop, Brasil) onde permaneceram por [REDACTED] horas a [REDACTED] e [REDACTED] de pressão. Ao final do ciclo, as amostras secas foram acondicionadas em embalagens de filme metalizado multicamadas [REDACTED]. As amostras foram analisadas durante o armazenamento refrigerado por 6 meses, para determinação do número de células viáveis após o processo. O experimento foi realizado em duplicata.

4.2.4. Viabilidade celular

Imediatamente após a desidratação em *spray dryer* ou liofilização (T0), e em diferentes intervalos de tempo pré-estabelecidos (T90 e T180 dias), amostras das linhagens secas estocadas sob refrigeração foram escolhidas aleatoriamente para determinação dos microrganismos viáveis, utilizando os meios de culturas já descritos no tópico 4.1.

4.2.5. Padrão de crescimento *in vitro*

A fim de avaliar quanto a secagem por *spray dryer* e a liofilização afetaram o metabolismo dos microrganismos submetidos a esses processos em diferentes materiais carreadores e crioprotetores, determinou-se o padrão de crescimento *in vitro* após a desidratação (T0) e durante o armazenamento (T90 e T180 dias), de acordo com o método proposto por Martins et al. (2007), adaptado para microplacas. Inóculos de [REDACTED] foram preparados em caldo MRS a partir da cultura fresca de cada linhagem e a partir das culturas liofilizadas. Duzentos microlitros dos meios inoculados (em triplicata) foram distribuídos em microplaca, que foram incubadas a [REDACTED]°C em leitor ELISA (Microplate Spectrophotometer System SpectraMax 340 – Molecular Devices). O crescimento das culturas foi acompanhado pela

leitura de densidade ótica (DO) a 600 nm a cada 1 hora, durante 24 horas. A curva crescimento foi construída com base na média dos resultados obtidos de DO_{600nm}.

Para a levedura foram preparados inóculos de [REDACTED] em [REDACTED] de caldo [REDACTED], a partir da cultura fresca e das amostras desidratadas que permaneceram incubados em agitador de bancada (Cientec – CT-712) a [REDACTED]. Durante intervalos de tempos pré-definidos (0, 8, 24, 32 e 48 horas) volumes de 200 µL das amostras (em triplicata) foram distribuídos em microplaca e realizadas leituras pontuais de densidade ótica (DO_{600nm}) em leitor ELISA (Microplate Spectrophotometer System SpectraMax 340 – Molecular Devices) (Martins et al., 2007 adaptado). Estes ensaios foram feitos em duplicata.

4.3. Composição das culturas iniciadoras

A combinação de microrganismos para produção de kefir foi selecionada por Costa (2019), baseado nos resultados de caracterização microbiológica (contagem total de bactérias lácticas e leveduras) e físico-química (pH e dosagens de ácido lático, ácido acético e etanol) de bebidas preparadas com diferentes combinações de bactérias lácticas e leveduras isoladas de grãos de kefir. A cultura iniciadora C1 produziu uma bebida fermentada com características mais próximas da preparada com os grãos de kefir de Curitiba (KLCU), utilizado como controle. C2 foi a proposta de cultura iniciadora com a substituição de Bac1 por P1, linhagem com características probióticas e C3 foi resultado da modificação necessária na formulação em que foi mantida a combinação C1 durante a fermentação e adicionada a linhagem probiótica, P1. Na Tabela 2, seguem apresentadas as culturas iniciadoras.

4.4. Capacidade de acidificação das linhagens e das culturas iniciadoras

Avaliou-se a capacidade de acidificação tanto das linhagens isoladas adicionadas ao leite, quanto as culturas iniciadoras de kefir, ambas liofilizadas e adicionadas ao leite previamente esterilizado, seguindo-se incubação a [REDACTED] °C. Foram feitas medidas do pH em intervalos de 2 horas, durante 24 horas ou até ser atingido pH valor próximo a 4,5 - 4,6 (Guzel-Seydim et al., 2005; Hikmetoglu et al., 2020). O ensaio foi realizado em duplicata.

Tabela 2 - Culturas iniciadoras, composição microbiana e suas principais diferenças

Cultura iniciadora	Composição	Principais diferenças entre as culturas iniciadoras
C1	Bac1; Bac2; Bac3; Lev1	Ausência de linhagem probiótica na formulação
C2	P1; Bac2; Bac3; Lev1	Substituição de Bac1 pela linhagem probiótica P1
C3	Bac1; Bac2; Bac3; Lev1; P1	Manutenção da cultura C1 para fermentação e adição de P1

4.5. Elaboração de kefir de leite com culturas iniciadoras: definição de inóculo e condições de fermentação

A partir dos dados obtidos ao final de 180 dias de armazenamento, selecionou-se o crioprotetor que permitiu maior viabilidade e menor fase lag (adaptação) para as linhagens de bactérias lácticas e levedura, destinadas a produção de kefir de leite. Imediatamente após a liofilização, as culturas foram ressuspensas em [REDACTED] e inoculadas em diferentes proporções em [REDACTED], visando assim a padronização do inóculo. As porcentagens de inóculo testadas foram: Z, Y e X. A incubação foi em estufa a [REDACTED] °C, até pH [REDACTED]. A contagem de bactérias ácido lácticas totais e leveduras, bem como o valor do pH das bebidas foram acompanhados durante armazenamento refrigerado. Para a bebida C3 foi adicionada a linhagem probiótica ao final do processo de fermentação, na proporção de [REDACTED] de P1. Como bebida controle, foi utilizado o kefir de leite preparado com grãos de kefir provenientes da cidade de Curitiba/Paraná, sendo o inóculo empregado de Z.

4.6. Caracterização do kefir produzido com culturas iniciadoras

As bebidas produzidas com as culturas iniciadoras, recém desidratadas (T0) e após 180 dias de armazenamento (T180), foram recolhidas assepticamente para avaliação dos parâmetros microbiológicos e físico-químicos nos intervalos de tempo de 13 horas e 24 horas de fermentação, 7, 14 e 28 dias de armazenamento refrigerado. O controle preparado com os grãos (KLCU) também foi submetido a tais análises.

4.6.1. Análises Microbiológicas

- Contagem de bactérias lácticas totais e leveduras

As amostras de bebidas foram diluídas em solução salina 0,85% e plaqueadas as diluições 10^{-2} a 10^{-6} em ágar MRS suplementado com cicloheximida (100 mg/L), para contagem de BAL totais, e 10^{-1} a 10^{-5} em ágar YPG suplementado com cloranfenicol (100mg/L), para contagem de leveduras. Logo após, as placas foram incubadas em estufa a ■ °C por 48-72 horas (Carneiro, 2010; Carvalho, 2011; Villanoeva et al., 2021).

- Quantificação da linhagem probiótica P1 por qPCR

O DNA genômico foi extraído tanto das bactérias ácido lácticas e leveduras que compõem a cultura iniciadora C3 individualmente, quanto da bebida fermentada preparada com esta culturas e adicionada da linhagem P1, nos seguintes tempos: 13 e 24 horas de fermentação, 7, 14 e 28 dias de armazenamento refrigerado. A extração do DNA dos microrganismos individualmente foi realizada segundo protocolo de Doyle e Doyle, (1987) com adaptações. De maneira resumida, 5 mL de cultura microbiana crescida foi centrifugada a 12.000 rpm (Thermo Scientific – Heraeus Megafuge 8R) por 2 minutos para separação do sobrenadante. O *pellet* resultante foi ressuspensionado em tampão de lise (20% de sacarose; 0,01M Na_2HPO_4 ; lisozima 0,1g/mL; pH ajustado para 7) e incubado por 1 hora a 37 °C para promoção da lise celular. Em seguida, foram adicionados: a enzima proteinase K (20 mg/mL), tampão Tris-EDTA (10 mM de Tris-HCl; 1mM de EDTA) e dodecilsulfato de sódio (SDS) 10 %, sendo a mistura também incubada a 37 °C por 1 hora. Após o término da incubação, o tampão CTAB (brometo de hexadeciltrimetilamônio 2%; NaCl 0,7M) foi adicionado e a amostra incubada por 10 minutos a 65 °C. A separação do material genético foi realizada com solução de clorofórmio/álcool isoamílico 24:1, seguindo de precipitação do DNA em isopropanol 100% a – 20 °C por 20 minutos. O *pellet* de DNA formado após centrifugação foi, finalmente, ressuspensionado em água ultrapura.

Para as bebidas também foi utilizado o protocolo de Doyle e Doyle (1987) com outras modificações. Um mililitro do kefir de leite (C3) foi centrifugado por 12.000 rpm (Thermo Scientific – Heraeus Megafuge 8R) por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e os *pellets* ressuspensionados em 1 mL de solução de citrato trissódico 2% m/v, sendo novamente centrifugado para retirada do sobrenadante (Leite et al., 2013; Villanoeva et al., 2021). Aos *pellets* resultantes foram adicionados tampão de lise e 0,3g de *beads* de zircônio e as amostras foram colocadas em Vortex-Gene 2 (Scientific Industries) por 3 minutos, para auxiliar na lise

celular. As demais etapas do protocolo foram seguidas da mesma maneira como descrito anteriormente.

A avaliação do DNA com relação a qualidade e concentração foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% e quantificação usando NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) e Qubit (dsDNA HS Assay, Invitrogen). Foi desenhado iniciador específico para linhagem de *P1* usando o programa (Fur – Haubold et al., 2021), onde foram comparados cinco genomas completos depositados no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), sendo um destes de referência. Foi determinada a região similar entre as sequências e, posteriormente, as regiões similares na espécie foram comparadas com cinco sequências completas de cada um dos microrganismos que compõem a cultura iniciadora C3, separando assim sequências exclusivas dessas espécies. A partir da sequência restante, foram desenhados iniciadores usando o programa Primer 3 (Untergasser et al., 2012) e estes foram checados de acordo com o *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) usando como *database* a biblioteca nr do NCBI, a fim de avaliar a especificidade, sensibilidade e a saber se são alvos para amplificar cópias únicas no genoma. Por fim, com os iniciadores gerados foi realizada PCR convencional a fim de verificar a especificidade para cada um dos microrganismos presentes nas bebidas fermentadas.

A quantificação de P1 na bebida C3 foi baseada na metodologia proposta por Kim et al. (2020) que, por qPCR (QuantStudio System 1, ThermoFisher Scientific), avalia a quantidade de um microrganismo através de curva padrão de uma quantidade de DNA específica. Para tal, foi realizada a qPCR com volume final de 10 µL de mistura de reação, contendo 5 µL de iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-rad), 3,6 µL de água ultrapura (Sigma), 1 µL de DNA genômico (50 ng) e 0,2 µL (500 nM) de cada iniciador. Os iniciadores utilizados foram Holin Fw (5' AGTGGTGAACAAGCCAGACA 3') e Holin Rv (5' CCAGCACCATTTGAGGCGTT 3'). O programa da qPCR foi 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos, 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto, seguido de produção da curva de *melting* a 0,15 °C/s até 95 °C. A curva padrão foi determinada a partir da diluição em série do gDNA extraído da cultura, variando de $\sim 10^4$ a $\sim 10^8$ cópias/µL. Os valores de *Cycle Threshold* (CT) das amostras da bebida nos diferentes tempos foram interpolados em um modelo de regressão linear e a curva padrão plotada a partir dos valores de CT em função do número de cópias do gene alvo/µL via qPCR. Cada curva padrão foi derivada dos dados de qPCR em triplicata e a eficiência (E) calculada pela fórmula:

$$E(\%) = \left(-1 + 10^{\left(\frac{-1}{b} \right)} \right) \times 100$$

onde b é a inclinação do ajuste linear (*slope*) (Conte et al., 2018; Kim et al. 2020). A curva padrão utilizada para determinação da quantidade de P1 presente nas amostras segue apresentada no Apêndice A. Os valores resultantes foram ajustados considerando as diluições realizadas para padronização da quantidade em nanogramas (ng) de DNA genômico (gDNA), para realização da qPCR, bem como a quantidade em microlitros (uL) que foram ressuspensos no volume total extraído de gDNA.

4.6.2. Análises físico-químicas

As análises físico-químicas incluíram a avaliação do pH, composição centesimal (umidade, cinzas, proteínas e lipídeos) e determinação dos compostos orgânicos (ácido láctico, ácido acético, lactose, galactose e etanol), todas estas realizadas em duplicata.

- **pH:** A leitura do pH foi em potenciômetro modelo B-474 (Micronal), à temperatura ambiente. As medições foram realizadas em duplicata.

- **Composição centesimal:** Para composição centesimal foram seguidas as metodologias sugeridas no Manual de Métodos Oficiais para Análise de Alimentos de Origem Animal (2022), sendo elas: extrato seco total e resíduo mineral fixo (métodos gravimétricos), proteínas por micro-Kjeldahl e conteúdo de lipídeos por Roese-Gottlieb. As análises foram realizadas em duplicata.

- **Determinação dos compostos orgânicos:** Alíquotas de 1 mL das bebidas nos diferentes intervalos de tempos foram centrifugadas (Thermo Scientific – Heraeus Megafuge 8R) a 2000 x g, durante 15 minutos, à 4 °C. O sobrenadante foi coletado, filtrado com filtro de seringa membrana 0,22 µm, para análise em cromatógrafo Shimadzu (Shimadzu, Japão) dos compostos orgânicos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). As condições para as corridas cromatográficas foram: coluna Supelco Analytica C-610H 6% Crosslinked 30 cm x 7,8 mm (Sigma-Aldrich) mantida à temperatura de 45 °C; volume de injeção de 10 µL; detecção por índice de refração modelo RID 10-A; fase móvel isocrática H₂SO₄ 0,01N e fluxo de 0,6 mL/min. (Moura, 2015; Leite et al., 2013). Os cromatogramas e a quantificação dos compostos foram obtidos usando o *software* LC Soluton (Shimadzu Corp.). Curvas padrão foram construídas com base na área dos picos calculados para cada um dos compostos orgânicos em uma ampla faixa de concentrações, de forma a obter valor do coeficiente de determinação da regressão (r^2) o mais próximo de 1 (exemplo no Apêndice B). As equações geradas

possibilitaram identificar e quantificar a presença ou não dos compostos orgânicos nas bebidas. As dosagens foram realizadas em duplicata.

4.6.3. Análise sensorial

A avaliação sensorial foi realizada através da aplicação dos testes de aceitação e intenção de compra. O público-alvo foi composto por avaliadores não treinados, maiores de idade (discentes, docentes e funcionários da UFMG), com interesse ou hábito de consumir leites fermentados, assim como realizado por Larosa et al. (2021) e Wang et al. (2017). As bebidas foram preparadas conforme descrito no item 4.5 e avaliadas por análises microbiológicas para assegurar o controle de qualidade, assim como exigido pela legislação brasileira, RDC 724, IN nº 161 (Brasil, 2022) e pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados (RTIQ) (Brasil, 2007). A inocuidade das bebidas foi verificada antes da realização da análise sensorial, através de pesquisas de detecção de *Salmonella*/25 mL; *E. coli*/mL, bolores e leveduras/mL.

Cada amostra de kefir, incluída amostra controle KLCU, recebeu um código com sequências aleatórias de três dígitos e foi servida em cabines individuais aos avaliadores, em copos plásticos com porções de aproximadamente 30 mL, a temperatura não superior a 10 °C. A avaliação abrangeu os atributos aroma, sabor, cor, textura e impressão global. Os avaliadores receberam fichas contendo escala hedônica de cinco pontos para avaliação da aceitação das amostras de acordo com os seguintes critérios: 1 - Desgostei muito, 2 - Não gostei, 3 - Não gostei nem desgostei, 4 – Gostei e 5 - Gostei muito. Foi também solicitada a avaliação quanto à intenção de compra, indicando se o produto estivesse à venda, qual seria o comportamento do provador. As fichas para avaliação das amostras, questionário entregue aos avaliadores e o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) seguem apresentados no Apêndice C.

Estas análises foram submetidas e aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Humanos da UFMG, sob o número de protocolo: CAAE - 30181420.8.0000.5149 (Apêndice D).

4.7. Avaliação do efeito da administração oral de kefir preparado com culturas iniciadoras sobre a sobrevivência de camundongos em modelo de infecção por *S. Typhimurium*

Foram utilizados camundongos Balb/C, fêmeas, com 3-4 semanas de idade fornecidos pelo Biotério Central Animal/UFMG. Os animais foram alojados em micro-isoladores (Alesco, Monte Mor, SP, Brasil), mantidos em gabinete ventilado (Alesco), com controle de iluminação

(12 h de luz, 12 h de escuro), umidade (60 - 80%) e temperatura (22 ± 5 °C) e receberam água e dieta comercial (Nuvital, Curitiba, Brasil) *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as normas preconizadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 2006) após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA/UFMG), protocolos números 257/2016 e 281/2022 (Apêndice E).

O kefir foi preparado semanalmente, seguindo a metodologia descrita no item 4.5, utilizando como inóculo Z de cultura iniciadora (grupos experimentais) e grãos de kefir KLCU (grupo controle de kefir). As bebidas fermentadas foram armazenadas sob refrigeração e acompanhadas ao longo de 7 dias para verificação da concentração de bactérias lácticas totais e levedura nas amostras administradas aos animais. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sor. Typhimurium (ATCC 14028) foi utilizada na infecção dos animais no modelo de febre tifoide. Foram feitos dois repiques sucessivos do microrganismo em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) (Acumedia) e incubado em aerobiose por 24 horas a 37 °C.

Os animais foram divididos em quatro grupos (10 animais/cada) que receberam diariamente por via intragástrica: (a) 100 µL de solução salina 0,85% m/v, (b) 100 µL de kefir preparado com a cultura iniciadora C1, (c) 100 µL de kefir preparado com a cultura iniciadora C2 e (d) 100 µL de kefir preparado com os grãos de kefir KLCU. Após o 10º dia de tratamento, todos os animais foram desafiados por intubação intragástrica com 100 µL contendo 10^6 UFC/mL da bactéria alvo *S. Typhimurium* (ATCC 14028). O tratamento diário com as bebidas fermentadas ou solução salina (grupo controle) continuaram até o final do experimento. A sobrevivência e o desenvolvimento ponderal dos animais foram observados até o 28º dia pós-infecção (Abatemarco et al., 2018).

4.8.Avaliação do potencial probiótico das linhagens Bac2 e Bac3

4.8.1. Ensaios *in vitro*

i. Avaliação do crescimento a 37 °C

As linhagens Bac2 e Bac3 foram inoculadas em caldo MRS e incubadas a 37 °C (temperatura corporal humana), para avaliação da capacidade de crescimento nesta temperatura. O experimento foi realizado em duplicata.

ii. Sensibilidade ao suco gástrico artificial

Avaliou-se a resistência ao suco gástrico simulado segundo Silva et al. (2013). Os microrganismos foram distribuídos 1,5 mL em dois microtubos e centrifugados a 1400 x g (Thermo Scientific Centrifuga Heraeus Megafuge 8R), por 5 minutos para lavagem das células com solução salina 0,85%. O procedimento foi repetido por duas vezes. Ao precipitado de cada tubo foi adicionada solução salina 0,85% com pH 7,0 (tubo controle) ou suco gástrico simulado (NaCl 2 g/L, pepsina 3,2 g/L, pH 2,5). Os microtubos foram incubados a 37 °C por 2 horas e, posteriormente, centrifugados nas mesmas condições anteriores. O precipitado foi ressuspenso em caldo MRS. A fim de avaliar a viabilidade das células, foram aplicados 200 µL/poço dos inóculos do controle e das amostras tratadas com suco gástrico artificial (em triplicata) em microplaca, incubada em um leitor ELISA (Microplate Spectrophotometer System SpectraMax 340 – Molecular Devices) a 37 °C. A absorbância do cultivo foi determinada pela leitura de DO_{600nm} a cada 30 minutos, durante 24 horas e a porcentagem de inibição de crescimento foi calculada pela fórmula $(CT-SG/CT) \times 100$, sendo que SG e CT correspondem à área sob a curva de crescimento das bactérias tratadas com suco gástrico artificial e do controle, respectivamente. As linhagens foram classificadas como: sensíveis (% inibição > 60%), tolerantes ($60\% \geq \% \text{ inibição} \geq 40\%$) ou resistentes (% inibição < 40%). O ensaio foi realizado em duplicata.

iii. Sensibilidade aos sais biliares

Um mililitro de cada microrganismo foi retirado e adicionado à 10 mL de solução salina 0,85%. Volumes de 10 µL foram adicionados em placas de Petri contendo ágar MRS suplementado com diferentes concentrações de sais biliares de 0,15; 0,30; 0,60 e 1,0 % de sais biliares (Oxgall, Difco, Sparks, E.U.A.) e em seguida foram incubadas a 37 °C até 72 horas. Ao final, a resistência foi avaliada utilizando como escala de classificação a variação de 0 (ausência de crescimento) até 3 (crescimento intenso), conforme descrito por Martins et al. (2005). O ensaio foi realizado em duplicata.

O protocolo de Silva et al. (2013) para avaliar a resistência aos sais biliares também foi executado. Foram preparados inóculos a 2% v/v em caldo MRS puro (controle) ou MRS suplementado com 0,15; 0,30; 0,60 e 1,0 % de sais biliares. A fim de avaliar a viabilidade das células, 200 µL/poço dos inóculos do controle e das amostras desafiadas com sais biliares foram distribuídos (em triplicata) em microplaca que foi incubada em leitor ELISA (Microplate Spectrophotometer System SpectraMax 340 – Molecular Devices) a 37 °C. A absorbância do

cultivo foi determinada pela leitura de DO_{600nm} a cada 30 minutos, durante 18 horas, e a porcentagem de inibição de crescimento foi calculada pela fórmula $(CT-SB/CT) \times 100$, sendo que SB e CT correspondem à área sob as curvas de crescimento das bactérias na presença das diferentes concentrações de sais biliares e do controle, respectivamente. As linhagens foram classificadas como sensíveis ($\% \text{ inibição} > 60\%$), tolerantes ($60\% \geq \% \text{ inibição} \geq 40\%$) e resistentes ($\% \text{ inibição} < 40\%$). O ensaio foi realizado em duplicata.

iv. Hidrofobicidade da superfície celular

As linhagens foram caracterizadas quanto à hidrofobicidade através da determinação do MATS (*Microbial Adhesion to Solvents*) (Kos et al., 2003). Ambas foram centrifugadas, lavadas duas vezes com PBS (solução salina, pH=7,4) e a turbidez foi ajustada para uma DO_{490nm} de 0,6-0,9 com PBS (A0). Um volume de 0,6 mL de xileno (solvente apolar) foi adicionado a 3,6 mL da suspensão microbiana e após 10 minutos de pré-incubação à temperatura ambiente, as duas fases do sistema foram homogeneizadas por 2 minutos em agitador (SI-0236 Vortex-Genie 2 Mixer, Scientific Industries). A fase aquosa foi removida após 50 minutos de repouso e sua DO_{530nm} foi medida (A1). A porcentagem de MATS foi calculada segundo a fórmula $(A0 - A1 / A0) \times 100$. Bactérias lácticas com resultados de $\% \text{ MATS} > 66\%$ foram classificadas como hidrofóbicas; $\% \text{ MATS}$ entre 33% e 66%, classificadas como moderadamente hidrofóbicas e $\% \text{ MATS} < 33\%$, classificadas como hidrofílicas (Vinderola et al., 2003). O experimento foi realizado em duplicata.

v. Avaliação da capacidade hemolítica e produção de exopolissacarídeos (EPS)

A metodologia descrita por Fadda et al. (2017) foi utilizada para determinação da atividade hemolítica. As linhagens foram estriadas em placas de ágar MRS adicionado de 5% v/v de sangue de carneiro desfibrinado. Em seguida foram incubadas até 48 horas a 37 °C. Utilizou-se como controle positivo para β -hemólise uma linhagem de *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615). O desenvolvimento de uma zona clara de hidrólise em torno das colônias foi considerado como resultado positivo. O experimento foi realizado em duplicata.

A verificação de produção de EPS foi observada através do crescimento dos microrganismos estriados em três diferentes meios de cultura: ágar MRS, MRS modificado por [REDACTED]. As placas foram incubadas em aerobiose a [REDACTED] °C por 48 horas. Foram considerados produtores de EPS as linhagens que apresentaram colônias viscosas nos meios acrescidos dos açúcares [REDACTED] [REDACTED] (Paiva et al., 2013).

vi. Potencial de auto-agregação

Dez mililitros de cada linhagem após crescimento em caldo MRS foram centrifugados a 1400 x g (Thermo Scientific Centrifuga Heraeus Megafuge 8R) por 10 minutos, lavados duas vezes com solução salina 0,85%. Em seguida foram agitados por 2 minutos em vórtex. Uma alíquota foi utilizada para a leitura da absorbância inicial a 490 nm e, em seguida, as amostras permaneceram em repouso por 3 horas. Após esse período, 100 µL de suspensão da porção superior do tubo foram retirados para a leitura da absorbância final a 490 nm.

Os resultados foram obtidos através da fórmula: $1 - (AT/A0) \times 100$, na qual AT corresponde a absorbância no tempo 3 horas e A0, a absorbância no tempo 0 (Vinderola et al., 2003).

vii. Potencial de co-agregação com patógenos

Os experimentos de co-agregação foram realizados com as seguintes bactérias patogênicas: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar. Typhimurium (ATCC 14028), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25853), *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 292130). Os patógenos pertencem à coleção de culturas do LEFM e estão conservados em criotubos contendo caldo BHI (Acumedia) acrescido de 20% glicerol (80% v/v), mantidos em freezer -80 °C. Antes de cada experimento, os patógenos foram ativados no mínimo duas vezes em caldo BHI e incubados em aerobiose por 24 horas a 37 °C.

Bactérias láticas e patógenos foram ativados em [REDACTED], respectivamente. Em seguida, foram centrifugados a [REDACTED] (Thermo Scientific Centrifuga Heraeus Megafuge 8R) por [REDACTED] minutos, lavadas 2 vezes com solução salina 0,85% e homogeneizadas em 10 mL desta mesma solução. Para os tubos controle, 2 mL de cada suspensão de bactérias láticas e 2 mL de suspensão de cada patógeno foram retirados e agitados por 2 minutos antes da leitura da absorbância a 490 nm. Nos demais tubos, 1 mL de cada linhagem (Bac2 e Bac3) foi misturado com 1 mL de cada patógeno, sendo agitados por 2 minutos antes da leitura da absorbância a 490 nm. Após 3 horas de manutenção das amostras em repouso, 100 µL de suspensão da porção superior de cada tubo foram retirados para leitura da absorbância a 490 nm. O experimento foi realizado em duplicata.

Os resultados foram obtidos através da fórmula, sendo AX a absorbância do tubo controle das bactérias láticas e AY o controle do patógeno, enquanto (X+Y) correspondeu à absorbância do tubo contendo a mistura (BAL + PAT):

$$\% \text{ Co-agregação} = \{[(AX + AY)/2 - A(X + Y)] / (AX + AY)/ 2\} \times 100$$

(Vinderola et al., 2003).

viii. Teste de antagonismo “*in vitro*” contra bactérias patogênicas

O teste *in vitro* para verificar a produção de substâncias inibitórias difusíveis foi realizado pelo método de difusão em camada dupla, adaptado de Nardi et al. (1999) e Silva et al. (2001), em duplicata. Foram utilizados os mesmos patógenos do ensaio de co-agregação. Cinco microlitros de cada cultura de bactéria láctica (10^{8-9} UFC/mL) foram inoculados no centro de uma placa contendo ágar MRS, seguindo-se incubação a 37 °C por 24-48 horas para o crescimento do microrganismo. Para interromper a multiplicação microbiana, a cultura foi exposta ao vapor de clorofórmio por 30 minutos. Em seguida, as placas foram abertas pelo mesmo tempo para evaporação do solvente residual. Uma sobrecamada de 4 mL de ágar BHI semi-sólido inoculado com 10µL de uma cultura bacteriana patogênica reveladora (10^{8-9} UFC/mL) foi espalhada sobre o ágar MRS. As placas foram incubadas a 37 °C por 24-48 horas e o diâmetro dos halos de inibição foram medidos com paquímetro digital (Mitutoyo, Japão). As amostras foram consideradas produtoras de substâncias antagonistas quando havia halo de inibição de crescimento da bactéria reveladora, independentemente do tamanho.

4.8.2. Ensaios *in vivo* - Avaliação do efeito da administração oral das linhagens Bac2 e Bac3 sobre a sobrevivência de camundongos em modelo de infecção por *S. Typhimurium*

Foram utilizados camundongos Balb/C, fêmeas, de 3-4 semanas de idade, fornecidos pelo Biotério CEBIO/ UFMG. Todas as condições experimentais seguidas já foram as descritas no item 4.7, com aprovação pelo protocolo CEUA 257/2016 (Apêndice E).

Os animais foram distribuídos em cinco grupos (10 animais/cada) que receberam diariamente por via intragástrica: (i) 100 µL de solução salina 0,85% m/v; (ii) (iii) o mesmo volume contendo 10^{8-9} UFC/mL das linhagens Bac2 ou Bac3, respectivamente, e não foram desafiados com o patógeno; (iv) e (v) o mesmo volume contendo 10^{8-9} UFC/mL da linhagem Bac2 ou Bac3, respectivamente, e foram desafiados com o patógeno. Após o 10º dia de tratamento, os animais dos grupos (i), (iv) e (v) foram desafiados por intubação intragástrica com 100 µL contendo 10^6 UFC/mL da bactéria alvo *S. Typhimurium* (ATCC 14028). O tratamento diário com as linhagens de bactérias lácticas ou solução salina (grupo controle) continuaram até o final do experimento. A sobrevivência e o desenvolvimento ponderal dos animais foram observados até o 28º dia pós-infecção.

4.9. Análises estatísticas

Os resultados foram analisados com o programa GraphPad Prism Versão 8.3.0 (GraphPad software Inc., San Diego, CA, EUA), sendo considerados como diferença estatística os valores com nível de significância inferior a 5%. As variáveis paramétricas foram submetidas à análise de variância (ANOVA) seguida pelo pós-teste Tukey. O teste Log-Rank (Mantel-Cox) foi aplicado para comparação das curvas de sobrevivência dos experimentos com animais, tratados ou não com cada linhagem de BAL, desafiados com *S. Typhimurium* e tratados ou não com kefir (preparado com as culturas iniciadoras ou grãos de kefir), desafiados com *S. Typhimurium*. Já os dados coletados na análise sensorial foram avaliados no programa *SensoMaker* (UFLA) considerando o nível de significância de 0,01% (Pinheiro; Nunes; Vietores, 2013).

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação da resistência das linhagens ao processo de secagem em *spray dryer*

5.1.1. Viabilidade

O número de células viáveis antes da secagem em *spray dryer* (T'), logo após o processo (T0) e ao final de 90 e 180 dias de armazenamento refrigerado (T90 e T180) está apresentado na tabela 3 e na Figura 3. Logo após o preparo das amostras, o número de células viáveis de bactérias lácticas e leveduras ficou acima de 9,5 e 8,5 log UFC/mL, respectivamente. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os materiais utilizados como carreadores, independentemente da linhagem submetida ao processamento por *spray dryer* (Tabela 3).

Como observado na figura 3A, após a secagem (T0) e durante período de armazenamento (T90 e T180 dias) foi identificada diferença estatística significativa ($p = 0,0211$) em relação aos materiais aplicados como carreadores somente para a linhagem Bac2 após 6 meses de armazenamento refrigerado, sendo a menor contagem identificada para mistura de III ($8,86 \pm 0,01$ log UFC/g), utilizada como material de parede. Para os demais microrganismos nas condições avaliadas, não foi identificada diferença significativa ($p > 0,05$).

Desta maneira, considerando os resultados obtidos, I ou II parecem ser os melhores materiais de parede considerando os microrganismos e armazenamento em embalagens plásticas de filme metalizado, avaliados para secagem em *spray dryer*.

Tabela 3 - Média ($\pm$ SD) do número de células viáveis (log UFC/mL) antes do processo de *spray dryer* (T'), (n=2).

Tempo	T' (UFC/mL)		
Linhagens	I	II	III
Bac2	$10,03 \pm 0,05$	$9,69 \pm 0,55$	$9,84 \pm 0,03$
Bac3	$9,51 \pm 0,47$	$9,68 \pm 0,22$	$9,57 \pm 0,07$
Bac1	$9,63 \pm 0,10$	$9,89 \pm 0,40$	$9,83 \pm 0,07$
P1	$10,01 \pm 0,14$	$10,12 \pm 0,08$	$9,93 \pm 0,05$
Lev1	$8,57 \pm 0,06$	$8,68 \pm 0,06$	$8,54 \pm 0,01$

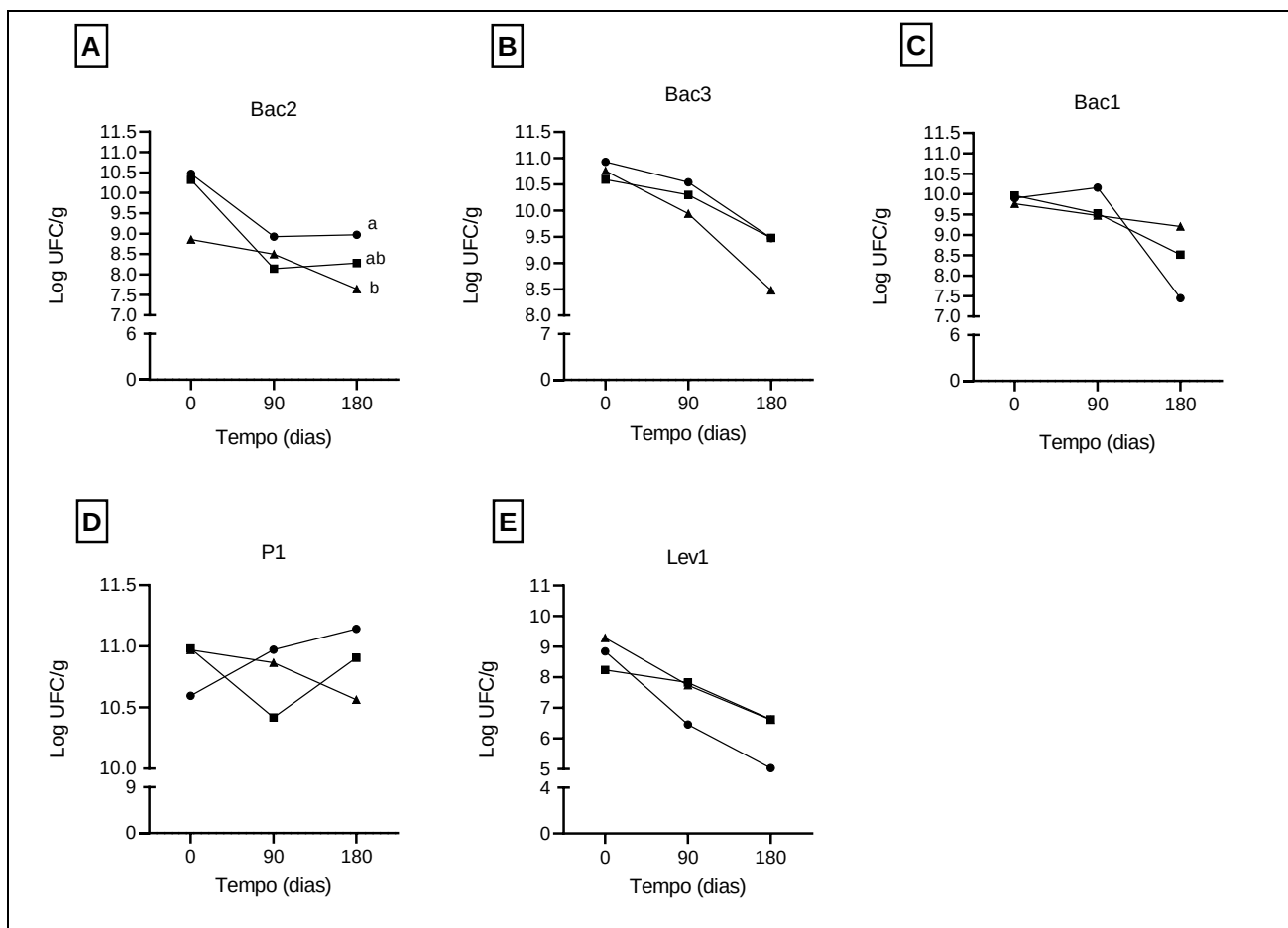


Figura 3 - Viabilidade (log UFC/g) das linhagens de bactérias lácticas (A) Bac2, (B) Bac3, (C) Bac1, (D) P1, e da linhagem de levedura Lev1 (E), logo após secagem no *spray dryer* (T0) e ao longo do armazenamento de 90 e 180 dias. (●): I; (■): II e (▲): III. Letras diferentes em um mesmo tempo indicam diferenças significativas entre os materiais crioprotetores utilizados na liofilização, ao nível de 5%, identificado pelo teste de Tukey. O experimento foi realizado em duplicata.

5.1.2. Padrão de crescimento

O perfil de crescimento dos microrganismos desidratados em *spray dryer* utilizando diferentes materiais carreadores também foi acompanhado nos mesmos tempos analisados para viabilidade.

A figura 4 apresenta as curvas de crescimento da linhagem de Bac2. Nota-se que o perfil de crescimento logo após a secagem (T0) foi semelhante ($p < 0,05$) ao controle (cultura fresca). Entretanto, após 90 dias armazenadas sob refrigeração observou-se diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras secas e a cultura fresca, com aumento da fase lag de crescimento de 3 horas (controle) para cerca de 10 horas (II ou III) e 12 horas (I), sendo este último o pior desempenho de crescimento observado, dentre as condições avaliadas. Ao final dos seis meses, o comportamento das amostras se manteve semelhante ao verificado em T90, no entanto com menor crescimento da biomassa para o I.

Bac3 (figura 5) apresentou perfil de crescimento semelhante ($p > 0,05$) ao controle em todas as condições testadas após 90 dias de armazenamento (██████████). Apenas as amostras do microrganismo desidratado na presença de ██████████ apresentaram mais longa fase lag de crescimento ($p < 0,05$) ao final de seis meses de armazenamento, figura 5C. Bac1 diferiu estatisticamente ($p < 0,05$) em relação ao controle, para todos os materiais carreadores, logo após a secagem, como mostrado na figura 6A. A fase lag de crescimento variou de 5-6 horas (controle) para 10 horas (I e III). O pior desempenho foi identificado para II, no qual houve extensão da fase lag para 16 horas. Perfil semelhante foi repetido para amostras armazenadas refrigeradas. O melhor desempenho de crescimento foi observado para a linhagem P1 adicionada do carreador I, com curva de crescimento mais próxima a observada para cultura fresca (Figura 7). Após o armazenado refrigerado identificou-se diferença significativa ($p < 0,05$) para todos os materiais carreadores em relação ao controle, mas não entre estes materiais.

O perfil de crescimento da levedura Lev1 (figura 8) na presença de III se aproximou mais do observado para a cultura fresca. Após o armazenamento prolongado, notou-se diferença significativa ($p < 0,05$) das amostras secas em relação ao controle e sobretudo entre aos materiais carreadores aplicados no processo. A levedura mostrou pior desempenho de crescimento ($p < 0,0001$) quando desidratada na presença de I, determinado pela extensão da fase lag de 8 para 32 horas.

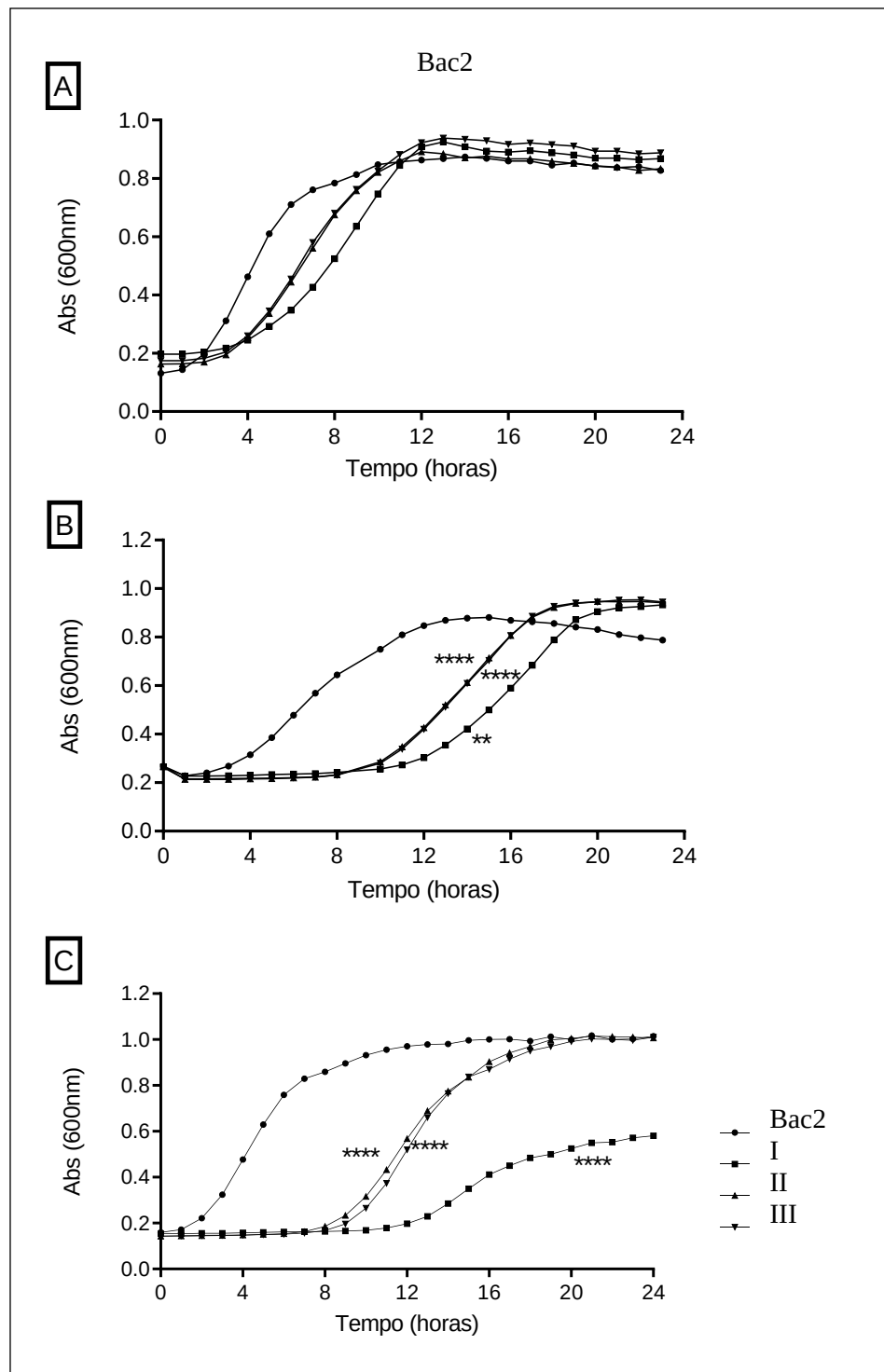


Figura 4 - Padrão médio de crescimento de Bac2 logo após a secagem por atomização (A) e ao longo do armazenamento de 90 dias (B) e 180 dias (C). As curvas representam a linhagem (●) fresca e seca por *spray dryer* com os seguintes materiais carreadores (■): I; (▲): II e (▼): III. Médias das leituras de densidade ótica a 600 nm. Os asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao controle (cultura fresca) de: ** ($p < 0,01$) e **** ($p < 0,0001$), ($n=2$).

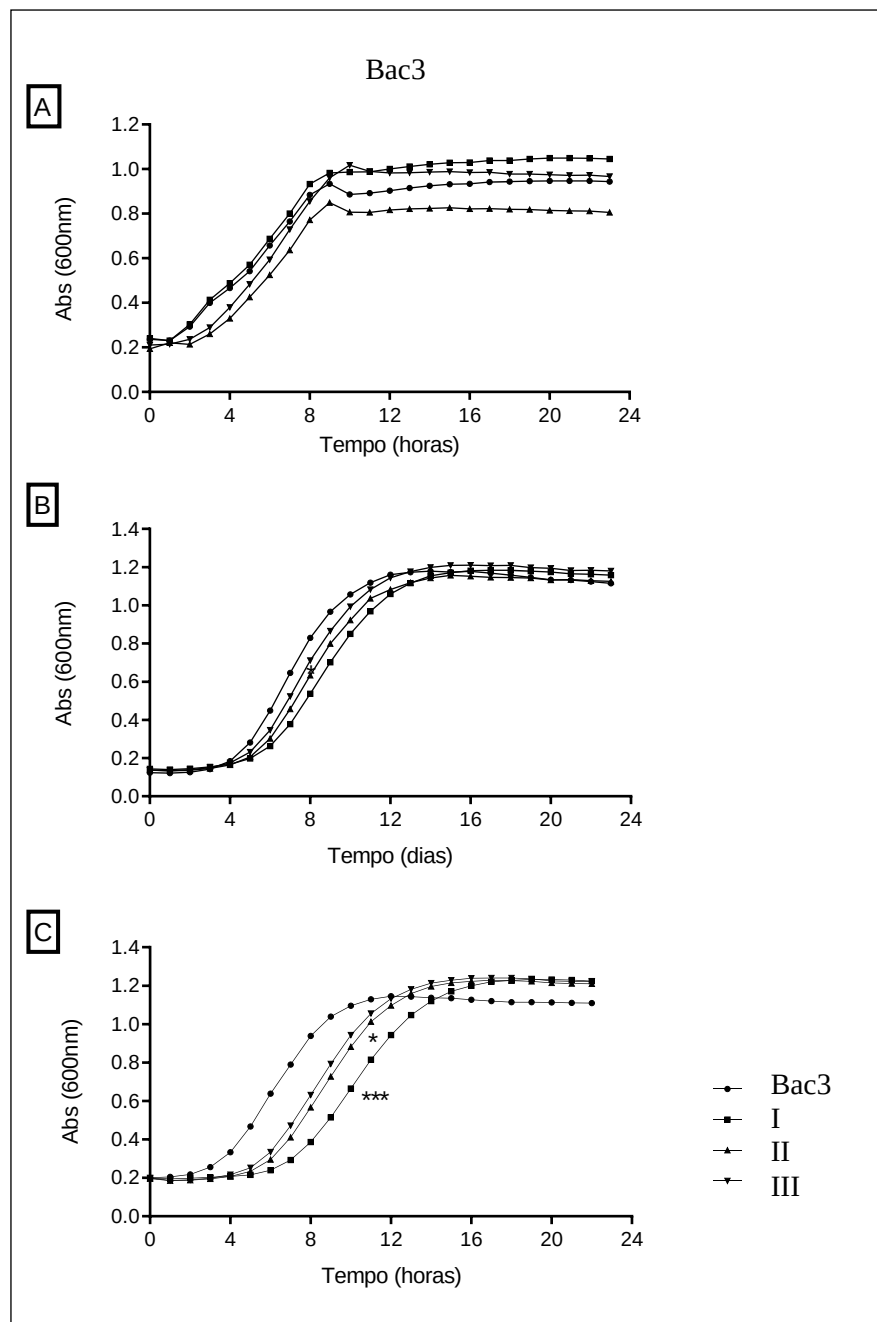


Figura 5 – Padrão médio de crescimento de Bac3 logo após a secagem por atomização (A) e ao longo do armazenamento [redacted] de 90 dias (B) e 180 dias (C). As curvas representam a linhagem (●) fresca e seca em *spray dryer* com os seguintes materiais carreadores (■): I; (▲): II e (▼): III. Médias das leituras de densidade ótica a 600 nm. Os asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao controle (cultura fresca) de: * ($p < 0,05$); *** ($p < 0,001$), ($n=2$).

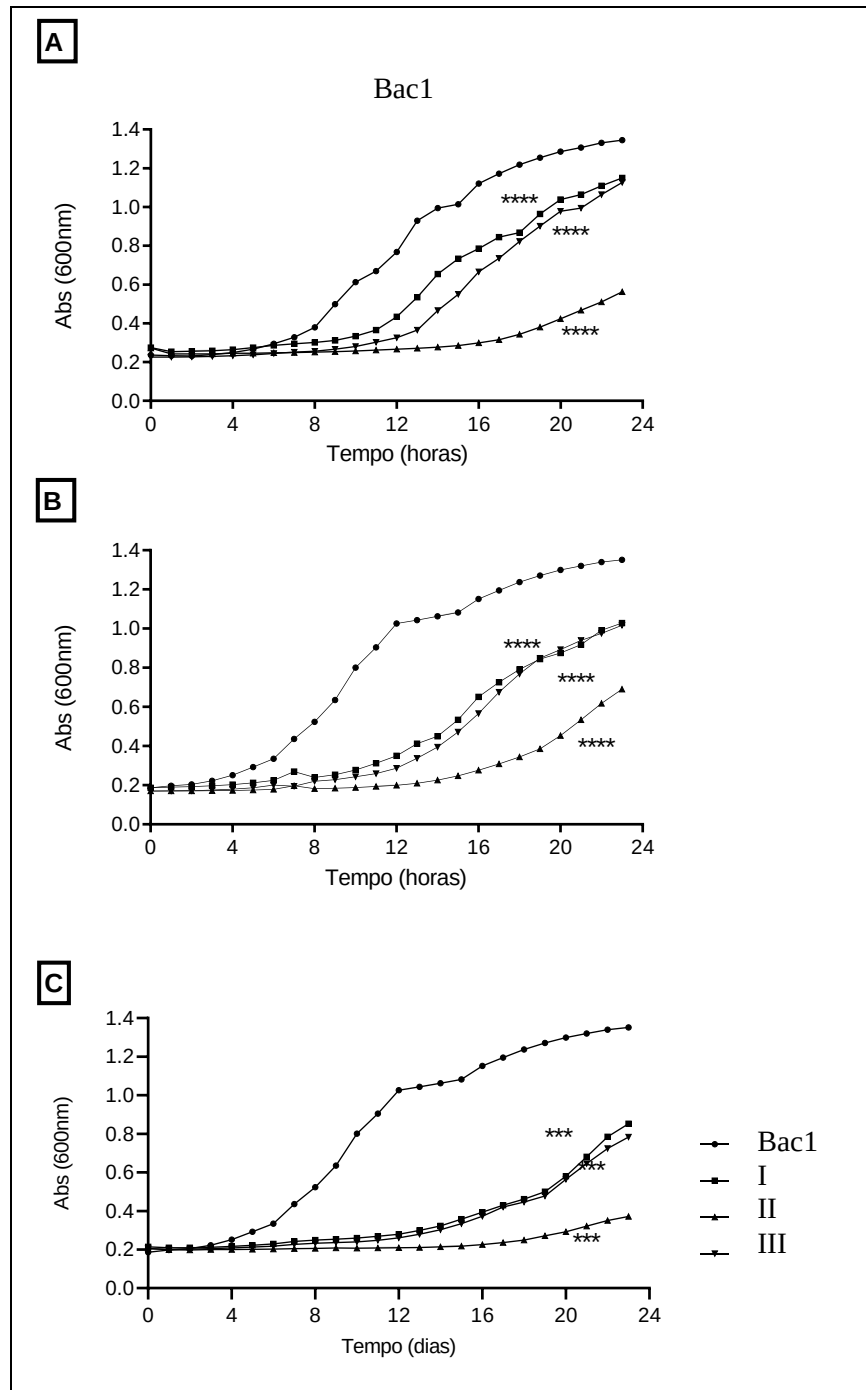


Figura 6 – Padrão médio de crescimento de Bac1 logo após a secagem por atomização (A) e ao longo do armazenamento [redacted] de 90 dias (B) e 180 dias (C). As curvas representam a linhagem (●) fresca e seca em *spray dryer* com os seguintes materiais carreadores (■): I; (▲): II e (▼): III. Média das leituras de densidade ótica a 600 nm. Os asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao controle (cultura fresca) de: *** ($p < 0,001$) e **** ($p < 0,0001$), ($n=2$).

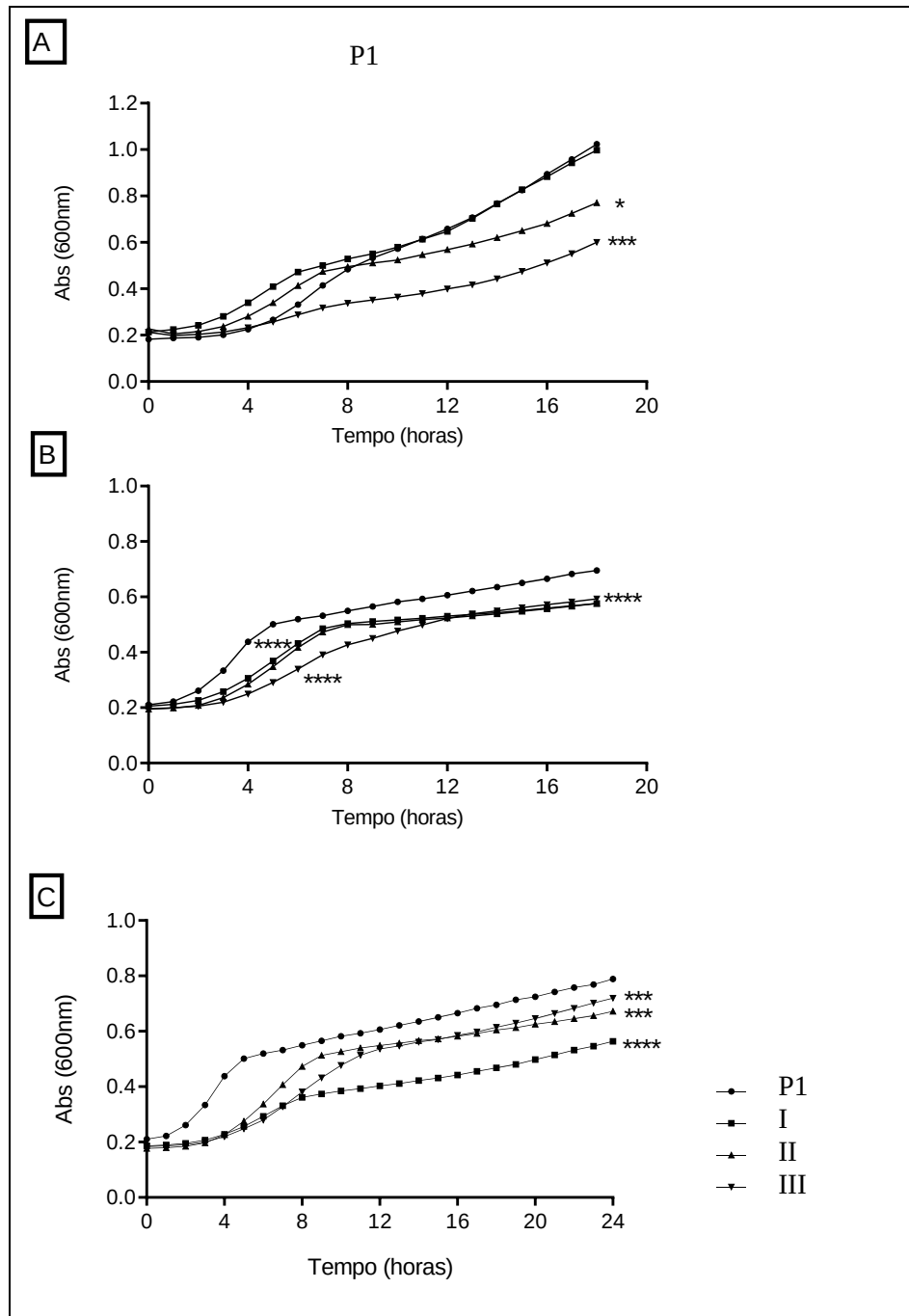


Figura 7 – Padrão médio de crescimento de P1 logo após a secagem por atomização (A) e ao longo do armazenamento de 90 dias (B) e 180 dias (C). As curvas representam a linhagem (●) fresca e seca em *spray dryer* com os seguintes materiais carreadores (■): I (▲): II (▼): III. Média das leituras de densidade ótica a 600 nm. Os asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao controle (cultura fresca) de: * ($p < 0,05$); *** ($p < 0,001$) e **** ($p < 0,0001$), ($n=2$).

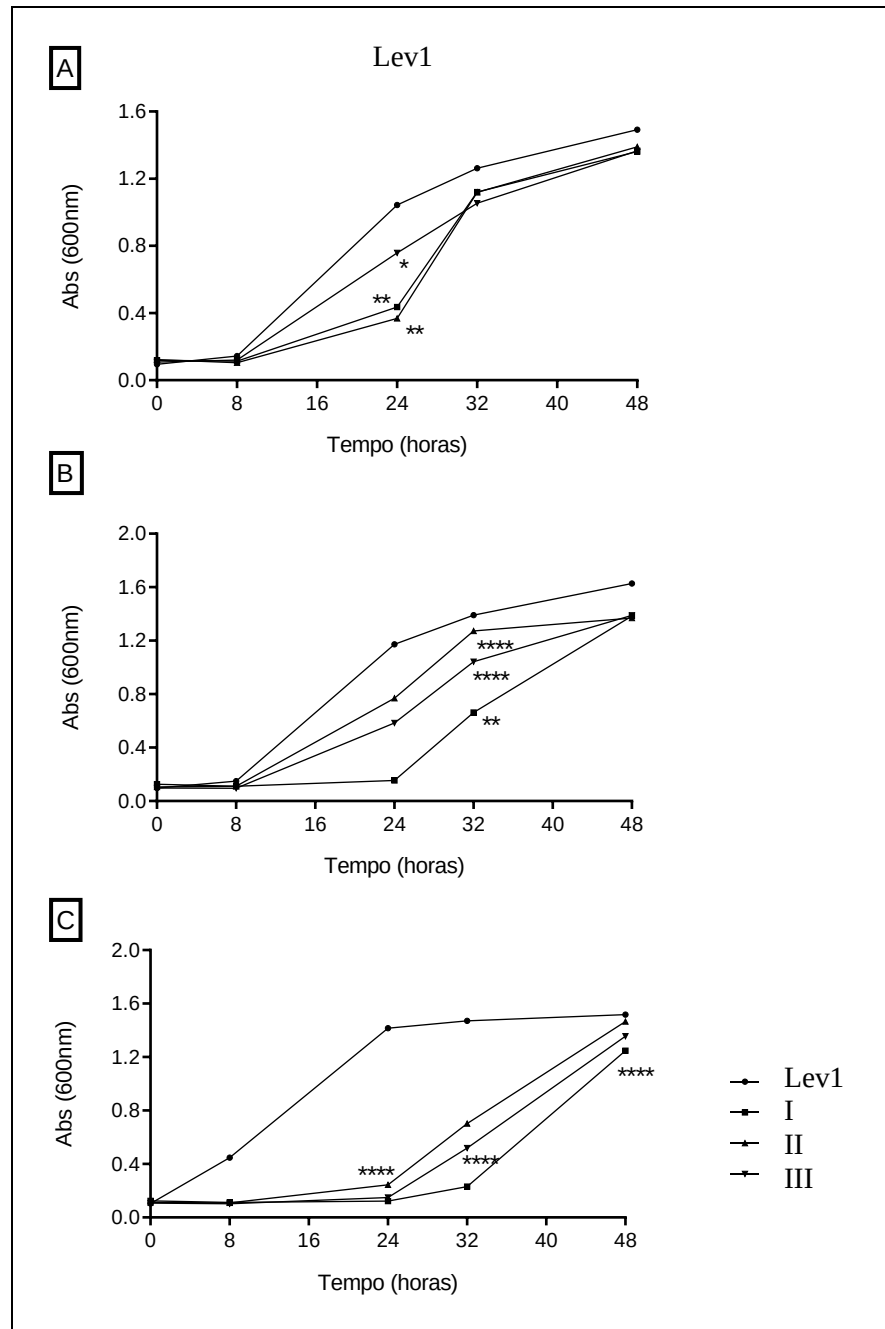


Figura 8 – Padrão médio de crescimento de Lev1 logo após a secagem por atomização (A) e ao longo do armazenamento de 90 dias (B) e 180 dias (C). As curvas representam a linhagem (●) fresca e seca em *spray dryer* com os seguintes materiais carreadores (■): I; (▲): II e (▼): III. Média das leituras de densidade ótica a 600 nm. Os asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao controle (cultura fresca) de: * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$) e **** ($p < 0,0001$), ($n=2$).

5.2. Avaliação da resistência das linhagens ao processo de liofilização

5.2.1. Viabilidade

Os números de células viáveis antes (T'), após o processo de liofilização (T0) e ao longo do armazenamento [REDACTED] de 180 dias (T90 e T180) estão organizados na tabela 4 e figura 9, respectivamente. Como observado, as contagens de bactérias lácticas inicialmente (T') variaram entre 9,59- 10,73 log UFC/mL, enquanto para a levedura este número variou de 8,70 - 8,95 log UFC/mL. Considerando cada cultura, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) no número de células viáveis entre os diferentes crioprotetores utilizados (tabela 4).

Tabela 4 - Média ($\pm$ SD) do número de células viáveis (log UFC/mL) antes do processo de liofilização (T'). O experimento foi realizado em duplicata.

Tempo	T' (UFC/mL)		
Linhagens	I	II	III
Bac2	10,66 $\pm$ 0,33	10,63 $\pm$ 0,25	10,73 $\pm$ 0,23
Bac3	10,21 $\pm$ 0,05	10,24 $\pm$ 0,27	9,85 $\pm$ 0,52
Bac1	10,21 $\pm$ 0,16	9,90 $\pm$ 0,22	10,10 $\pm$ 0,06
P1	9,59 $\pm$ 0,83	10,14 $\pm$ 0,11	10,31 $\pm$ 0,19
Lev1	8,79 $\pm$ 0,06	8,70 $\pm$ 0,20	8,72 $\pm$ 0,18
Lev1*	8,95 $\pm$ 0,07	8,92 $\pm$ 0,01	8,83 $\pm$ 0,06

T': antes da liofilização. Lev1 e Lev 1* são a mesma linhagem de levedura, porém submetidas a tratamentos diferentes durante o processo de desidratação

De modo geral, observou-se decréscimo da contagem de microrganismos viáveis nos primeiros 90 dias de armazenamento, exceto para as linhagens Bac2 e Bac1 liofilizadas em II e para a levedura Lev1 [REDACTED] liofilizada em II ou III, que mantiveram contagens constantes em todos os tempos analisados (figura 9).

Após a desidratação foi possível notar que as bactérias lácticas apresentaram menor queda na contagem de células viáveis (log UFC/g) em relação à levedura Lev1*. [REDACTED]

Houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação aos crioprotetores para as amostras Bac2, Bac1, P1, Lev1 e Lev 1* (figuras 9A, 9C, 9D, 9E, 9F, respectivamente), sendo a maior viabilidade igualmente identificada ($p < 0,05$) quando empregou-se II ou III como crioprotetor. No entanto, a manutenção da viabilidade de Bac3 se mostrou independente do crioprotetor ($p > 0,05$) para todos os tempos de analisados (figura 9B).

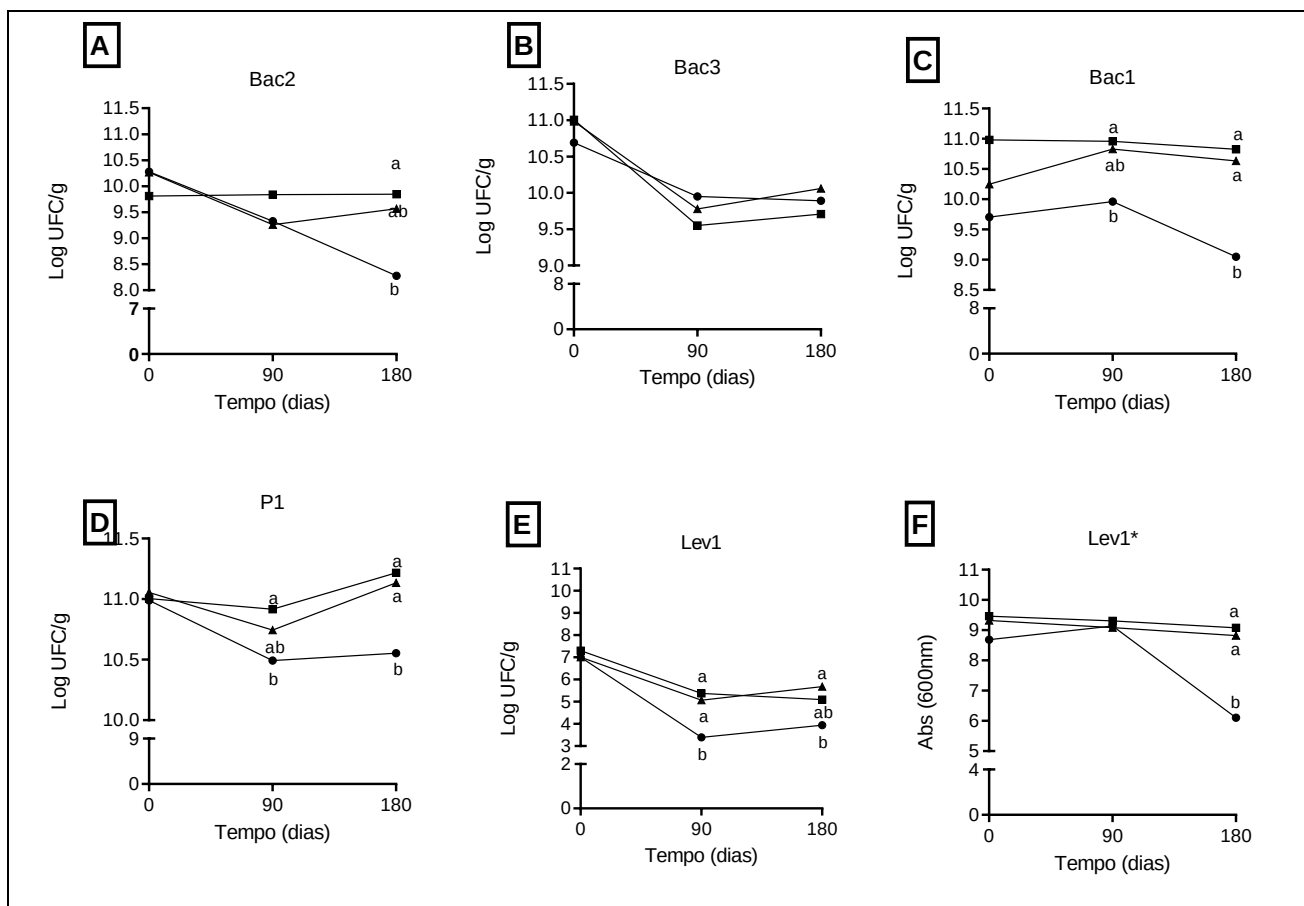


Figura 9 - Viabilidade (log UFC/g) das linhagens de bactérias lácticas (A) Bac2, (B) Bac3, (C) Bac1, (D) P1, e da linhagem de levedura Lev1 (E) e Lev1* (F), logo após a liofilização (T0) e ao longo do armazenamento de 90 e 180 dias. (●): I; (■): II e (▲): III. Letras diferentes em um mesmo tempo indicam diferenças significativas entre os materiais crioprotetores utilizados na liofilização, ao nível de 5%, identificado pelo teste de Tukey.

O microrganismo mais sensível ao processo e que apresentou contagens inferiores aos demais durante o armazenamento foi a levedura Lev1 e liofilizada, no qual obteve-se diminuição de 3,06 ciclos logaritmos, chegando ao final do armazenamento com 3,94 log UFC/g, como mostrado na figura 9E. As amostras de bactérias lácticas desidratadas permaneceram com contagens acima de 9,0 log UFC/g ao final de 180 dias, exceto a linhagem Bac2 em I (8,28 log UFC/g).

Considerando os resultados da viabilidade das linhagens, pode-se dizer que as formulações compostas por II ou III contribuíram positivamente para a manutenção da viabilidade dos microrganismos durante o processo de desidratação e ao longo de 180 dias sob refrigeração em.

5.2.2. Padrão de crescimento

O padrão de crescimento das linhagens após a desidratação e ao longo do armazenamento de 180 dias sob refrigeração segue apresentados nas figuras abaixo. A figura 10 mostra as alterações observadas para Bac2. Logo após o processo (figura 10A), notam-se perfis de crescimento significativamente diferentes ($p < 0,05$) para amostras desidratadas, quando comparadas ao controle (cultura fresca). O perfil de crescimento mais próximo ao controle foi observado para amostras com II. Todas as curvas exibiram aumento da fase lag de crescimento em relação a cultura fresca, sendo a amostra com I aquela que requereu maior tempo para recuperação do microrganismo. De modo geral, amostras desidratadas em II e III exibiram perfil de crescimento mais próximo ao observado para o controle.

Bac3 apresentou perfil de crescimento semelhante a cultura fresca ($p > 0,05$), como observado na figura 11. A fase lag de crescimento durou cerca de 2-3 horas para todas as condições testadas. O perfil de crescimento da linhagem Bac1 segue apresentado na figura 12. Amostras desidratadas em II ou III exibiram perfil de crescimento semelhante ao controle ($p > 0,05$), imediatamente após a desidratação, com fase lag de aproximadamente 6 horas (figura 12A). Nos demais tempos (T90 e T180) foram identificadas diferenças estatísticas ($p < 0,05$) em relação a cultura fresca. O pior desempenho no crescimento foi verificado para amostras (figura 12A, 12B e 12C), que exibiram fase lag superior a 17 horas.

O perfil de crescimento de P1 no tempo T0 (figura 13A) foi dependente estatisticamente do tipo de crioprotetor utilizado na liofilização ($p < 0,05$). As amostras [REDACTED] apresentaram fase lag de crescimento mais próxima ao controle (cerca de 3 horas), enquanto as amostras em I apresentaram tempo maior, cerca de 12 horas. Todavia, o perfil mais próximo ao controle foi identificado para os liofilizados em III (figura 13A). Durante o armazenamento refrigerado, houve manutenção da fase lag de crescimento (3 horas) em todas as condições avaliadas.

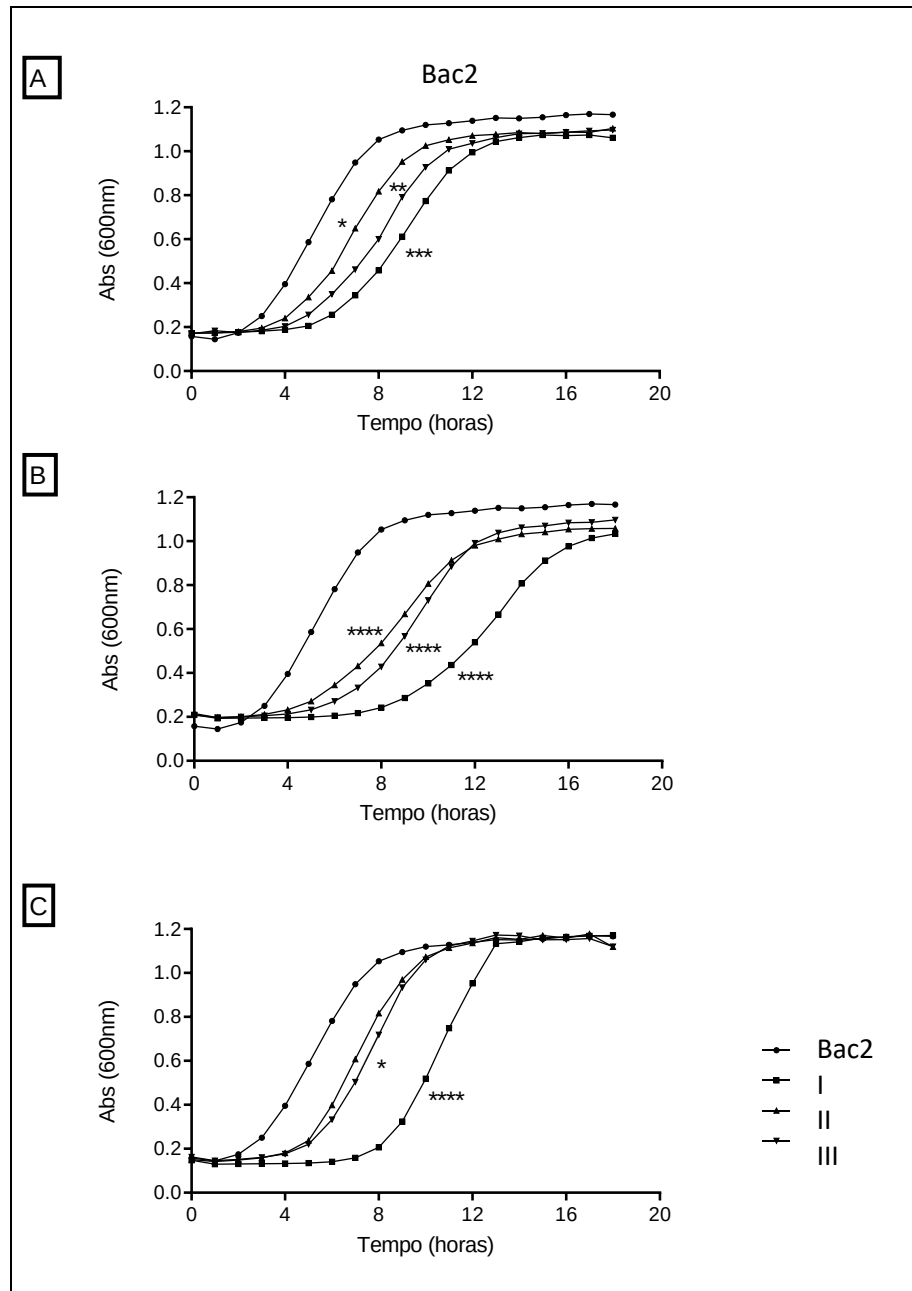


Figura 10 - Padrão de crescimento de Bac2 logo após a desidratação (A) e ao longo do armazenamento de 90 (B) e 180 dias (C). As curvas representam a linhagem (●) fresca e desidratada com (■): I (▲): II e (▼): III. Média das leituras de densidade ótica a 600 nm. Os asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao controle (cultura fresca) de: * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$) e **** ($p < 0,0001$), ($n=2$).

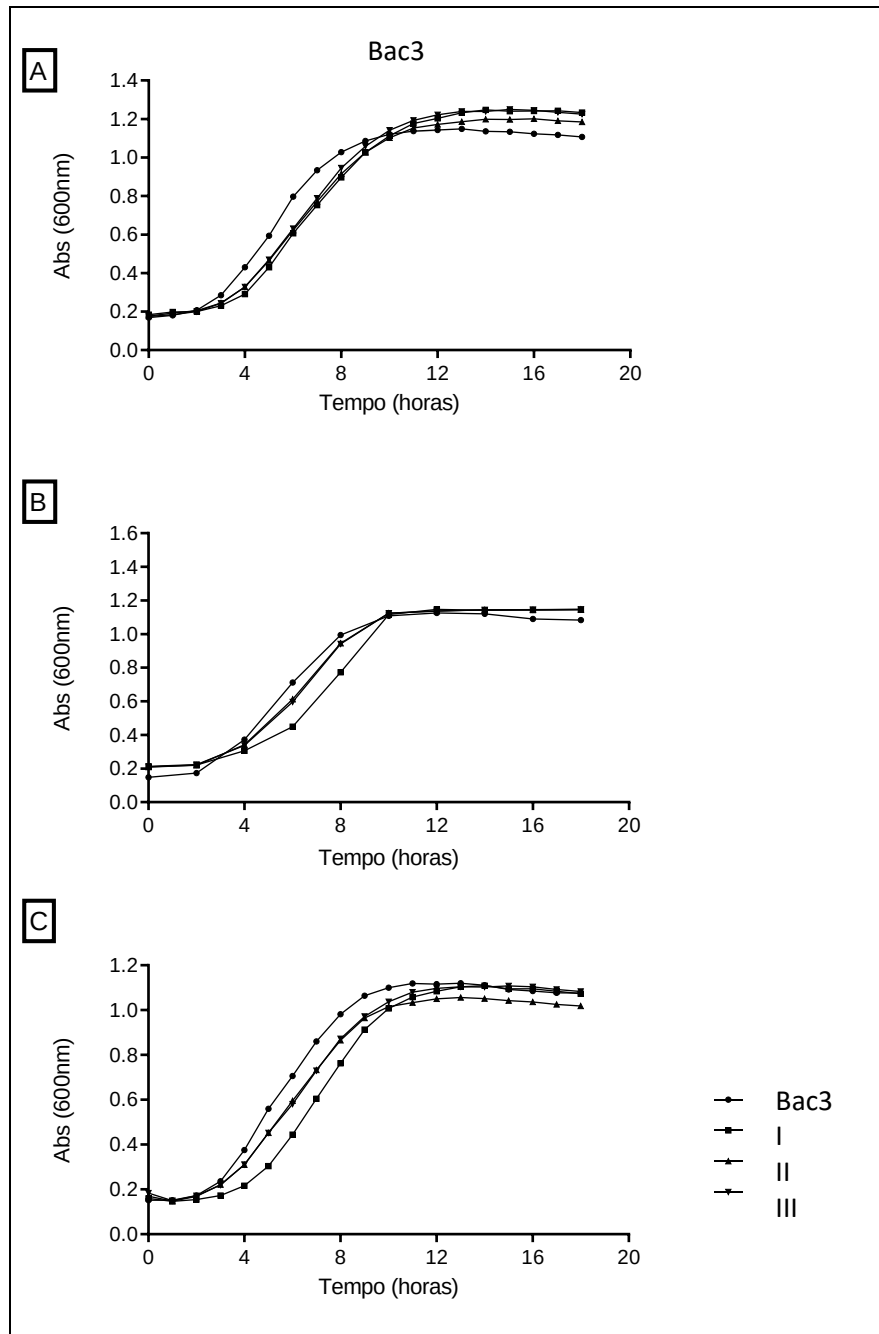


Figura 11 - Padrão de crescimento de Bac3 logo após a desidratação (A) e ao longo do armazenamento de 90 (B) e 180 dias (C). As curvas representam a linhagem (●) fresca e desidratada com (■): I; (▲): II e (▼): III. Média das leituras de densidade ótica a 600 nm. (n=2).

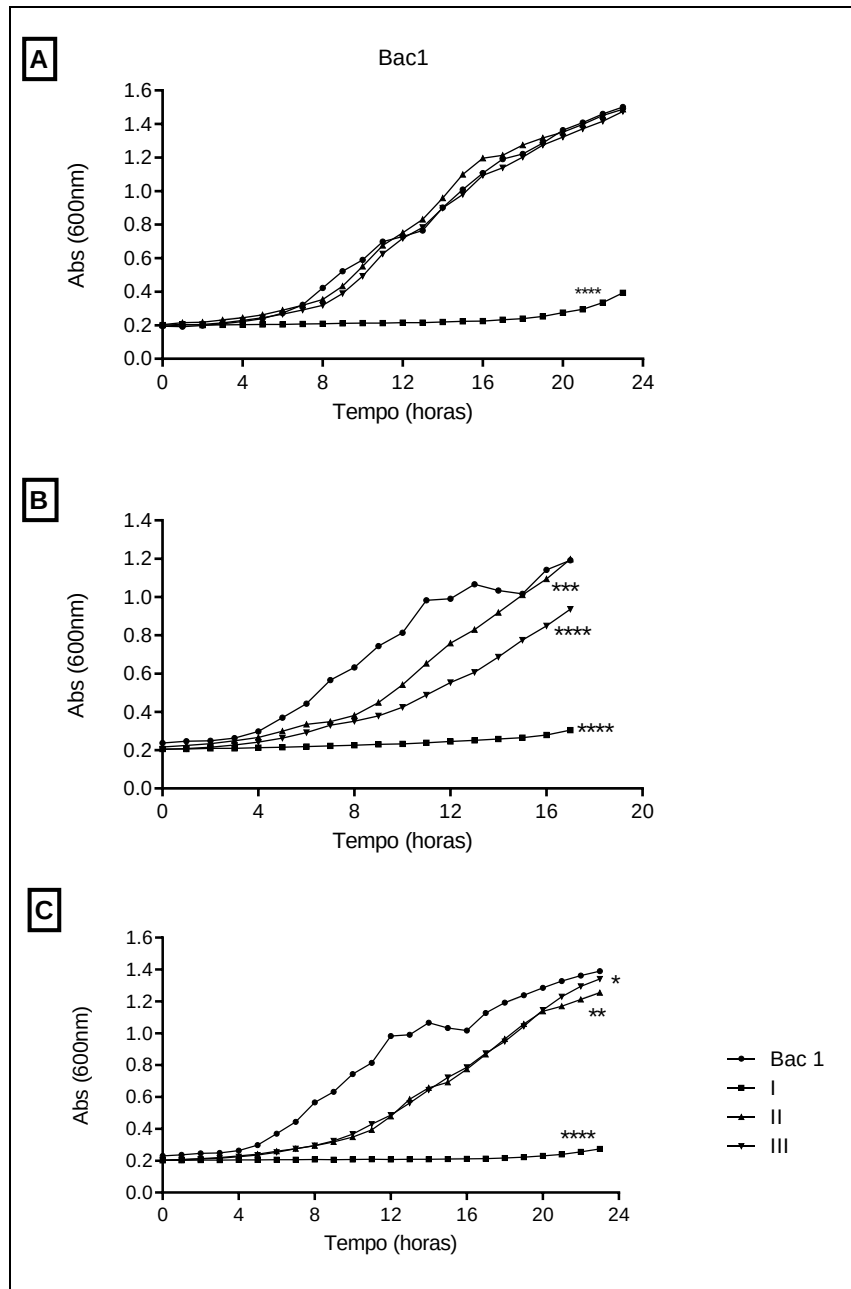


Figura 12 - Padrão de crescimento de Bac1 logo após a desidratação (A) e ao longo do armazenamento de 90 (B) e 180 dias (C). As curvas representam a linhagem (●) fresca e desidratada com (■): I; (▲): II e (▼): III. Média das leituras de densidade ótica a 600 nm. Os asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao controle (cultura fresca) de: * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$) e **** ($p < 0,0001$), ($n=2$).

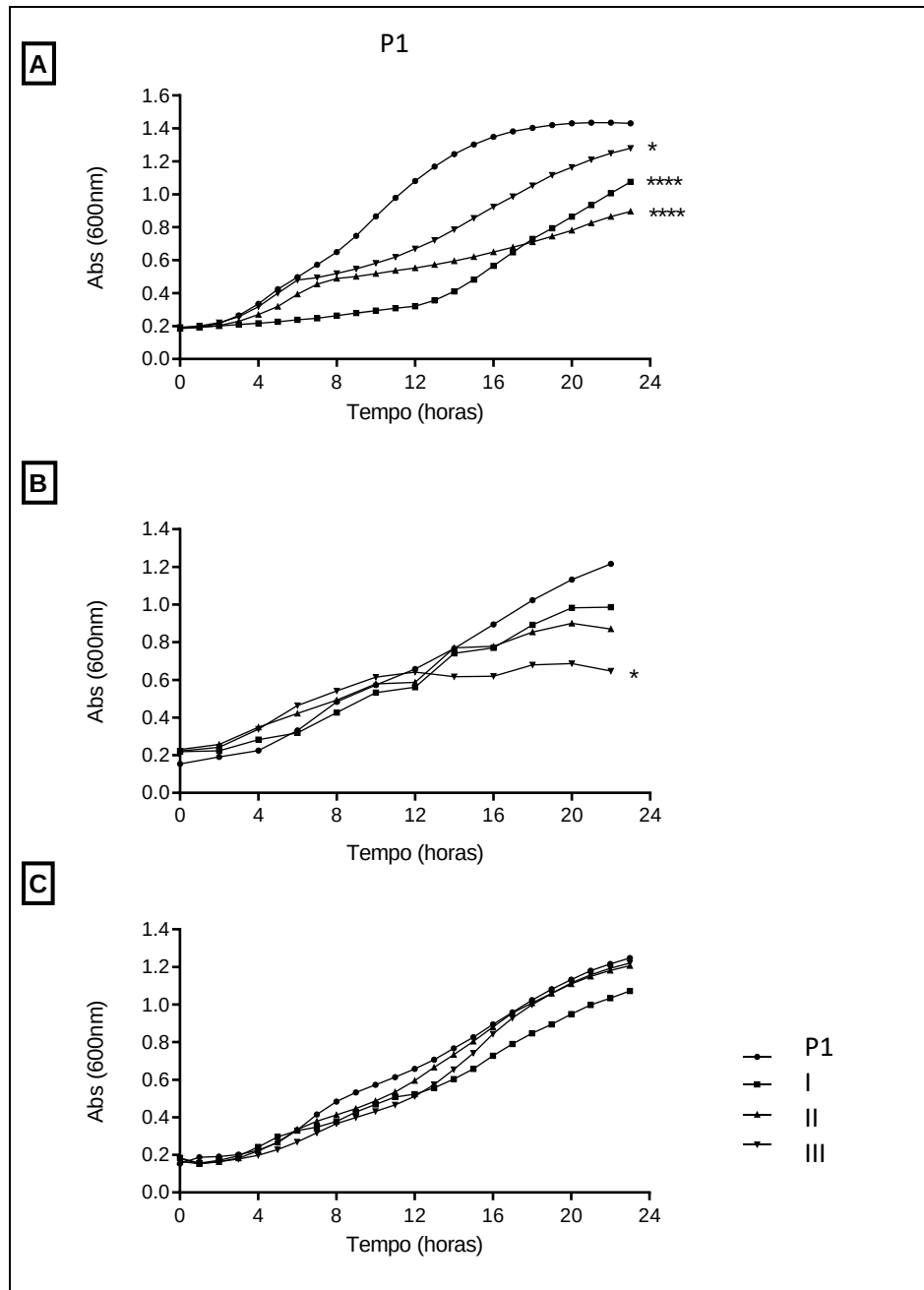


Figura 13 - Padrão de crescimento de P1 logo após a desidratação (A) e ao longo do armazenamento de 90 (B) e 180 dias (C). As curvas representam a linhagem (●) fresca e desidratada com (■): I; (▲): II e (▼): III. Média das leituras de densidade ótica a 600 nm. Os asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao controle (cultura fresca) de: * ($p < 0,05$) e **** ($p < 0,0001$), ($n=2$).

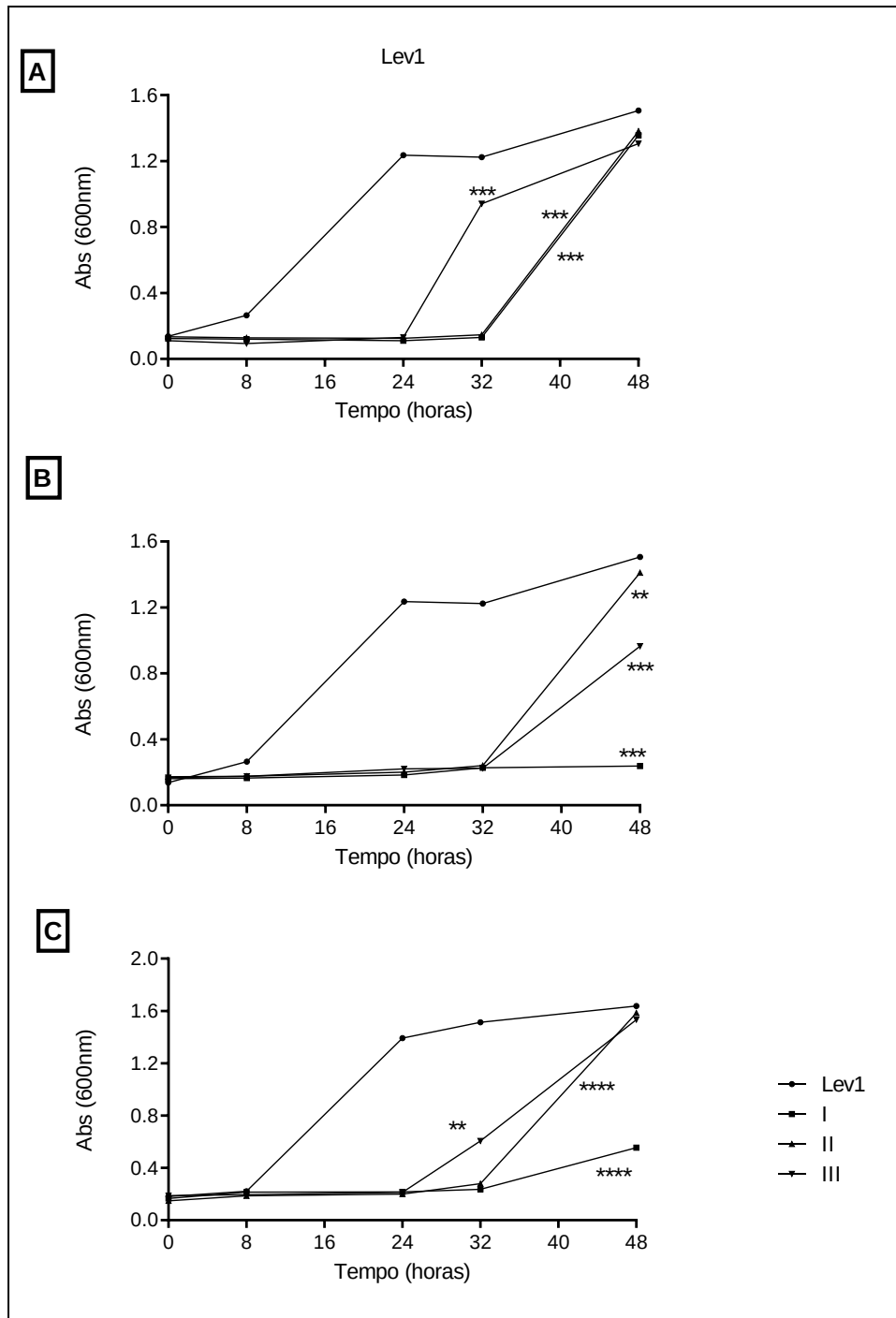


Figura 14 - Padrão de crescimento de Lev1 logo após a desidratação (A) e ao longo do armazenamento de 90 (B) e 180 dias (C). As curvas representam a linhagem (●) fresca e desidratada com (■): I (▲): II e (▼): III. Média das leituras de densidade ótica a 600 nm. Os asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao controle (cultura fresca) de: ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$) e **** ($p < 0,0001$), ($n=2$).

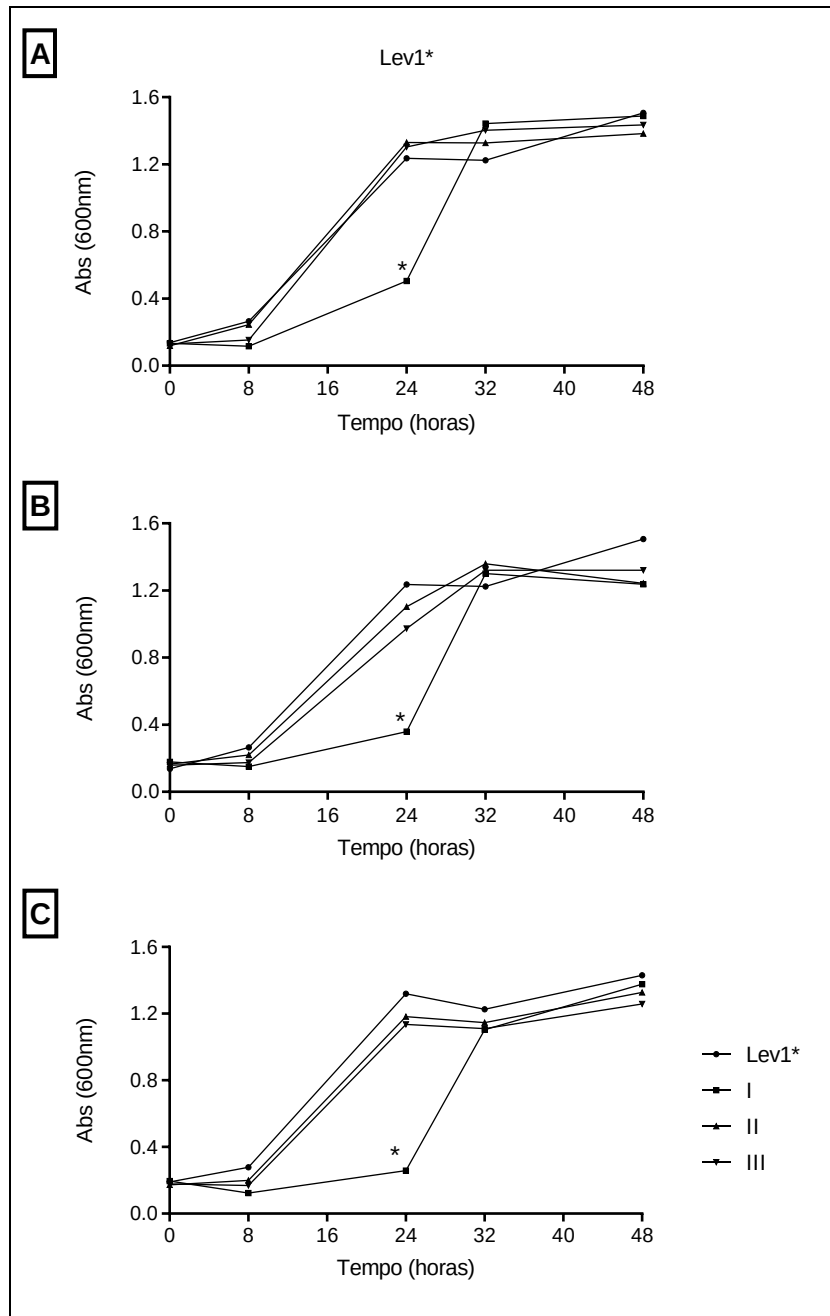


Figura 15 - Padrão de crescimento de Lev1* logo após a desidratação (A) e ao longo do armazenamento de 90 (B) e 180 dias (C). As curvas representam a linhagem (●) fresca e liofilizada com (■): I (▲); II e (▼): III. O microrganismo XXXXXXXXXX. Média das leituras de densidade ótica a 600 nm. Os asteriscos indicam diferenças significativas em relação ao controle (cultura fresca) de: * ($p < 0,05$), ($n=2$).

Em relação à levedura Lev1 e Lev 1* (figuras 14 e 15), o maior tempo de recuperação da cultura foi requerido para amostras XXXXXXXXXX XXXXXXXXXX (figura 14), antes de submetidas à liofilização, cerca de 24-32 horas. Houve diferença estatística ($p < 0,05$) em todos os tempos (T0, T90 e T180 dias) em relação ao controle (cultura fresca). XXXXXXXXXX

████████████████████ Houve diferença significativa ($p < 0,05$) apenas quando foi utilizado I em T0, T90 e T180 dias, quando observou-se o pior desempenho para linhagem em todas as condições avaliadas.

Diante dos resultados expostos, foi possível escolher o melhor método de preservação aplicado para os microrganismos deste estudo. Sob o tratamento escolhido, garantiu-se menor variação (extensão) da fase lag de crescimento em relação ao controle (cultura fresca) para a maioria das linhagens avaliadas, além de maior número de células viáveis após processo.

5.3. Capacidade de acidificação das linhagens

O potencial de acidificação de cada linhagem desidratada e inoculada em leite integral reconstituído 10% foi acompanhado ao longo de 24 horas. A variação de pH e o número de células viáveis (log UFC/mL) após o período seguem apresentados na figura 16.

A linhagem Bac2 apresentou a maior variação do pH, com queda durante fermentação, variando de 6,63 a 4,24 ao final de 24 horas de incubação a █████ °C. Para as linhagens Lev1, P1 e Bac1 observou-se menor capacidade de acidificação no leite, quando adicionadas como inóculos isolados, o que se confirmou através dos valores obtidos ao final de 24 horas de fermentação (6,07; 6,12 e 6,04, respectivamente para Lev1, P1 e Bac1). A linhagem com capacidade intermediária foi Bac3, que alterou de 6,63 para 5,51 o pH ao final do mesmo período. Independentemente da capacidade de acidificação do leite, nota-se que o número de células viáveis se manteve acima de 7,5 e 6 log UFC/mL para bactérias lácticas e levedura, respectivamente.

5.4. Elaboração de kefir de leite com culturas iniciadoras: definição de inóculo e condições de fermentação

A padronização do inóculo para elaboração de kefir de leite adicionado ou não de linhagem probiótica foi realizado a partir de medições do pH até ser atingido o valor de 4,6. Os resultados obtidos seguem na figura 17.

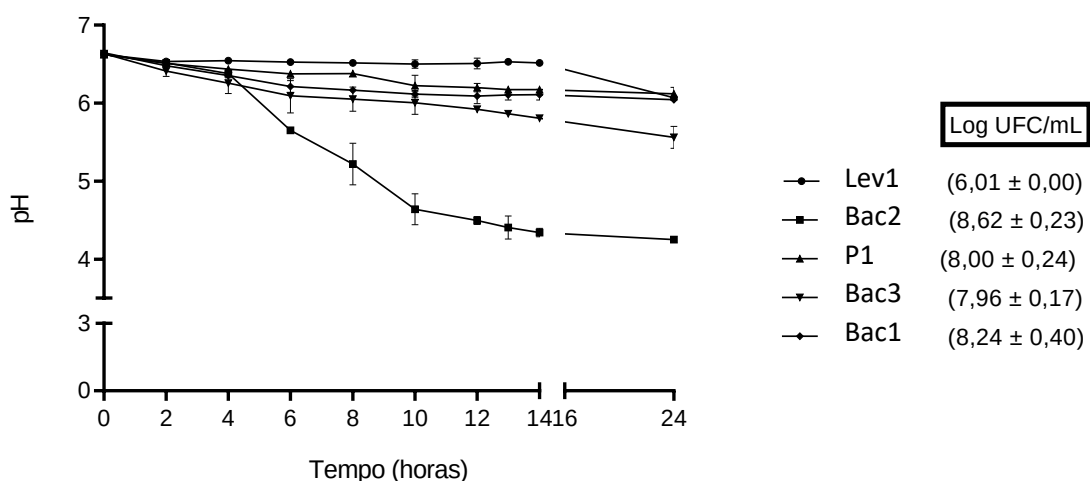


Figura 16 - Perfil de acidificação das linhagens liofilizadas inoculadas isoladamente a Z em leite integral reconstituído a 10% e contagem de células viáveis (Log UFC/mL) ao final de 24 horas de fermentação, (n=2).

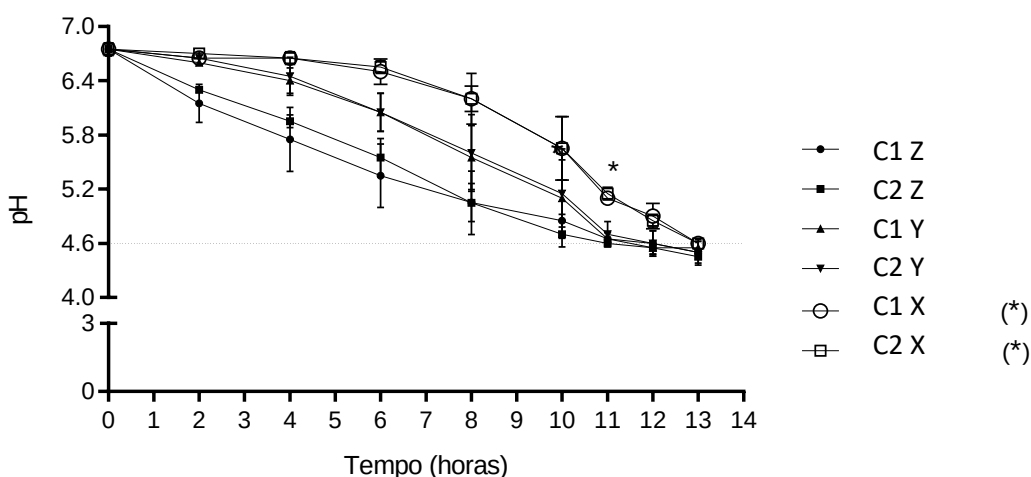


Figura 17 - Perfil de acidificação das culturas iniciadoras C1 e C2 empregando diferentes proporções de inóculos Z; Y e X em leite integral reconstituído 10%. Foi utilizada como controle a bebida preparada com os grãos de kefir de Curitiba (KLCU), com inóculo de Z, (n=2). * $p < 0,05$.

Os tempos de fermentação das bebidas adicionadas de diferentes inóculos foram próximos entre si. No entanto, identificou-se diferença estatística ($p < 0,05$) para o inóculo de X, que levou a uma acidificação um pouco mais lenta. Kefir preparado com inóculos de Z e Y atingiram pH final 4,6 após 11 horas de incubação a $\blacksquare$ °C. Já naqueles preparados com X este tempo foi de 13 horas. O número de bactérias lácticas totais e da levedura foi determinado ao final da fermentação e os dados seguem na tabela 5. Após a fermentação, as contagens de bactérias lácticas totais mantiveram acima de 8,5 log UFC/mL, mesmo com inóculos iniciais diferentes, sem diferença estatisticamente significativa entre as formulações ($p > 0,05$). A

contagem total de leveduras ao final do tempo de fermentação foi similar para todas as formulações ($p > 0,05$), ficando acima 6,0 log UFC/mL para aquelas com inóculos de Z e Y e em nível um pouco mais baixo para a formulação que utilizou inóculo de X. A metodologia empregada para a enumeração de células viáveis não permitiu a determinação da concentração de leveduras nas bebidas C2 ($< 3,0$ log UFC/mL) (Tabela 5).

Tabela 5 - Contagens de bactérias lácticas totais e leveduras (log UFC/mL) de diferentes inóculos (Z, Y e X) para o preparo de kefir (C1 e C2), após adição em leite integral reconstituído 10% (T0) e ao final da fermentação (TF), (n=2).

	Tempo	C1 (Z)	C2 (Z)	C1 (Y)	C2 (Y)	C1 (X)	C2 (X)
MRS	T0	8,55 ± 0,08	8,29 ± 0,05	7,35 ± 0,07	7,51 ± 0,10	6,35 ± 0,01	6,48 ± 0,25
	TF	8,88 ± 0,03	8,28 ± 0,05	8,88 ± 0,32	8,69 ± 0,12	8,96 ± 0,38	8,79 ± 0,06
YPG	T0	6,17 ± 0,04	6,66 ± 0,04	5,69 ± 0,02	5,68 ± 0,03	4,61 ± 0,01	4,65 ± 0,08
	TF	6,36 ± 0,12	< 3,00 *	6,14 ± 0,39	< 3,00 *	5,20 ± 0,54	< 3,00 *

* Limite mínimo de detecção pelo método aplicado.

Uma vez que a contagem de leveduras ficou abaixo de 3 log UFC/mL após a fermentação das formulações C2, decidiu-se avaliar uma eventual capacidade antagonista entre as linhagens constituintes desta cultura iniciadora. Foi observado que Bac2 produz algum metabólito capaz de inibir o crescimento de P1, comprovado pelo de halo de inibição de 38,92 mm (apêndice I, tabela 17) e confirmado na avaliação da atividade antagonista do sobrenadante livre de células neutralizado e não neutralizado, frente ao crescimento de P1 (apêndice F, figura 27B). Este microrganismo (P1) ainda foi capaz de inibir o crescimento da levedura Lev1 (apêndice I, tabela 17). Por outro lado, no ensaio de antagonismo, foi observado um aumento de crescimento da levedura Lev1 em torno do local de inoculação da linhagem Bac2 (zona esbranquiçada ao redor do spot) (apêndice I, figura 33C), que precisa ser melhor investigado.

Diante destes resultados, optou-se por alterar o método de produção das bebidas, com intuito de assegurar que a concentração de levedura após o final da fermentação atendesse o limite estabelecido pela legislação brasileira e o *Codex Alimentarius*. Sendo assim, a proposta de formulação de kefir contendo probiótico foi a adição da linhagem probiótica P1 somente ao final da fermentação. Esta nova formulação foi chamada de C3. Após a alteração no preparo, as concentrações de bactérias lácticas e levedura se enquadraram ao regulamentado para kefir de leite (*Codex Alimentarius*, 2018; Brasil, 2007) após fermentação e durante 28 dias de armazenamento refrigerado, como previamente determinado (dados não mostrados) e

confirmado posteriormente. Portanto, pode-se dizer que as culturas iniciadoras mantêm estável a concentração de microrganismo ao longo do armazenamento refrigerado, para todos os inóculos testados. Desta maneira, optou-se por padronizar a utilização de X de inóculo, com base nos resultados de pH (ainda que o tempo de acidificação tenha sido um pouco maior comparado aos demais) e contagem de microrganismos após fermentação. Além disso, esta escolha representa uma economia na produção de kefir em grande escala.

5.5. Caracterização de kefir produzido com as culturas iniciadoras

5.5.1. Microbiológica

- Contagem de bactérias lácticas totais e leveduras

A contagem de bactérias lácticas e leveduras ao longo do armazenamento refrigerado foi determinada para as bebidas preparadas com os grãos de kefir (controle) e as culturas iniciadoras (C1 e C3). Os resultados seguem apresentados na figura 18 e no apêndice F.

Ao longo de 28 dias de armazenamento, bebidas preparadas com as culturas iniciadoras apresentarem maior contagem de bactérias lácticas, quando comparado ao controle KLCU, independentemente do tempo de armazenamento refrigerado das culturas iniciadoras (T0 ou T180 dias). Para a enumeração de leveduras, não foi identificada diferença significativa entre as amostras experimentais e o controle KLCU ($p > 0,05$), a partir de ■ horas de fermentação. Mesmo em menor proporção nas culturas C1 e C3 após 180 dias armazenadas, a levedura Lev1 foi capaz de alcançar ao final do período avaliado, população equivalente ao determinado para o controle KLCU ($p > 0,05$).

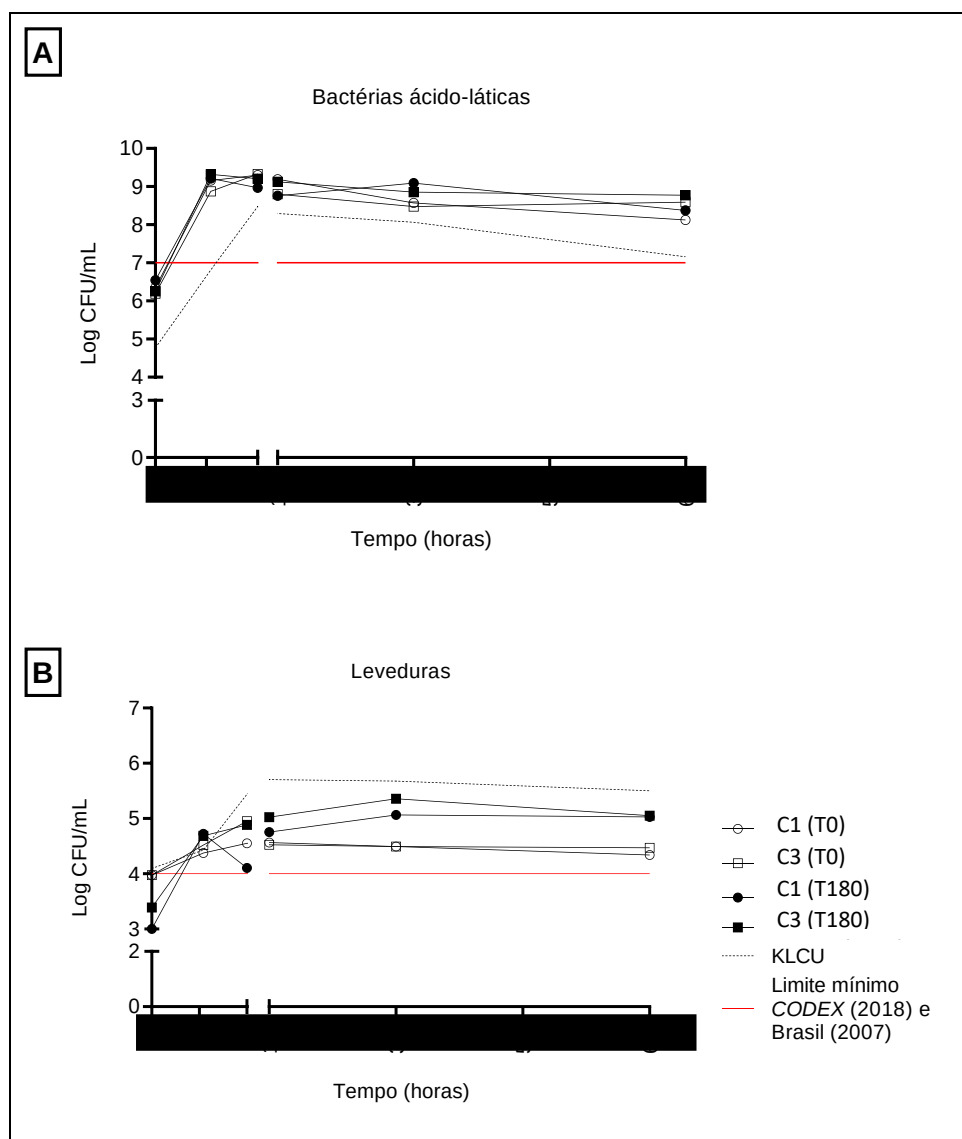


Figura 18 - Contagem total de bactérias lácticas (A) e leveduras (B) no kefir preparado com os grãos (KLCU) ou com as culturas iniciadoras C1 e C3, recém liofilizadas ou após armazenamento.

- Concentração da linhagem P1 na bebida C3

A figura 19 apresenta a concentração de P1 nas bebidas C3 logo após a adição e ao longo do armazenamento [REDACTED] [REDACTED]. Vale ressaltar que foram utilizadas culturas iniciadoras logo após desidratação (T0) e armazenadas por 180 dias (T180). O gene específico utilizado para identificação de P1 foi testado para as demais linhagens da cultura iniciadora, por meio de PCR convencional e o resultado obtido demonstrou que apenas P1 foi positiva para a presença do mesmo (figura 34, apêndice K).

No momento da adição da linhagem probiótica, a concentração de P1 foi menor na bebida produzida com a cultura iniciadora recém-desidratada quando comparado à bebida produzida com a cultura após o armazenamento ($p < 0,05$). Para os demais tempos analisados, houve

estabilidade da concentração de P1, no qual a concentração da linhagem na bebida apresentou variações entre 5,72 - 6,51 para culturas do T0 dias e 6,15 – 6,69 log UFC/mL para culturas do T180 dias. A curva padrão construída com diferentes concentrações de P1 segue apresentada no Anexo A e a equação gerada ($y = -0,3008x + 10,49$) foi a utilizada para quantificação da linhagem nas amostras de bebidas.

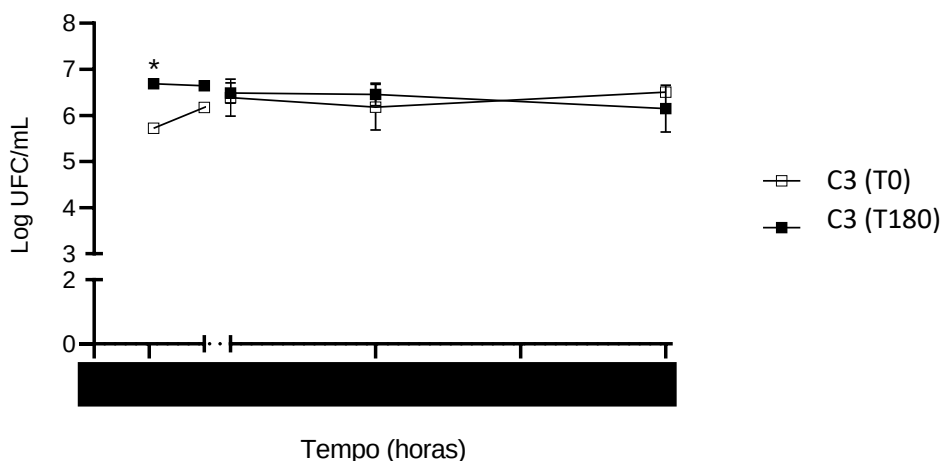


Figura 19 - Concentração (log UFC/mL) de P1 ao longo do armazenamento [REDACTED] (n=2). As bebidas fermentadas foram preparadas com as culturas recém desidratadas (T0 dias) e após 6 meses de armazenamento (T180 dias). O asterisco indica diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos em [REDACTED], (n = 2).

Visando obter bebidas com maior concentração da linhagem P1, o experimento foi repetido com adição de maior inóculo da linhagem. Os percentuais testados foram equivalentes a Z e Y, utilizando-se a cultura probiótica recém-liofilizada. Os resultados obtidos nesta nova condição de produção da bebida, seguem apresentados na figura 20. Nota-se que o aumento do inóculo elevou os níveis populacionais da cultura probiótica na bebida conforme o esperado. Houve diferença significativa ao longo do armazenamento [REDACTED] entre as bebidas C3. De modo geral, a população da linhagem probiótica se manteve estável ao longo do armazenamento das bebidas, em todas as concentrações testadas.

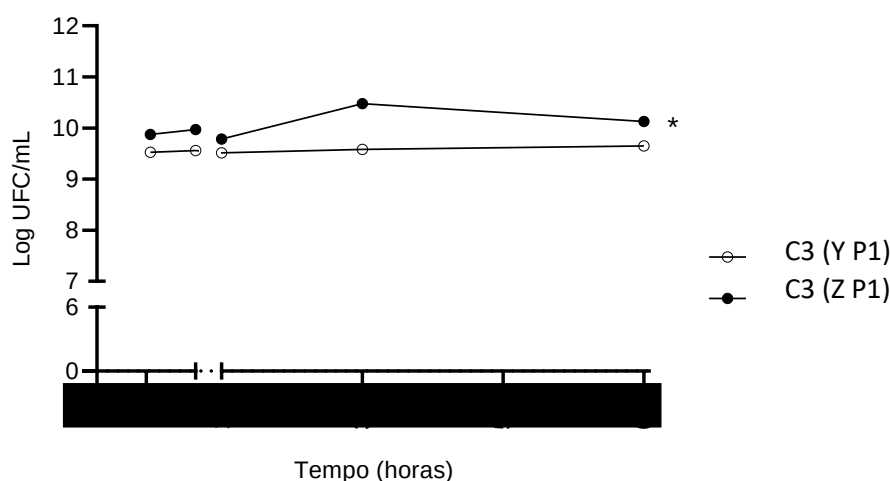


Figura 20 - Concentração (log UFC/mL) de P1 adicionada ao kefir C3 na proporção de Z e Y, ao longo do armazenamento [REDACTED]. As bebidas fermentadas foram preparadas com culturas recém desidratadas (T0 dias). O asterisco indica diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos.

5.5.2. Físico-química

- pH

O pH das bebidas preparadas com C1 e C3 foi determinado a fim de avaliar a capacidade de acidificação das culturas, bem como a pós-acidificação ao longo do armazenamento [REDACTED]. Ao analisar a figura 21, observa-se queda mais acentuada do pH do leite (de $\sim 6,55$ para $\sim 4,60$) durante as [REDACTED] horas de fermentação para todas as bebidas preparadas com as culturas iniciadoras, em relação à bebida controle (KLCU). [REDACTED]

[REDACTED] A bebida controle, apesar de ter um processo de acidificação em maior tempo, também manteve o pH sem grande alteração durante o armazenamento, atingindo o valor de $3,85 \pm 0,02$ ao final do período. Para as bebidas preparadas com as culturas iniciadoras, o comportamento de acidificação e pós-acidificação foi similar, durante todo o período avaliado.

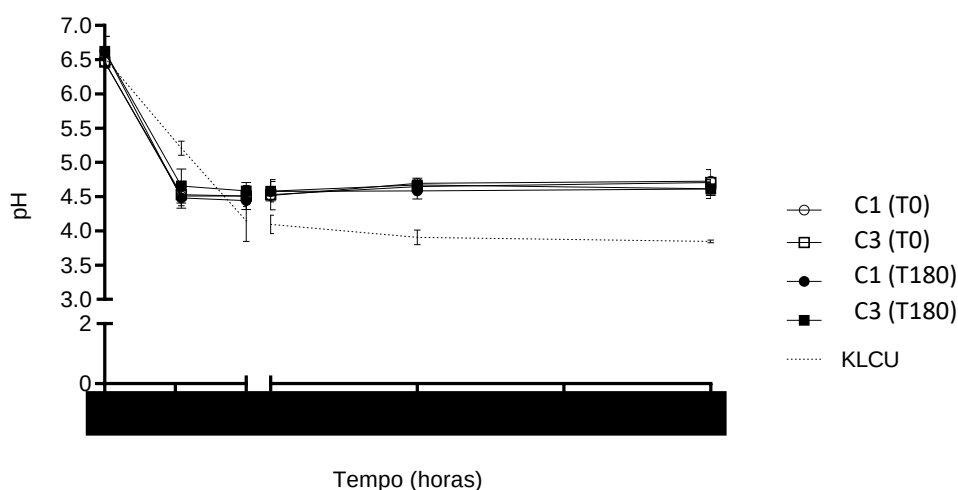


Figura 21 – Perfil de acidificação das bebidas preparadas com inóculo de X das culturas iniciadoras (C1 e C3) recém desidratadas e após 180 dias de armazenamento, ao longo de [REDACTED].

- Composição centesimal

A tabela 6 apresenta os resultados das análises de composição centesimal avaliada para as amostras de kefir de leite (C1, C3 e KLCU) ao longo do armazenamento refrigerado. Como pode ser observado, as bebidas apresentaram porcentagem de umidade de 91% e teor de cinzas variando entre 0,5 e 0,7 mg/mL, valores estes próximos ao identificados para o leite em pó integral utilizado como matéria-prima. O teor de proteínas variou de 2,3 e 2,4 % e o teor de lipídeos entre 2,3 e 2,7%.

Não foi identificada diferença significativa ($p > 0,05$) entre as bebidas C1, C3 e o kefir preparado com os grãos (KLCU), quanto à composição centesimal ao longo do período de armazenamento analisado.

- Compostos orgânicos

Os resultados da concentração dos compostos orgânicos seguem apresentados na tabela 7. Todas as bebidas fermentadas apresentaram menor concentração de lactose, com valores que variaram entre 28 e 36 mg/mL, enquanto para o leite utilizado como substrato este valor foi de 41,5 mg/mL. De modo geral, as bebidas fermentadas apresentaram diminuição do teor de lactose ao longo do período de armazenamento. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) apenas no tempo [REDACTED] para a cultura C1 e a partir do [REDACTED] para C3. O menor teor significativo ($p < 0,05$) de lactose foi identificado para a bebida com a linhagem probiótica, no final do período analisado. Diferentemente, o teor de galactose nas bebidas fermentadas com C1 e C3 foram maiores que o observado para KLCU até o [REDACTED], independente de terem sido

armazenadas ou não as culturas iniciadoras. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre C1 e C3 em T0, sendo superior a concentração de galactose na bebida preparada com a cultura sem a linhagem probiótica ($0,710 \pm 0,132$ mg/mL). Já para KLCU, houve decréscimo do teor deste carboidrato no mesmo período avaliado, chegando ao final do [REDACTED] com $0,214 \pm 0,103$ mg/mL de galactose. As concentrações de galactose variaram entre 0,2 - 0,5 para KLCU, 0,3-0,9 para as bebidas produzidas com as culturas iniciadoras e foi equivalente a $0,347$ mg/mL na matéria prima.

A queda do pH do leite durante a fermentação foi verificada para as bebidas fermentadas, com alteração progressiva de 6,55 a aproximadamente 4,6, como consequência da produção de ácidos. Como pode ser observado na tabela 7, houve aumento do teor de ácido láctico identificado nas amostras após [REDACTED] de fermentação ($> 3,0$ mg/mL) quando comparado ao leite utilizado como matéria prima ($0,341 \pm 0,138$ mg/mL). Considerando ainda este tempo ([REDACTED]), observou-se diferença significativa entre as bebidas C1 e C3 e a bebida KLCU. Ao longo do armazenamento, notou-se aumento numérico da concentração de ácido láctico para todas as bebidas fermentadas. As concentrações máximas de ácido láctico foram encontradas para as bebidas KLCU ($10,413 \pm 1,447$ mg/mL) e C3 (T180) ($10,295 \pm 1,997$ mg/mL) [REDACTED] de armazenamento. O ácido acético também foi quantificado e apresentou concentrações maiores à identificada para o leite ($0,119 \pm 0,039$ mg/mL). Assim como para o ácido láctico, houve aumento numérico das concentrações de ácido acético ao final do [REDACTED], sendo os valores neste tempo significativamente superior para as bebidas preparadas com as culturas iniciadoras armazenadas ou não, em relação à KLCU ($0,716 \pm 0,141$ mg/mL). Os teores máximos de ácido acético foram identificados para C3 em T0 e T180, sendo respectivamente de $1,316 \pm 0,113$ e $1,097 \pm 0,058$ mg/mL.

Nenhuma ou baixas concentrações de etanol foram encontradas para as bebidas C1 (T180), KLCU e C1 (T0). De modo geral, as concentrações de etanol foram aumentando em número ao longo do armazenamento, sendo os maiores valores identificados para KLCU e C1 (T0) no [REDACTED] ($0,571 \pm 0,335$ e $0,559 \pm 0,149$ mg/mL, respectivamente). Estes resultados foram estatisticamente superiores ($p < 0,05$) ao determinado para C3 (T0) ($0,149 \pm 0,005$ mg/mL).

5.5.3. Sensorial

Com os resultados obtidos pelo questionário aplicado a fim de traçar o perfil dos 69 avaliadores que participaram da análise sensorial, foi verificado que 70% eram do sexo feminino e 30% do sexo masculino. Entre os 69 painelistas, 49% tinham entre 18 a 25 anos,

32% entre 25-40 anos e 19% entre 40-60 anos. Dos 81% que consomem de leites fermentados, 36% classificaram como frequente o consumo e 55% como ocasional. Apenas 14 % dos 69 avaliadores marcaram a opção kefir de leite como produto fermentado que já consumiam. Por fim, foi questionado se os painelistas sabiam o que era kefir de leite, 46% responderam sim e 57% que não conheciam a bebida.

A tabela 8 apresenta os resultados quanto a aceitação e intenção de compra das amostras de kefir preparadas com os grãos e culturas iniciadoras. Como foi observado, as médias das pontuações atribuídas para as bebidas preparadas com as culturas iniciadoras foram numericamente maiores quando comparado às determinadas para KLCU. Não foi identificada diferença entre as amostras ($p > 0,05$) quando avaliados os atributos odor e cor, no qual as pontuações médias ficaram entre os termos "gostei muito" e "gostei". No entanto, considerando os atributos avaliados textura e sabor, houve diferença estatística ($p < 0,05$) para as amostras C1 e C3 em relação a KLCU. A relação de aceitabilidade geral das amostras, avaliado pela pontuação para impressão global do produto, permitiu avaliar que C1 e C3 obtiveram pontuações médias que variaram entre os termos "gostei muito" e "gostei", enquanto a bebida KLCU variou entre "gostei" e "nem gostei nem desgostei".

Considerando a intenção de compra dos avaliadores, o kefir preparado com os grãos diferiu estatisticamente ($p < 0,05$) das demais amostras testadas, se enquadrando entre as categorias "Talvez sim/ talvez não" e "provavelmente não compraria". Entre as amostras de kefir preparados com as culturas iniciadoras não foi identificada diferença ($p < 0,05$) e ambas se enquadraram entre as categorias "provavelmente compraria" e "talvez sim/talvez não". Este resultado confirma a maior aceitação destas formulações em relação à bebida KLCU.

Tabela 6 - Características físico-químicas do kefir produzido com grãos (KLCU) ou com culturas iniciadoras (C1 e C3), durante [REDACTED] de armazenamento das bebidas [REDACTED]

Parâmetros	Amostras	Tempo (dias)				
		[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
Umidade (%)	Leite	91,382 ± 0,001	91,382 ± 0,001	91,382 ± 0,001	91,382 ± 0,001	91,382 ± 0,001
	KLCU	91,396 ± 0,313	91,473 ± 0,159	91,763 ± 0,142	91,753 ± 0,129 ^A	91,833 ± 0,061
	C1 (T0)	91,346 ± 0,239	91,318 ± 0,151	91,359 ± 0,111	91,333 ± 0,421 ^B	91,553 ± 0,095
	C3 (T0)	91,312 ± 0,20	91,348 ± 0,053	91,496 ± 0,244	91,502 ± 0,183	91,686 ± 0,140 ^{A'}
	C1 (T180)	91,191 ± 0,053	91,197 ± 0,214	91,118 ± 0,046	91,317 ± 0,166	91,322 ± 0,127
	C3 (T180)	91,091 ± 0,020	91,037 ± 0,171	91,107 ± 0,068	91,230 ± 0,059	91,068 ± 0,020 ^{B'}
Cinzas (mg/100g)	Leite	0,498 ± 0,012	0,498 ± 0,012	0,498 ± 0,012	0,498 ± 0,012	0,498 ± 0,012
	KLCU	0,496 ± 0,026	0,517 ± 0,026	0,530 ± 0,011	0,554 ± 0,012	0,526 ± 0,001 ^B
	C1 (T0)	0,522 ± 0,007 ^a	0,531 ± 0,013 ^a	0,560 ± 0,022 ^a	0,599 ± 0,005 ^{ab}	0,671 ± 0,080 ^{Ab}
	C3 (T0)	0,592 ± 0,087	0,588 ± 0,087	0,591 ± 0,090	0,655 ± 0,007	0,615 ± 0,108 ^{AB}
	C1 (T180)	0,553 ± 0,028 ^a	0,578 ± 0,013 ^{ab}	0,602 ± 0,021 ^{ab}	0,622 ± 0,044 ^{ab}	0,773 ± 0,005 ^b
	C3 (T180)	0,615 ± 0,043	0,635 ± 0,034	0,668 ± 0,056	0,682 ± 0,002	0,711 ± 0,060
Proteína (g/100g)	Leite	2,305 ± 0,019	2,305 ± 0,019	2,305 ± 0,019	2,305 ± 0,019	2,305 ± 0,019
	KLCU	2,289 ± 0,077	2,296 ± 0,020	2,212 ± 0,067	2,166 ± 0,064	2,233 ± 0,035
	C1 (T0)	2,362 ± 0,013 ^{ab}	2,353 ± 0,020 ^{ab}	2,433 ± 0,032 ^a	2,364 ± 0,026 ^{ab}	2,278 ± 0,023 ^b
	C3 (T0)	2,362 ± 0,044	2,325 ± 0,039	2,297 ± 0,072	2,347 ± 0,135	2,386 ± 0,073
	C1 (T180)	2,328 ± 0,050	2,278 ± 0,034	2,284 ± 0,072	2,250 ± 0,033	2,277 ± 0,002
	C3 (T180)	2,389 ± 0,113	2,338 ± 0,072	2,378 ± 0,108	2,380 ± 0,041	2,363 ± 0,025
Lipídeos (g/100g)	Leite	2,525 ± 0,058	2,525 ± 0,058	2,525 ± 0,058	2,525 ± 0,058	2,525 ± 0,058
	KLCU	2,489 ± 0,054	2,593 ± 0,151	2,363 ± 0,140 ^B	2,425 ± 0,095	2,376 ± 0,002
	C1 (T0)	2,715 ± 0,142	2,774 ± 0,076 ^{A'}	2,681 ± 0,120 ^A	2,553 ± 0,157	2,584 ± 0,055
	C3 (T0)	2,625 ± 0,050	2,589 ± 0,142	2,529 ± 0,081 ^{AB}	2,602 ± 0,086	2,683 ± 0,083
	C1 (T180)	2,453 ± 0,117	2,367 ± 0,008 ^{B'}	2,431 ± 0,032	2,563 ± 0,258	2,427 ± 0,097
	C3 (T180)	2,617 ± 0,113	2,545 ± 0,007	2,550 ± 0,018	2,527 ± 0,132	2,414 ± 0,089

a,b: Médias ± SD seguidas por letras minúsculas distintas em uma mesma linha, indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A, B: Médias ± SD seguidas por diferentes letras maiúscula em uma mesma coluna, indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A', B': Médias ± SD seguidas por diferentes letras maiúsculas em uma mesma coluna seguidas por ('), indicam diferença significativa entre os tempos de uma mesma cultura iniciadora, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 7 - Compostos químicos quantificados por análise de HPLC durante produção de kefir pelos grãos (KLCU) ou culturas iniciadoras (C1 e C3), durante 28 dias de armazenamento das bebidas sob refrigeração (5 ± 2 °C).

Composto orgânico (mg/mL)	Amostras	Tempo				
Lactose	Leite	41,527 $\pm$ 0,249	41,527 $\pm$ 0,249	41,527 $\pm$ 0,249	41,527 $\pm$ 0,249	41,527 $\pm$ 0,249
	KLCU	36,079 $\pm$ 0,496 ^a	32,447 $\pm$ 1,854 ^{ab}	30,101 $\pm$ 0,094 ^b	29,251 $\pm$ 0,196 ^b	29,411 $\pm$ 1,536 ^b
	C1 (T0)	35,542 $\pm$ 1,767 ^a	35,323 $\pm$ 1,467 ^a	34,388 $\pm$ 1,336 ^a	32,140 $\pm$ 0,296 ^a	29,351 $\pm$ 1,022 ^{Ab}
	C3 (T0)	35,120 $\pm$ 1,251 ^a	34,494 $\pm$ 1,432 ^a	32,772 $\pm$ 0,664 ^{ab}	30,914 $\pm$ 1,438 ^{ab}	28,919 $\pm$ 0,411 ^{Bb}
	C1 (T180)	34,313 $\pm$ 0,273	34,492 $\pm$ 0,435	33,834 $\pm$ 1,314	33,477 $\pm$ 1,516	31,923 $\pm$ 0,428
	C3 (T180)	35,067 $\pm$ 0,391	33,162 $\pm$ 1,683	32,596 $\pm$ 1,406	32,274 $\pm$ 2,243	31,706 $\pm$ 1,560
Galactose	Leite	0,347 $\pm$ 0,118	0,347 $\pm$ 0,118	0,347 $\pm$ 0,118	0,347 $\pm$ 0,118	0,347 $\pm$ 0,118
	KLCU	0,580 $\pm$ 0,254	0,292 $\pm$ 0,009	0,202 $\pm$ 0,0311 ^B	0,214 $\pm$ 0,052 ^B	0,214 $\pm$ 0,103 ^C
	C1 (T0)	0,338 $\pm$ 0,029	0,351 $\pm$ 0,043	0,449 $\pm$ 0,072 ^A	0,481 $\pm$ 0,044 ^A	0,710 $\pm$ 0,132 ^A
	C3 (T0)	0,409 $\pm$ 0,050 ^a	0,407 $\pm$ 0,001 ^a	0,460 $\pm$ 0,006 ^{Aab}	0,537 $\pm$ 0,112 ^{Aab}	0,571 $\pm$ 0,124 ^{Bb}
	C1 (T180)	0,648 $\pm$ 0,061	0,606 $\pm$ 0,068	0,611 $\pm$ 0,202	0,619 $\pm$ 0,254	0,617 $\pm$ 0,154
	C3 (T180)	0,502 $\pm$ 0,199	0,697 $\pm$ 0,080	0,903 $\pm$ 0,247	0,907 $\pm$ 0,433	1,129 $\pm$ 0,474
Ácido láctico	Leite	0,341 $\pm$ 0,138	0,341 $\pm$ 0,138	0,341 $\pm$ 0,138	0,341 $\pm$ 0,138	0,341 $\pm$ 0,138
	KLCU	3,018 $\pm$ 1,056 ^{Ba}	8,380 $\pm$ 1,890 ^{ab}	8,875 $\pm$ 2,234 ^{ab}	9,687 $\pm$ 2,067 ^{ab}	10,413 $\pm$ 1,447 ^b
	C1 (T0)	6,930 $\pm$ 0,820 ^A	7,230 $\pm$ 0,601	7,828 $\pm$ 0,879	8,360 $\pm$ 0,548	9,076 $\pm$ 1,852
	C3 (T0)	6,853 $\pm$ 0,909 ^A	7,519 $\pm$ 0,926	7,846 $\pm$ 1,449	8,272 $\pm$ 1,125	9,337 $\pm$ 1,307
	C1 (T180)	6,871 $\pm$ 0,291	6,957 $\pm$ 0,040	7,124 $\pm$ 0,238	7,503 $\pm$ 0,643	8,240 $\pm$ 2,277
	C3 (T180)	6,569 $\pm$ 0,211	8,535 $\pm$ 2,841	9,037 $\pm$ 3,148	9,327 $\pm$ 2,817	10,295 $\pm$ 1,997
Ácido acético	Leite	0,119 $\pm$ 0,039	0,119 $\pm$ 0,039	0,119 $\pm$ 0,039	0,119 $\pm$ 0,039	0,119 $\pm$ 0,039
	KLCU	0,606 $\pm$ 0,093 ^{Aa}	0,677 $\pm$ 0,065 ^{ab}	0,715 $\pm$ 0,006 ^b	0,729 $\pm$ 0,052 ^{bc}	0,761 $\pm$ 0,141 ^{Bc}
	C1 (T0)	0,605 $\pm$ 0,116 ^A	0,674 $\pm$ 0,018	0,735 $\pm$ 0,084	0,725 $\pm$ 0,058	0,848 $\pm$ 0,131 ^A
	C3 (T0)	0,272 $\pm$ 0,108 ^B	0,563 $\pm$ 0,099	0,730 $\pm$ 0,089	0,969 $\pm$ 0,149	1,316 $\pm$ 0,113 ^A
	C1 (T180)	0,686 $\pm$ 0,003	0,650 $\pm$ 0,019	0,713 $\pm$ 0,021	0,797 $\pm$ 0,063	0,859 $\pm$ 0,245
	C3 (T180)	0,655 $\pm$ 0,003 ^a	0,705 $\pm$ 0,095 ^{ab}	0,787 $\pm$ 0,086 ^{ab}	0,899 $\pm$ 0,194 ^{ab}	1,097 $\pm$ 0,058 ^b

	Leite	ND	ND	ND	ND	ND
Etanol	KLCU	0,070 ± 0,039	0,078 ± 0,048	0,148 ± 0,053	0,299 ± 0,081	0,571 ± 0,335 ^A
	C1 (T0)	0,084 ± 0,056	0,107 ± 0,070	0,192 ± 0,160	0,325 ± 0,187	0,559 ± 0,149 ^A
	C3 (T0)	0,237 ± 0,128	0,372 ± 0,113	0,323 ± 0,151	0,282 ± 0,112	0,149 ± 0,005 ^B
	C1 (T180)	ND	0,065 ± 0,033	0,264 ± 0,000	0,379 ± 0,000	0,423 ± 0,000
	C3 (T180)	0,271 ± 0,000 ^{ab}	0,106 ± 0,041 ^a	0,207 ± 0,029 ^{ab}	0,252 ± 0,038 ^{ab}	0,452 ± 0,117 ^b

^{a,b}: Médias ± SD seguidas por letras minúsculas distintas em uma mesma linha indicam diferença significativa pelo teste de Tukey (p < 0,05).

^{A, B}: Médias ± SD seguidas por letras maiúsculas distintas em uma mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste de Tukey (p < 0,05).

Tabela 8 - Aceitação sensorial e intenção de compra de formulações de kefir de leite.

Formulação	Textura	Odor	Sabor	Cor	Impressão Global	Intenção de compra
KLCU	3,48 ± 1,11 ^a	3,62 ± 1,08 ^a	3,04 ± 1,34 ^a	4,11 ± 0,81 ^a	3,23 ± 1,18 ^a	2,96 ± 1,21 ^a
C1	4,25 ± 0,79 ^b	3,85 ± 0,86 ^a	3,88 ± 0,88 ^b	4,39 ± 0,67 ^a	4,16 ± 0,80 ^b	3,80 ± 0,97 ^b
C3	4,32 ± 0,83 ^b	3,87 ± 0,93 ^a	3,88 ± 0,91 ^b	4,39 ± 0,69 ^a	4,13 ± 0,82 ^b	3,75 ± 0,99 ^b

^{a,b}: Médias ± SD seguidas por letras distintas em uma mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste de Tukey (p < 0,01).

5.5.4. Efeito da administração oral de kefir preparado com culturas iniciadoras sobre a sobrevivência de camundongos em modelo de infecção por *Salmonella Typhimurium*

Inicialmente, os ensaios *in vivo* foram conduzidos com as bebidas fermentadas com as culturas iniciadoras C1 e C2, preparadas com a adição de Z de inóculo para cada linhagem, seguido de incubação a ■■■ por ■■■. Os dados referentes a este experimento seguem apresentados no Apêndice H. A administração de kefir preparado com a cultura iniciadora C2 proporcionou maior sobrevivência dos animais após infecção com *S. Typhimurium* (80%, $p = 0,0865$) em relação ao grupo controle (que recebeu salina 0,85%) e grupo tratado com KLCU (sobrevivência de 50% em ambos), considerando os 38 dias de experimentação. Em contrapartida, o grupo que recebeu a formulação C1 apresentou queda no percentual de sobreviventes (apenas 20% dos animais sobreviveram, $p = 0,2616$). De maneira geral, os óbitos dos animais se concentraram entre o 6º e 10º dia após infecção por *S. Typhimurium*. Após esse tempo, os animais sobreviventes permaneceram ganhando peso até o final deste ensaio (Apêndice H).

É importante salientar que esse experimento foi realizado com a formulação preparada com a adição concomitante de todas as linhagens no início do processo fermentativo e, portanto, uma eventual inibição da linhagem probiótica por Bac2 não pode ser descartada. Também não pode ser descartada uma inibição da levedura Lev1 pela linhagem probiótica P1. Tais inibições poderiam comprometer um possível efeito protetor da bebida no modelo de infecção por *S. Typhimurium*.

Com a nova proposta de cultura iniciadora, o mesmo ensaio foi realizado com bebidas produzidas com inóculo total de X, seguindo-se incubação a ■■ °C por ■■ horas (tempo necessário de fermentação até ser atingido o pH de 4,6). A contagem de bactérias lácticas totais e leveduras nas bebidas fermentadas que foram administradas ficaram acima de 7,7 e 4,04 log UFC/mL respectivamente, durante todo experimento. Os resultados de sobrevivência dos animais após o desafio com *S. Typhimurium* estão apresentados na figura 22.

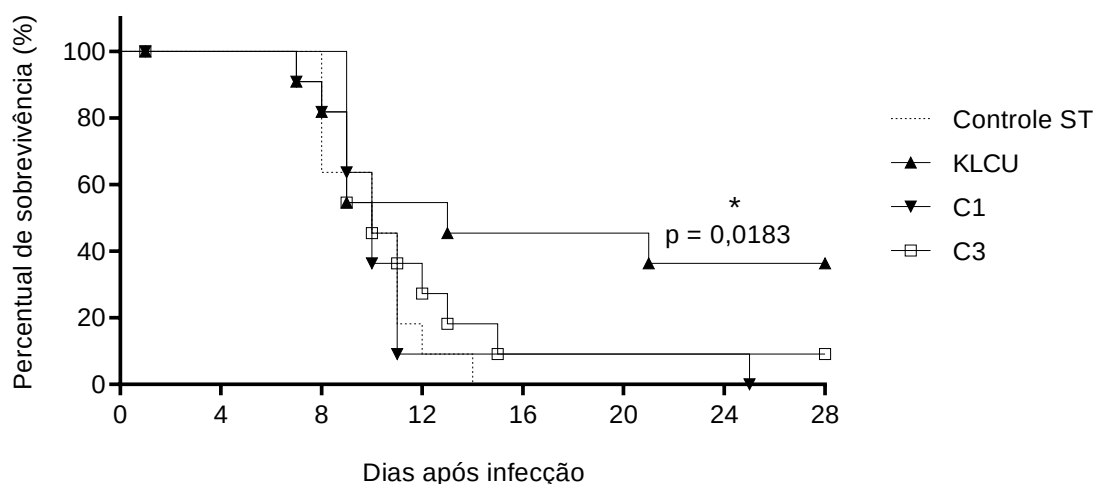


Figura 22 - Percentual (%) de sobrevivência de camundongos Balb/C infectados com *S. Typhimurium*, tratados ou não com kefir preparado com grãos KLCU (▲) ou com as culturas iniciadoras C1 (▼) e C3 (□), (n=11). O asterisco representa diferença significativa ao nível de 5%, identificada pelo Teste de Log-Rank.

Houve diferença estatisticamente significativa ($p = 0,0183$) apenas para o grupo tratado com kefir KLCU, que ao final de 28 dias após a infecção por *S. Typhimurium*, manteve 36,4 % dos animais vivos, diferente do controle em que nenhum animal sobreviveu a infecção. As bebidas fermentadas com as culturas iniciadoras C1 e C3 administradas não ofereceram proteção aos animais desafiados com o patógeno, como demonstrado pelo baixo percentual de sobrevivência (0 % e 9,09 %, para C1 e C3, respectivamente).

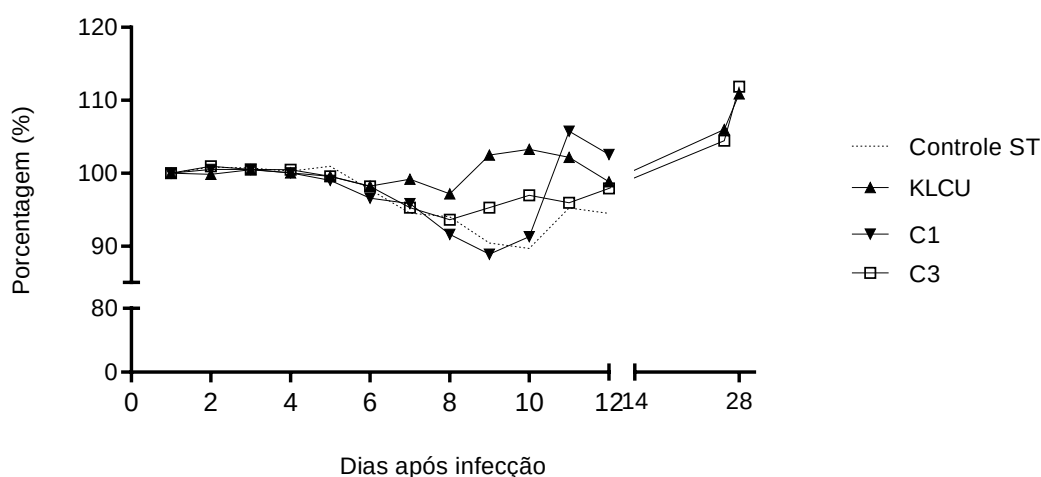


Figura 23 - Variação do peso percentual de camundongos Balb/C tratados ou não com kefir preparado com os grãos de leite de Curitiba KLCU (▲) ou com as culturas iniciadoras C1 (▼) e C3 (□) e desafiados com *S. Typhimurium* (inóculo intragástrico único de 10^5 UFC). Controle ST: grupo somente desafiado com *S. Typhimurium* (---), (n=11).

Quanto à variação do peso dos animais, observou-se menor declínio da média para o grupo que recebeu como tratamento o kefir KLCU. A figura 23 apresenta uma queda a partir do 7º dia após a infecção, data em que ocorreram as primeiras mortes, uma no grupo C1 e outra em KLCU. Os animais que receberam como tratamento a bebida fermentada por C3 apresentaram o primeiro óbito no 9º dia após a infecção (tabela 16, apêndice H). De modo generalizado, os óbitos ocorreram entre os dias 7 e 11 após a infecção. A partir do 14º dia pode-se verificar aumento no peso dos animais sobreviventes, indicando a resolução da infecção.

5.6. Avaliação do potencial probiótico *in vitro* das linhagens Bac2 e Bac3

5.6.1. Aspectos de segurança - atividade hemolítica

As linhagens não apresentaram β -hemólise, ou seja, não foi observada zona clara indicativa de hidrólise em torno das colônias. Assim, ambas atendem aos critérios de segurança para serem utilizadas como potenciais probióticas.

5.6.2. Aspectos funcionais

- Crescimento a 37 °C

Ambas as linhagens cresceram a 37 °C após 24 horas, sendo confirmado através da turvação do caldo MRS. Sendo assim, o critério básico esperado para microrganismos probióticos segundo a FAO/WHO (2002) foi atendido.

- Resistência a sais biliares

A tabela 9 mostra, qualitativamente, o resultado do crescimento das linhagens de bactérias lácticas inoculadas em ágar MRS adicionado de sais biliares. Foi atribuído valor 3 quando se observou crescimento intenso (semelhante ao controle - semeadura em ágar MRS puro), ou seja, o microrganismo não foi afetado pela concentração de sais biliares adicionados ao meio de crescimento. O valor 1 indica crescimento inferior ao controle. De modo geral, as duas linhagens não foram afetadas pela adição de 1,5; 3,0 e 6 mg/mL de sais biliares. No entanto, a concentração de 10 mg/mL reduziu a capacidade de crescimento dos microrganismos. Tabela 9 - Perfil de crescimento das linhagens de Bac2 e Bac3 em ágar MRS acrescido de diferentes concentrações de sais biliares (Oxgall, Difco).

Linhagem	Concentração de Oxgall mg/ML			
	1,5	3	6	10
Bac2	*3	3	3	1
Bac3	3	3	3	1

*Escores: 3 - crescimento intenso; 1 - crescimento moderado; 0 – ausência de crescimento, comparado ao controle (MRS puro).

- Resistência a suco gástrico

O perfil de crescimento das linhagens após a exposição ao suco gástrico artificial segue apresentado na figura 24. Pode-se observar que as linhagens de bactérias lácticas foram afetadas significativamente ($p < 0,05$) pelo baixo pH da solução simulada de suco gástrico ($\text{pH} \sim 2,5$), fato esse que pode ser evidenciado pelo aumento da fase lag de crescimento (2 para 6 horas - Bac2 e 2 para 11 horas - Bac3. Bac2 apresentou maior resistência ($p < 0,05$) quando submetida ao estresse de pH em relação a Bac3. Diante dos resultados apresentados, as linhagens podem ser classificadas em: Bac2, resistente ao suco gástrico (31,01%) e Bac3, sensível (66,98%). Este percentual foi calculado com base na fórmula evidenciada no tópico 4.8.1 (ii).

- Hidrofobicidade

A linhagem Bac2 classificou-se como moderadamente hidrofóbica por apresentar % MATS entre 33% e 66% ($58,71 \pm 14,74$), enquanto Bac3 apresentou característica hidrofílica de superfície, com valor % MATS de $2,32 \pm 1,86$, menor que 33%. Portanto, identificou-se diferença significativa ($p < 0,05$) entre o perfil de hidrofobicidade observado para estes microrganismos.

5.6.3. Aspectos benéficos

- Produção de exopolissacarídeos (EPS)

A produção de EPS foi verificada apenas para a linhagem Bac3 quando estriadas em placas de ágar MRS modificado por substituição de [REDACTED] por [REDACTED] MRS) figura 24.

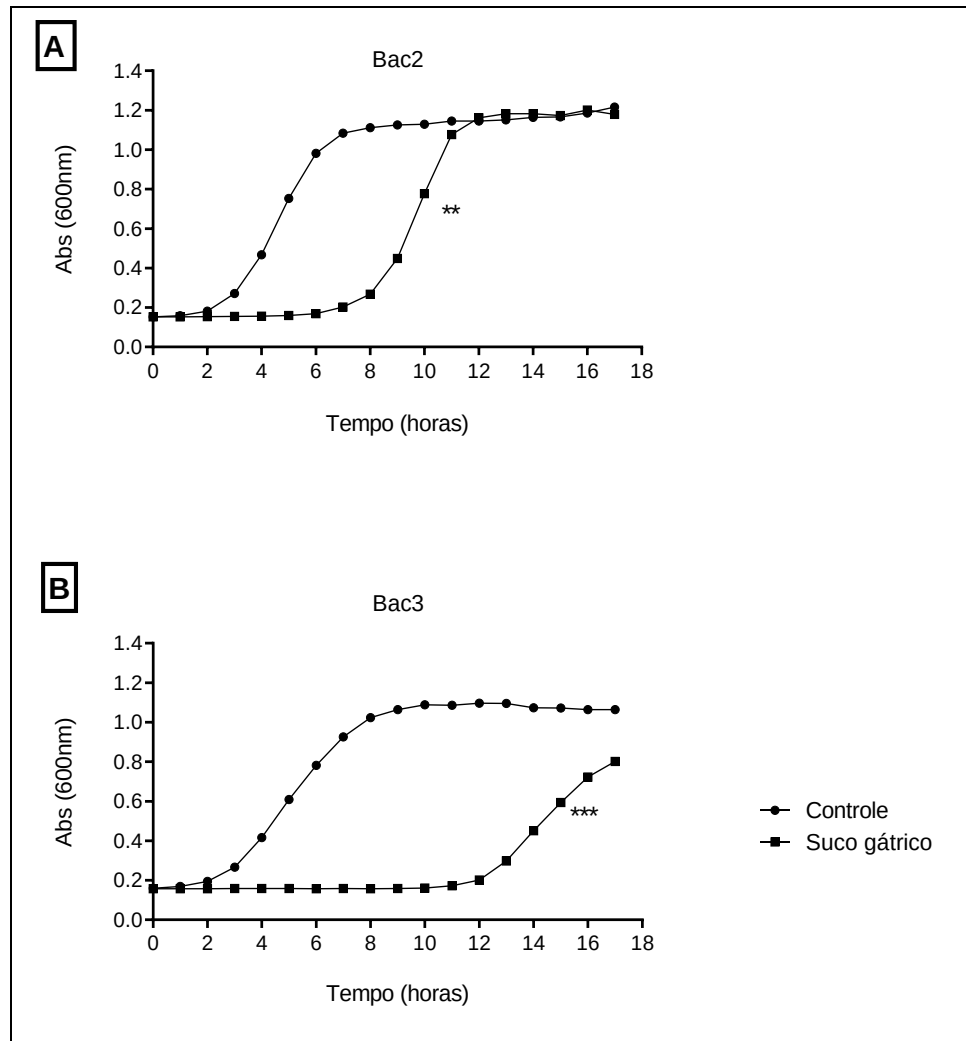


Figura 24 - Perfil de crescimento das linhagens de (A) Bac2 e (B) Bac3 em caldo MRS após 2h de exposição a solução de salina 0,85% (●) ou a solução de suco gástrico simulado (■). Os resultados são médias de leituras da absorbância a 600 nm. Os asteriscos expressam diferenças significativas em relação ao controle de: ** ($p < 0,01$) e *** ($p < 0,001$).

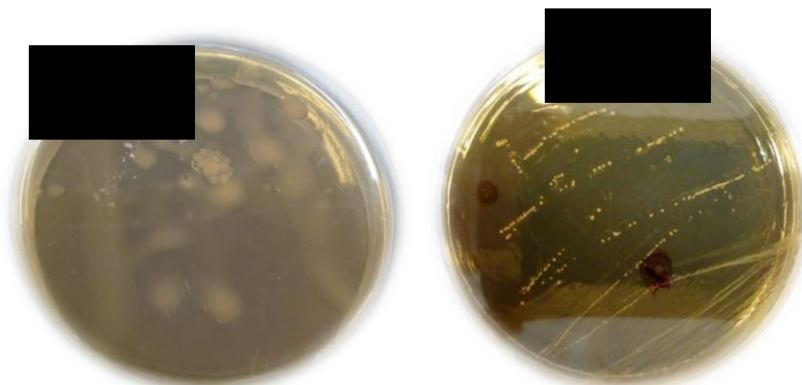


Figura 25 - Colônias mucoides, demonstrando a produção de EPS por Bac3 em MRS

- Antagonismo *in vitro*

A capacidade de inibição do crescimento de patógenos por substâncias resultantes do metabolismo das linhagens das bactérias lácticas também foi testada e o valor médio (mm) dos halos de inibição formados estão organizados na tabela 10. De modo geral, as duas linhagens de bactérias lácticas foram capazes de inibir o crescimento dos microrganismos patogênicos testados. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre a medida dos halos de inibição dos diferentes patógenos por Bac2, enquanto esta diferença ($p < 0,05$) foi identificada para linhagem de Bac3. Os maiores halos formados foram de Bac2 para *S. Typhimurium* ($30,4 \pm 0,87$) e de Bac3 para *E. faecalis* ($28,03 \pm 0,03$). Além disso, também houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as medidas dos halos de inibição dos patógenos *L. monocytogenes* e *S. Typhimurium* causados por Bac2 e Bac3.

- Auto-agregação e co-agregação com patógenos

Para a capacidade agregativa entre as células de uma mesma linhagem, ambos microrganismos apresentaram baixos valores percentuais após repouso de 3 e 5 horas, sendo ainda estatisticamente diferentes entre as linhagens ($p < 0,05$), como pode ser observado na Tabela 11.

De modo geral, as bactérias lácticas apresentaram baixo potencial de co-agregação com os patógenos testados e a porcentagem co-agregada não ultrapassou 40% após 3 horas de exposição. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) na co-agregação de Bac2 e Bac3 com os patógenos, como demonstrado na tabela 9. A maior porcentagem de co-agregação foi entre Bac2 e Bac3 com o patógeno *Pseudomonas aeruginosa* $33,62 \pm 2,81$ e $25,25 \pm 3,24$, respectivamente. Já o menor valor percentual para este ensaio foi observado na presença de *S. Typhimurium* ($14,67 \pm 5,22$ e $3,88 \pm 3,01$) para Bac2 e Bac3, respectivamente.

Tabela 10 - Atividade antimicrobiana (medida pelo diâmetro médio das zonas de inibição em mm) das linhagens de Bac2 e Bac3 contra patógenos.

Linhagem / Antagonista	Halo de inibição (mm)
Bac2 + E.f.	23,78 ± 4,19 ^a
Bac2 + L.m.	22,81 ± 1,39 ^{Aa}
Bac2 + S.a.	18,33 ± 6,68 ^a
Bac2 + P.a.	24,67 ± 4,36 ^a
Bac2 + S.t.	30,40 ± 0,87 ^{Aa}
Bac3 + E.f.	28,03 ± 0,03 ^a
Bac3 + L.m.	15,12 ± 0,42 ^{Bb}
Bac3 + S.a.	25,37 ± 4,79 ^a
Bac3 + P.a.	14,96 ± 0,60 ^b
Bac3 + S.t.	15,78 ± 1,03 ^{Bb}

^{a,b} Médias ± desvio padrão seguidos de diferentes letras minúsculas representam diferença significativa pelo teste de Tukey a 0,05%, entre os patógenos utilizados no ensaio.

^{A,B} Médias ± desvio padrão seguidos de diferentes letras maiúsculas representam diferença significativa pelo teste t a 0,05%, em relação as linhagens Bac2 e Bac3, para um mesmo patógeno testado.

E.f.: *Enterococcus faecalis*; L.m.: *Listeria monocytogenes*; S.a.: *Staphylococcus aureus*; P.a.: *Pseudomonas aeruginosa*; S.t.: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar. Typhimurium.

Tabela 11 - Porcentagem (%) de auto-agregação e co-agregação com bactérias patogênicas de Bac2 e Bac3.

Linhagem	Auto-agregação ($\mu \pm DP$)		Co-agregação ($\mu \pm DP$)				
	(T3)	(T5)	S.t.	S.a.	P.a.	E.f.	L.m.
Bac2	$6,68 \pm 1,22^a$	$15,71 \pm 2,18^a$	$14,67 \pm 5,22^{Aba}$	$22,76 \pm 2,07^{Ba}$	$33,62 \pm 2,81^{Aa}$	$22,11 \pm 1,68^{Ba}$	$16,54 \pm 5,37^{Aba}$
Bac3	$1,10 \pm 1,31^b$	$21,52 \pm 8,05^a$	$3,88 \pm 3,01^{BCb}$	$6,87 \pm 1,17^{BCb}$	$25,25 \pm 3,24^{Ab}$	$14,02 \pm 3,69^{BCb}$	$9,05 \pm 2,97^{BCb}$

^{a,b} Média $\pm$ desvio padrão seguidos de diferentes letras minúsculas em uma mesma coluna, representam diferença significativa entre as linhagens pelo teste de t a 0,05%.

^{A,B} Média $\pm$ desvio padrão seguidos de diferentes letras maiúsculas em uma mesma linha, representam diferença significativa pelo teste de Tukey a 0,05% entre os patógenos utilizados no ensaio.

E.f.: *Enterococcus fecalis*; L.m.: *Listeria monocytogenes*; S.a.: *Staphylococcus aureus*; P.a.: *Pseudomonas aeruginosa*; S.t.: *Salmonella enterica subsp. enterica* sorovar. Typhimurium.

(T3); (T5): tempos de exposição de 3 e 5 horas.

5.7. Efeito da administração oral de Bac2 e Bac3 liofilizadas sobre a sobrevivência de camundongos em modelo de infecção por *Salmonella Typhimurium*

As curvas de sobrevivência dos animais tratados ou não com as linhagens de *Bac2* e *Bac3* que foram desafiados com *S. Typhimurium* podem ser observadas na figura 25. Os resultados demonstram efeito protetor diferenciado entre as amostras administradas diariamente por via intragástrica. A linhagem *Bac2* foi capaz de aumentar significativamente a sobrevivência dos animais (80% de sobrevivência; $p = 0,0004$) quando comparado ao grupo somente desafiado com *S. Typhimurium* e tratado com solução salina 0,85% (10% de sobrevivência). Os animais que receberam a linhagem *Bac3* por sua vez, apresentaram moderado aumento da porcentagem de sobrevivência (30% vivos; $p = 0,3197$) em relação ao grupo controle.

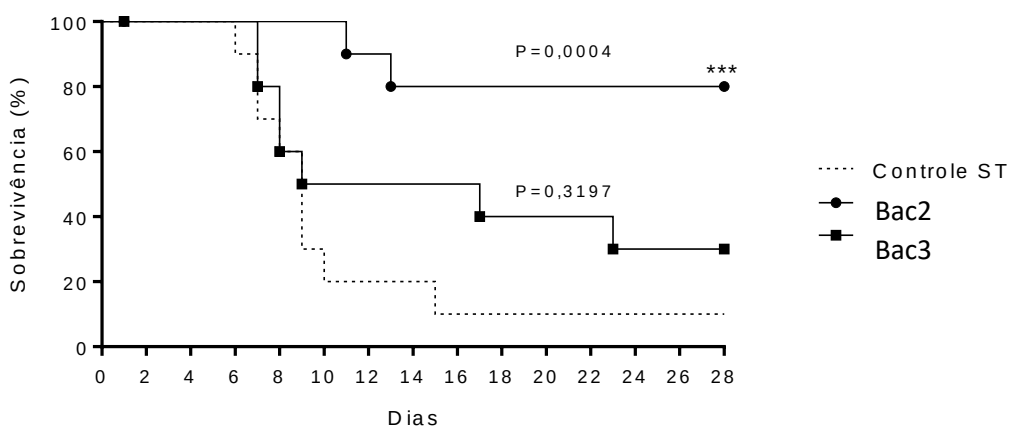


Figura 26 - Sobrevivência (%) de camundongos Balb/C tratados ou não com as linhagens *Bac2* (●) e *Bac3* (■) isolados de grãos de kefir de leite, e desafiados com *S. Typhimurium* (inóculo intragástrico único de 10^5 UFC). Controle ST: grupo somente desafiado com *S. Typhimurium* que recebeu salina ao longo de 38 dias de experimento. *** ($p < 0,001$). Teste Log-Rank (Mantel-Cox), ($n=10$).

A evolução média do peso dos animais de cada grupo segue apresentada na figura 26. Nota-se aumento médio do peso nos primeiros dez dias do experimento para todos os grupos, antes da infecção por *S. Typhimurium* (dados não apresentados). A partir do 12º dia, houve queda na média dos pesos dos animais vivos das amostras controle e *Bac3*, o que não foi observado para a amostra *Bac2* (figura 25). Com relação a data dos óbitos, os primeiros registros foram para o grupo controle no 6º dia após a infecção e no 7º e 11º dia após a infecção para os grupos tratados com as linhagens *Bac3* e *Bac2*, respectivamente. De modo geral, os óbitos ocorreram entre o 6º e 10º dia após infecção (Apêndice J). Os animais que sobreviveram

continuaram ganhando peso até o final do experimento, como pode ser observado pela curva ascendente da figura 27.

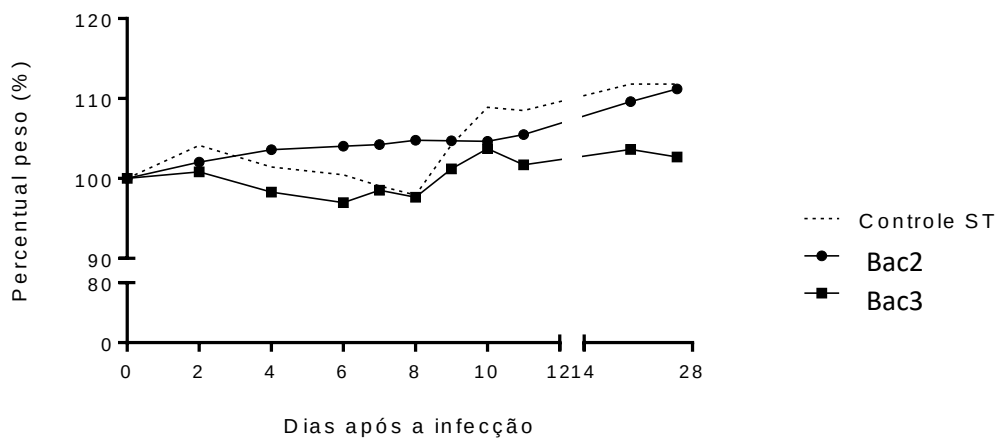


Figura 27 - Variação média do percentual de peso de camundongos Balb/C tratados ou não com as linhagens Bac2 (●) e Bac3 (■) isolados de grãos de kefir de leite e desafiados com *S. Typhimurium* (inóculo intragástrico único de 10^5 UFC). Controle ST: grupo somente desafiado com *S. Typhimurium* (---), (n=10).

Considerando todos os resultados dos ensaios *in vitro* e *in vivo*, conclui-se que a linhagem Bac2 possui potencial probiótico. O mesmo não pode ser afirmado para linhagem Bac3.

6. DISCUSSÃO

O kefir se tornou um leite fermentado popular que passou a ser introduzido na dieta humana e o seu consumo se destacou em diversas regiões do mundo, como no sudoeste da Ásia, América do Norte, Japão, países da Europa Oriental (Rattray e O'Connell, 2011; Nielsen et al., 2014; Arslan, 2015) e sobretudo no Brasil. Esta bebida fermentada continua sendo alvo, desde a última década, de diversas pesquisas na tentativa de maior conhecimento não só da formação e composição microbiológica dos grãos (Gao et al., 2013; Zanirati et al., 2015; Gao et al., 2018), mas também da bebida fermentada (Leite et al., 2013; Villanoeva, 2016; Gao et al., 2018). Pesquisadores buscam desde então, compreender a relação existente entre os microrganismos envolvidos na fermentação e os benefícios advindos do consumo de kefir.

Culturas desidratadas por processos como liofilização e *spray drying* (sendo a liofilização o processo mais comercialmente desenvolvido) oferecem maior praticidade e reduz os gastos com transporte (Peighambardoust et al., 2011).

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

Desta forma, o uso de crioprotetores na liofilização e materiais carreadores na secagem em *spray dryer* tem por finalidade minimizar os danos celulares causados por estes processos

(Boza et al., 2004; Chen et al., 2006; Morgan et al., 2006; Meng et al., 2008; Peighambardous et al., 2011; Mendonza et al., 2013). Existe a preferência pelo uso de açúcares como glicose, frutose, lactose, maltose, trealose e sacarose como agentes protetores por serem substâncias inócuas, com preço relativamente baixo e já utilizados na indústria de alimentos.

Os dissacarídeos são capazes de substituir moléculas de água perdidas durante a desidratação, acumulando dentro das células e equilibrando o ambiente interno e externo quanto à pressão osmótica. Além disso, estabilizam e preservam estruturas como a bicamada lipídica, através de ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxila dos açúcares e grupos fosfato da bicamada lipídica (Chen et al., 2006; Meng et al., 2006; Santivarangkna et al., 2008; Morgan et al., 2008; Peighambardoust et al., 2011; Mendonza et al., 2013). O leite desnatado também estabiliza constituintes de membranas e as suas proteínas desempenham função de revestimento, protegendo assim as células (Santivarangkna et al., 2008; Peighambardoust et al., 2011; Huang et al., 2017). Diante dos diferentes mecanismos de proteção, a combinação entre crioprotetores pode ser mais eficiente que o seu uso isolado (Meng et al, 2006).

A liofilização empregando [REDACTED] adicionado de [REDACTED] [REDACTED] foi a condição mais efetiva para a manutenção de células viáveis ao final de seis meses [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED]

A resistência aos processos de desidratação e a eficiência do material protetor para preservação da viabilidade de microrganismos são influenciados diretamente pela espécie/linhagem avaliada (Carvalho et al., 2004; Berner e Viernstein, 2006; Santivarangkna et al., 2007; Mendonza et al, 2013; Triathi e Giri, 2014; Huang et al. 2017). Este comportamento foi observado não só neste trabalho, mas também em anteriores, com isolados de grãos de kefir brasileiros de leite e de água (Abatemarco, 2016; Costa et al., 2019). Considerando os resultados alcançados e o menor custo de II comparado à III, optou-se neste trabalho pelo II como crioprotetor aplicado na liofilização das culturas iniciadoras destinadas à elaboração do kefir de leite.

A secagem em *spray dryer* pode ser vantajosa pela velocidade, capacidade contínua do processo e menor custo (Meng et al., 2006; Morgan et al., 2008; Peighambardoust et al., 2011; Schuck et al., 2016; Huang et al., 2017). Segundo Huang et al., (2017), equipamentos de secagem em escala industrial possuem dispositivos que realizam o resfriamento contínuo dos pós, aumentando assim a viabilidade dos microrganismos e preservando sua atividade metabólica.

Trabalhos já foram realizados a fim de produzir kefir a partir do uso da própria bebida fermentada (Simova et al., 2002), com combinações de microrganismos isolados dos grãos de kefir (Assadi et al., 2000; Nambou et al., 2014) adicionados de cultura iniciadora de iogurte (Beshkova et al., 2002) ou ainda isolados imobilizados em microesferas de alginato (Chen et al., 2009). Existem os que avaliaram kefir preparado com culturas comerciais (Sarлак et al., 2017) e ainda quem estudou técnicas de desidratação da bebida kefir por liofilização (Papavasiliou et al., 2008) ou *spray dryer* (Teijeiro et al., 2018), para aplicação dos produtos desidratados como culturas iniciadoras para produção industrial de kefir. Todavia, esta é a primeira pesquisa que tem por objetivo buscar obter cultura iniciadora desidratada de kefir de leite a partir de isolados de grãos de kefir, além de testar a capacidade desta bebida como veículo para uma bactéria potencialmente probiótica, P1. O gênero *Weissella* já foi relatado em outros estudos como parte da microbiota de kefir (Gao et al., 2013; Asrlan, 2015), no entanto, não foi detectada a presença desse gênero bacteriano nos grãos de kefir utilizados para o isolamento das linhagens selecionadas para este estudo (Zanirati et al., 2015; Villanoeva, 2016; Rios, 2020).

De maneira semelhante a este estudo, uma linhagem de *Lacticaseibacillus casei* subsp. *paracasei* (SS1689) também apresentou elevado valor de pH (5,78), dentre as bactérias ácido lácticas avaliadas. Li et al., (2020) identificaram 55 linhagens de *Lc. lactis* que inoculadas na concentração de 10^6

UFC/mL em leite integral, atingiram o pH de 4,6 após 12 horas de fermentação. Outros 190 isolados terminaram a fermentação em 32 horas. Diante da diversidade de comportamentos já observados para as bactérias ácido lácticas nos processos de fermentação do leite, ressalta-se a importância de avaliar a capacidade isolada de cada linhagem. Isolados com alta capacidade de fermentação são selecionados como culturas iniciadoras na indústria de alimentos e aqueles com baixa/média produção de ácidos são utilizados por melhorarem os atributos sensoriais dos produtos (Ayad et al., 2004; Li et al., 2020).

Quando os grãos de kefir são utilizados como inóculo, a proporção adicionada em leite ou outros substratos variam entre 2-10% m/v (Wszolek et al., 2001). A fermentação com os grãos normalmente dura cerca de 24-48 horas, mas é interesse da indústria que ocorra mais rapidamente, visando minimizar os gastos na produção. Quando o foco é a produção de kefir a partir de culturas iniciadoras, a proporção de inóculo é menor, pois as mesmas são desidratadas e concentradas, como a cultura DVS utilizada por Glibowski e Kowalska (2010), adicionada na proporção de 0,003% p/p ao substrato. Gul et al. (2015) utilizaram 0,0025% da cultura comercial incubada a 24 °C por 18 horas. Neste estudo, foram testadas três proporções de inóculo para elaboração de kefir de leite com as linhagens selecionadas, considerando como final da fermentação o momento em que o pH de 4,6 foi atingido (Guzel-Seydim et al., 2005; Nambou et al., 2014; Barukcic et al., 2017; Kazou et al., 2021). Em todas as concentrações de inóculo, o ponto final da fermentação foi atingido em tempos inferiores ao obtido com o inóculo dos grãos.

No mercado já é comercializada a cultura liofilizada *FD-DVS Exact Kefir 1* da *Christian Hansen*, com os seguintes microrganismos: levedura *Debaryomyces hansenii* e as bactérias lácticas *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, *Lc. lactis* subsp. *lactis*, *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *S. thermophilus* e *Leuconostoc* (Chr. Hansen, 2012). Esta cultura foi produzida para ser adicionada diretamente nos tanques de fermentação, com possibilidades de incubação em diferentes temperaturas (25, 30 e 35 °C). Segundo as informações do produto, a curva de acidificação se assemelha muito a observada para os inóculos Z, Y e X deste estudo. Quando incubada a 30 °C e 25 °C, a cultura iniciadora da *Christian Hansen* atinge pH de 4,6 em torno de 14 e 15 horas, respectivamente. [REDACTED]

[REDACTED] Diante dos resultados obtidos, optou-se pelo inóculo de X para o preparo de kefir de leite, pois a escolha representa economia na produção de kefir, visto a pequena diferença do tempo de fermentação comparado aos demais inóculos. [REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

Segundo o *Codex Alimentarius* (FAO/WHO, 2018) e a legislação brasileira (Brasil, 2007), o kefir deve apresentar a concentração mínima de bactérias lácticas totais e leveduras de 7,0 e 4,0 log UFC/g ou mL, respectivamente. A enumeração da levedura na bebida C2 com diferentes proporções de inóculo revelou valores inferiores a este limite ($< 3,0$ UFC/mL), o que nos levou a pensar em possível inibição da levedura por P1, adicionada em substituição a Bac1 na bebida C1 antes da fermentação. Estes resultados foram reforçados pelo teste de antagonismo *in vitro* entre as linhagens constituintes das culturas iniciadoras (tabela 18, apêndice L).

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]. A adição de linhagens probióticas após o processo fermentativo de bebidas lácteas não é um fato novo. Alguns processos de fermentação de iogurte probiótico optam pela adição de bactérias do gênero *Bifidobacterium* após a fermentação, com a finalidade de melhorar as propriedades sensoriais e o processo (Prasanna et al., 2012).

Parâmetros físico-químicos das formulações C1 e C3 também foram avaliados e os resultados comparados com o kefir controle (KLCU). Os valores de pH das formulações C1 e C3 ficaram acima do observado para KLCU ($3,85 \pm 0,02$), porém dentro do esperado para kefir, durante o [REDACTED]. Essa diferença possivelmente se deve a maior concentração e diversidade de microrganismos presente nos grãos de kefir quando comparados às culturas iniciadoras. A alta atividade proteolítica das culturas também pode diminuir a acidez, mesmo quando as bebidas são armazenadas em baixas temperaturas (Lim et al., 2019), fenômeno esse que não ocorreu em nenhuma das bebidas produzidas.

Independentemente de ter havido ou não o armazenamento da cultura iniciadora após a desidratação, os valores de pH para as bebidas em todos os tempos avaliados foram semelhantes ($p > 0,05$). Isso demonstra que as condições de liofilização e manutenção das linhagens desidratadas por seis meses foram apropriadas para manter a capacidade metabólica destas. A pós-acidificação além da sua faixa ideal é um processo indesejável nos produtos fermentados, pois além de encurtar a vida de prateleira do produto, gera defeitos como acidez

elevada, sinérese, alteração nas contagens de bactérias do ácido láctico e prejudica a estabilidade de probióticos incorporados e a análise sensorial dos produtos (Deshwal et al., 2021; Kim et al., 2020; Settachaimongkon, et al., 2016).

Vimercati et al. (2020) e Silva et al. (2018) avaliando a composição centesimal de kefir preparado com grãos de kefir determinaram os teores de lipídeos e cinzas próximos aos observados neste estudo, 2,4 - 2,7% e 0,4 - 0,6%, respectivamente. Considerando o teor de lipídios, nossas amostras de kefir foram classificadas como parcialmente desnatadas, segundo a Instrução Normativa N°46 (2007) que preconiza também a presença de no mínimo 2,9 g/100g de proteínas lácteas para o kefir de leite. O teor de proteínas determinado para C1, C3 e KLCU ficou abaixo do estabelecido pela legislação (2,3 - 2,4), o que não é incomum de ocorrer. Valente et al. (2021) também não identificaram nenhuma amostra de leite de cabra fermentado por linhagens de *Lactobacillus* isolados de queijo Minas artesanal, com teor de proteínas que atende a este parâmetro. Entretanto, a adição de açúcar ou saborização destes produtos, ou ainda o ajuste do teor de sólidos totais através da adição de maior proporção de leite em pó ou soro de leite, pode contribuir para que o produto fique de acordo com o estabelecido pela legislação. Novamente, a influência da atividade proteolítica das culturas iniciadoras, bem como o processo de hidrólise da caseína durante o armazenamento, pode interferir no teor de proteínas do produto (Ahmed; Razing, 2017). De acordo com Salva et al., (2011) a proteólise pode ocorrer por influência de vários fatores, como a própria atividade de enzimas bacterianas produzidas por bactérias lácticas.

Durante e após a fermentação do leite, seja com os grãos de kefir ou culturas iniciadoras comerciais, ocorre a formação de compostos orgânicos como consequência da decomposição de açúcares pelas bactérias lácticas e leveduras, com produção de ácido láctico, ácido acético, CO₂, etanol e compostos aromáticos que caracterizam o kefir de leite (Guzel-Seydim et al., 2000; Grønnevik et al., 2011). Assim como esperado e demonstrado por Leite et al. (2013), o teor de lactose diminuiu e de galactose aumentou ao longo do armazenamento refrigerado para as amostras fermentadas em relação ao leite, devido a atividade metabólica dos microrganismos presentes na cultura iniciadora e nos grãos de kefir (KLCU), responsáveis pela produção de ácido láctico. O Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos (Brasil, 2007) estabelece que a acidez em gramas de ácido láctico para cada 100g do produto kefir não deve exceder 2,0%. Todas as amostras apresentaram concentrações de ácido

lático que atendem a este critério, durante todo período experimental, sendo o maior valor experimental equivalente a 10,413 (KLCU - T28d), que corresponde cerca de 1,04.

As concentrações de ácido acético das bebidas fermentadas com as culturas iniciadoras foram próximas ao valor determinado para amostra controle (KLCU). A produção de ácido acético pode ser consequência da presença de bactérias ácido acéticas, que metabolizam parte do etanol produzido, ou ainda, por oxidação de etanol pelas bactérias lácticas heterofermentadoras (Grønnevik et al., 2011; Magalhães et al., 2011; Nambou et al., 2014; Göçer; Koptagel, 2022). Devido à ausência de bactérias acéticas nas culturas iniciadoras deste estudo, a presença de ácido acético foi provavelmente resultante do metabolismo heterolático da linhagem *Bac3*, pela oxidação do ácido lático. Notou-se ainda maior teor deste composto para as bebidas fermentadas por C3 (com adição da linhagem P1 após a fermentação), [REDACTED]. Este microrganismo liofilizado adicionado apenas com a finalidade probiótica, apresentou atividade metabólica mesmo sob refrigeração tanto para T0, quanto para T180 dias.

O genoma da linhagem heterofermentadora P1 foi analisado usando as ferramentas disponíveis no site NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), no domínio DDBJ/ENA/Genbank sob o número de acesso SGAX000000000. Através da anotação automática do genoma pelo NCBI foram buscados genes para enzimas envolvidas no metabolismo de ácido acético e etanol, sendo alguns encontrados. Assim, foi realizada a análise do genoma através da ferramenta KAAS (KEGG Automatic Annotation Server) (Moriya et al., 2007), com auto anotação funcional a partir do banco de dados, acurado manualmente, KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (Kanehisa et al., 2022)), em que foram gerados KO (KEGG Orthology) e a produção de mapas das possíveis vias presentes na bactéria, de acordo com as proteínas homologas encontradas. A ferramenta conseguiu detectar a presença de genes que codificam enzimas que participam da produção de acetato e de etanol, ambos participando da via da glicólise, tendo seu fim nas proteínas acetato quinase e em álcool desidrogenase com os códigos de acesso, respectivamente, RZQ59203.1 e RZQ57870.1.

De modo geral, o teor de etanol aumentou ao longo do armazenamento refrigerado, exceto para C3 no [REDACTED], no qual foi identificado diminuição ($p < 0,05$) na concentração. O metabolismo de [REDACTED] é o maior responsável pela produção de etanol [REDACTED]. No entanto, espécies de bactérias heterofermentadoras também são capazes de produzi-lo, como *Lentilactobacillus kefir* [REDACTED], por apresentarem atividade da enzima álcool desidrogenase, responsável pela conversão de acetaldeído em etanol

(Güzel-Seydim et al., 2000; Magalhães et al., 2011; Leite et al., 2013). A legislação brasileira determina que a porcentagem de etanol nas bebidas esteja entre 0,5 e 1,5 % m/v, o que não é especificado no documento de padronização internacional de alimentos da Organização Mundial de Saúde (OMS) e Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO). Guzel-Seydim et al, (2011) determinaram que compostos como dióxido de carbono, ácido láctico, acetaldeído, acetoína e pequenas frações de etanol, contribuem para propriedades sensoriais únicas encontradas no kefir.

A análise sensorial foi realizada com as bebidas C1 e C3 fermentadas por culturas iniciadoras recém-liofilizadas (T0). Todas as bebidas foram produzidas e armazenadas durante 7 dias, até a confirmação da qualidade microbiológica das amostras, baseado no estabelecido pela RDC 724 e IN nº 161 (Brasil, 2022) para produtos os lácteos fermentados avaliados no comércio e no que é preconizado pelo MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) no RTIQ Leites Fermentados – IN 46/2007. A avaliação dos parâmetros (textura, sabor e impressão global) demonstrou melhor aceitação dos avaliadores pelas bebidas preparadas com as culturas iniciadoras. Gul et al. (2018) também identificaram maior pontuação sensorial para kefir de leite de búfala fermentado com culturas iniciadoras e menor com os grãos de kefir. A preferência por C1 e C3 foi também reforçada pelo teste de intenção de compra, em que as notas médias ficaram entre 3-4, indicando que provavelmente estes produtos seriam comprados.

Através do questionário aplicado foi possível observar a baixa popularidade do kefir de leite pelos avaliadores, mesmo conhecendo os benefícios relacionados ao seu consumo. Em um estudo realizado por O'Brien et al. (2017) foi determinado que quando os benefícios à saúde devido ao consumo de kefir foram esclarecidos aos avaliadores, as bebidas receberam pontuações mais elevadas quanto avaliaram quanto ao gosto e intenção de compra do produto. Neste estudo, dos 46% que afirmaram conhecer o que é kefir de leite, apenas 19% faziam consumo do produto. A baixa popularidade foi identificada por Vimercati et al. (2020), ao estudarem as propriedades sensoriais de kefir de leite com sabor de café. Apesar da baixa popularidade do kefir de leite, as bebidas propostas neste estudo foram bem aceitas pelos avaliadores e os resultados são muito promissores considerando uma possível comercialização da bebida. Vale ressaltar que ainda se faz necessário a avaliação de C1 e C3 quanto à aceitação e intenção de compra em diferentes períodos de [REDACTED] T14 e T28 dias). Irigoyen et al., (2005) avaliaram o perfil de aceitação sensorial de kefir preparado com inóculos de 1 e 5% de grãos e observaram que a intensidade de sabor aumentou durante o armazenamento

refrigerado e refletiu na aceitabilidade do produto pelos avaliadores. Os autores relevaram níveis máximos de aceitação do produto nos primeiros 2 dias de armazenamento.

A adição da linhagem probiótica ao kefir C3 não afetou de maneira significativa as características microbiológicas, físico-químicas e sensoriais da bebida, quando comparado à bebida C1, exceto para a concentração de etanol ao final de 28 dias, que foi menor na primeira. Ambas as bebidas tiveram níveis de aceitação e de intenção de compra similares e maiores que a bebida controle KLCU. Tais resultados encorajam o uso do kefir de leite C1 como veículo para P1. A avaliação do efeito protetor da bebida C3 contra infecção por *S. Typhimurium*, demonstrado por Alvim et al., (2016) para a cultura fresca de P1, todavia, resultou em 9,09% de sobrevivência dos animais desafiados. A quantificação da concentração da linhagem de P1 determinada por qPCR demonstrou que a proporção desta linhagem na bebida fermentada não excedeu o 6,69 log UFC/mL, o que pode justificar a ausência de proteção detectada no modelo *in vivo* de salmonelose, uma vez que Alvim et al. (2016) relevaram efeito mediante a administração intragástrica de doses diárias contendo 10^8 UFC/mL de P1. Foi necessário desta maneira, o ajuste da concentração da linhagem na proposta de kefir probiótico (C3) e uma melhor investigação dos efeitos e mecanismos de ação desempenhados por esta bebida fermentada.

Um fato interessante foi que a administração da bebida C2 resultou em 80% de sobrevivência ($p = 0,08$) dos animais desafiados com *S. Typhimurium*. Esse nível de proteção, apesar de não ter sido estatisticamente diferente do grupo controle (que não recebeu nenhuma bebida fermentada), sugere que a maior proporção células de P1 na bebida é realmente necessária para o efeito protetor desta linhagem. Esse resultado também sugere que outros componentes da cultura iniciadora poderiam estar contribuindo para o efeito protetor contra a infecção por *S. Typhimurium*. Já foi demonstrado que os grãos de kefir podem ser fonte para isolamento de uma variedade de microrganismos com potencial probiótico (Golowczyc et al., 2011; Gut et al., 2019).

Decidimos, então,

investigar as linhagens Bac2 e Bac3 quanto as propriedades probióticas por ensaios *in vitro* e *in vivo*.

A linhagem Bac2 exibiu potencial probiótico, segundo resultados demonstrados pelos ensaios *in vitro* e *in vivo* em modelo de febre tifoide, com 80% de sobrevivida. Entretanto, quando administradas as bebidas preparadas com as culturas iniciadoras C1, C2 e C3, o efeito protetor foi observado apenas para o grupo que recebeu a bebida C2. Esse resultado sugere que o efeito protetor identificado na administração da bebida seja devido à presença de P1, mas várias questões ainda necessitam ser respondidas, conforme discutido anteriormente.

Já é de amplo conhecimento científico que, de modo geral, para alcançar os benefícios à saúde do hospedeiro, os probióticos devem estar presentes no produto em quantidades suficientes, entre 10^6 e 10^7 UFC/mL ou g (Matouskava et al., 2021). Trabalhos anteriores identificaram efeito protetor em modelo de salmonelose, mediante a administração de doses do microrganismo probiótico estudado de pelo menos 10^7 UFC/mL (Alvim et al., 2015; Acurcio et al., 2017; Abatermarco et al., 2018, Acurcio, 2020). A RDC 241 de 26 de julho de 2018, que dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos, não apresenta no documento valores mínimos de concentração, como referência, do probiótico. O novo documento apenas considera que as quantidades mínimas sugeridas para obtenção do benefício sejam adequadamente apresentadas por um conjunto de evidências científicas que atestem os benefícios do uso (Brasil, 2018).

Entretanto, em ecologia microbiana, um microrganismo só é capaz de atuar em um local se estiver presente em nível populacional igual ou superiores a 10^7 células viáveis/g ou mL de conteúdo. Considerando que durante a passagem pelo trato gastrointestinal existem adversidades que comprometem a viabilidade do probiótico, tais como os fenômenos de diluição intestinal e a capacidade de sobrevivência no tubo digestivo, o ideal é que o microrganismo esteja presente no produto a ser ingerido em concentrações iguais ou superiores a 10^8 e 10^9 células viáveis/g ou mL (Vieira et al., 2000). Não só a dose, mas também a matriz alimentícia em que o probiótico é veiculado pode exercer influência sobre os benefícios oferecidos pelo seu consumo (Matouskova et al., 2021).

Diante dos resultados da não proteção obtidos nos ensaios de sobrevivência com camundongos Balb/C em modelo de salmonelose (figura 22), uma nova elaboração da bebida C3 foi proposta e certificada a concentração da linhagem probiótica por qPCR. O intuito foi garantir que a concentração da linhagem pudesse estar compreendida na quantidade em que já

foi observada proteção aos animais infectados com *S. Typhimurium*, em trabalhos anteriores do grupo (concentrações entre 10^8 - 10^9 UFC/mL). Vale ressaltar a necessidade de alteração na elaboração da bebida apenas para execução futura de um ensaio *in vivo*, uma vez que o volume de bebida administrado aos animais é de 100 μ L. Considerando o consumo humano, os resultados demonstrados na quantificação apresentados na figura 22, atendem a concentração mínima do probiótico (acima de 10^6 UFC/mL) capaz de exercer algum efeito no hospedeiro, desde que 100 mL da bebida seja consumida diariamente.

7. CONCLUSÃO

Foi desenvolvida, de forma inovadora, uma cultura iniciadora (C1), composta por linhagens microbianas isoladas de grãos de kefir circulantes no Brasil, capaz de produzir uma bebida láctea fermentada semelhante ao kefir produzido de forma tradicional. Esta bebida apresentou características microbiológicas e físico-químicas similares às observadas para a bebida controle, produzida com grãos de kefir provenientes da cidade de Curitiba (KLCU) e estáveis durante o armazenamento refrigerado por 28 dias. O leite fermentado apresentou também melhor perfil de aceitação e intenção de compra nos testes sensoriais que a bebida controle. Nossos resultados demonstram que uso da cultura iniciadora C1 é promissor e esperamos disponibilizá-la para o setor produtivo, para a produção de kefir de forma padronizada em escala industrial.

A linhagem Bac2, que compõe a cultura iniciadora C1, demonstrou potencial probiótico, verificado por ensaios *in vitro* e em modelo murino de febre tifoide. Essa linhagem apresentou, ainda, resistência aos processos de desidratação e ótima capacidade de acidificação do leite. Todas essas características merecem ser melhor investigadas no futuro.

Diferentes concentrações de células de P1 adicionadas à bebida se mantiveram estáveis durante os 28 dias de armazenamento das bebidas. No entanto, outros experimentos precisam ser feitos para se avaliar a manutenção dos efeitos benéficos dessa linhagem após a sua adição à bebida.

8. PERSPECTIVAS

- i. Testar os microrganismos que apresentaram resultados promissores *in vitro* e *in vivo* (Bac2 e P1), bem como as formulações de kefir desenvolvidas neste estudo, em ensaios clínicos com humanos.
- ii. Testar novas concentrações da linhagem potencialmente probiótica sugerida neste estudo (P1) em modelo de febre tifoide.
- iii. Investigar os prováveis mecanismos de ação de kefir adicionado ou não da linhagem probiótica P1 no modelo murino de febre tifoide (translocação de *S. Typhimurium* para fígado e baço, análise histopatológica de porções do trato intestinal e fígado, avaliação dos títulos de imunoglobulina secretada do tipo A no conteúdo intestinal dos animais e expressão relativa de mRNA de genes codificantes de citocinas pró e anti-inflamatórias).
- iv. Testar a adição de outras linhagens com potencial probiótico confirmado, que pertencem a coleção do Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos (LEFM), ao kefir de leite produzido com a cultura iniciadora C1.
- v. Verificar o efeito da ingestão de kefir adicionado da linhagem probiótica P1 em modelos animais de inflamação (p.ex.: mucosite intestinal, obesidade), nos quais a linhagem também já se mostrou eficiente.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABADIAS, M., et al. Survival of the postharvest biocontrol yeast *Candida sake* CPA-1 after dehydration by spray-drying. **Biocontrol science and technology**, v. 15, n. 8, p. 835-846, 2005.
- ABADIAS, M., et al. Viability, efficacy, and storage stability of freeze-dried biocontrol agent *Candida sake* using different protective and rehydration media. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 6, p. 856-861, 2001.
- ABATEMARCO, M. J. **Caracterização funcional e tecnológica de *Lactobacillus* spp. Isolados de grãos de kefir como critério de seleção de linhagens probióticas**. 103p. Dissertação (mestrado em Microbiologia). Universidade Federal de Minas Gerais, 2014.
- ABATEMARCO, M.J., et al. Protective Effect of *Lactobacillus diolivorans* 1Z, isolated from Brazilian kefir, against *Salmonella* enterica serovar Typhimurium in experimental murine models. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 2856, 2018.
- ABDULLA, A. A., et al. Adhesion, self-aggregation and hydrophobicity of six *Lactobacillus* Strains. **Microbiology Research Journal International**, v. 4, n. 4, p. 381-391, 2014.
- ABE, F., et al. Safety evaluation of probiotic bifidobacteria by analysis of mucin degradation activity and translocation ability. **Anaerobe**, v. 16, n. 2, p. 131-136, 2010.
- ACURCIO, L. B., et al. Milk fermented by *Lactobacillus* species from Brazilian artisanal cheese protect germ-free-mice against *Salmonella* Typhimurium infection. **Beneficial Microbes**, v. 8, n. 4, p. 579-588, 2017.
- ACURCIO, L. B. et al. Milk fermented by *Lactobacillus paracasei* NCC 2461 (ST11) modulates the immune response and microbiota to exert its protective effects against *Salmonella* Typhimurium infection in mice. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 12, n. 4, p. 1398-1408, 2020.
- AHMED, J. et al. Effect of levels of buttermilk on quality of set yoghurt. **Journal of Nutrition & Food Sciences**, v. 7, n. 2, 2017.
- ALVIM, L., et al. *Weissella paramesenteroides* P1 reduces gene expression of intestinal cytokines, and hepatic and splenic injuries in a murine model of typhoid fever. **Beneficial Microbes**, v. 7, n. 1, p. 61-73, 2015.
- AMMOR M. S.; MAYO, B. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update. **Meat Science**, v. 76, p. 138–146, 2007.
- ARMAS, F.; CAMPERIO, C.; MARIANELLI, C. *In Vitro* assessment of the probiotic potential of *Bac2* LMG 7930 against ruminant mastitis-causing pathogens. **PLOS ONE**, n. 12, p. e0169543, 2017.
- ARSLAN, S. A review: chemical, microbiological and nutritional characteristics of kefir. *CyTA - Journal of Food*, v. 13, n. 3, p. 340-345, 2015.
- ARSLAN, S.; ERBAS, M.; TONTUL, I.; TOPUZ, A. Microencapsulation of probiotic *Lev1* var. *boulardii* with different wall materials by spray drying. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, n. 1, p. 685-690, 2015.
- ASSADI, M. M.; POURAHMAD, R.; MOAZAMI, N. Use of isolated kefir starter cultures in kefir production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 16, n. 6, p. 541-543, 2000.

ATALAR, I.; DERVISOGLU, M. Optimization of spray drying process parameters for kefir powder using response surface methodology. **LWT-Food Science and Technology**, v. 60, n. 2, p. 751-757, 2014.

AYAD, E. H. E., et al. Selection of wild lactic acid bacteria isolated from traditional Egyptian dairy products according to production and technological criteria. **Food Microbiology**, v. 21, n. 6, p. 715-725, 2004.

BARUKČIĆ, I.; GRACIN, L.; REŽEK JAMBRAK, A.; BOŽANIĆ, R. Comparison of chemical, rheological and sensory properties of kefir produced by kefir grains and commercial kefir starter. **Mljekarstvo**, v. 67, p. 169-176, 2017.

BERNER, D.; VIERNSTEIN, H. Effects of protective agents on the viability of *Lactococcus latis* subjected to freeze-thawing and freezing drying. **Scientina Pharmaceutica**, n. 74, p. 137-149, 2006.

BERNHARD H., et al. Fur: Find unique genomic regions for diagnostic PCR, **Bioinformatics**, v. 37, n. 15, p. 2081-2087, 2021. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btab059>.

BESHKOVA, D. M., et al. Pure cultures for making kefir. **Food Microbiology**, v. 19, n. 5, p. 537-544, 2002.

BOLLA, P. A., et al. Effect of freeze-drying on viability and in vitro probiotic properties of a mixture of lactic acid bacteria and yeasts isolated from kefir. **Journal of Dairy Research**, v. 78, n. 1, p. 15-22, 2011.

BOURRIE, B.C.T., et al. The microbiota and health promoting characteristics of the fermented beverage kefir. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 647, 2016.

BOZA, Y.; BARBIN, D.; SCAMPARINI, A. R. P. Effect of spray-drying on the quality of encapsulated cells of *Beijerinckia* sp. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 10, p. 1275-1284, 2004.

BOZOĞLU, T. F., ÖZILGEN, M., BAKIR, U. Survival kinetics of lactic acid starter cultures during and after freeze drying. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 9, n. 9, p. 531-537, 1987.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 46, de 23 de outubro de 2007. **Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados**. *Diário Oficial da União*. Brasília, DF, 24 de outubro de 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 62 de 26 de agosto de 2003. **Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água**. *Diário Oficial da União*. Brasília, DF, 18 de setembro de 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa n. 68, de 12 de dezembro de 2006. Revogada pela Instrução Normativa n. 68, de 30 de junho de 2018. **Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos**. *Diário Oficial da União*. Brasília, DF, 14 de dezembro de 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa n. 161 de 01 de julho de 2022. **Estabelece as Listas de Padrões Microbiológicos Para Alimentos**. *Diário Oficial da União*. Brasília, DF, 06 de julho de 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC n. 724, de 01 de julho de 2022. **Dispõe sobre os padrões microbiológicos de Alimentos e sua Aplicação**. *Diário Oficial da União*. Brasília, DF, 06 de julho de 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC n. 241 de 26 de julho de 2018. **Dispõe sobre os Requisitos para Comprovação da Segurança e dos Benefícios à Saúde dos Probióticos para Uso em Alimentos.** *Diário Oficial da União*. Brasília, DF, 27 de julho de 2018.

BROECKX, G, et al. Drying techniques of probiotic bacteria as an important step towards the development of novel pharmabiotics. **International Journal of Pharmaceutics**, 505, n. 1, p. 303-318, 2016.

CARNEIRO, R. P. **Desenvolvimento de uma cultura iniciadora para produção de kefir.** 143p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

CARVALHO, A. S., et al. Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v. 14, n. 10, p. 835-847, 2004.

CARVALHO, N. C. de. **Efeito do método de produção de kefir na vida de prateleira e na infecção experimental com *Salmonella Typhimurium* em camundongos.** 134 p. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

CASTRO-BRAVO, N., et al. Interactions of Surface Exopolysaccharides From. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 2426, 2018.

CHAGAS, V. S. **Microencapsulação por spray drying de bactéria láctica com potencial probiótico.** 2018. 47 f. Dissertação (mestrado em Bioquímica e Biologia Molecular). Universidade Federal de São João Del Rei, 2018.

CHEN, H. C.; LIN, C. W.; CHEN, M. J. The effects of freeze drying and rehydration on survival of microorganisms in kefir. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, 2006.

CHEN, T. H., et al. Microbiological and chemical properties of kefir manufactured by entrapped microorganisms isolated from kefir grains. **Journal of Dairy Science**, 92, n. 7, p. 3002-3013, 2009.

CHR. HANSEN, (2012). FD-DVS eXact KEFIR 1. Product information. Version: 2 PI-EU 12.06.2012.

COBEA (2016). **Colégio Brasileiro de Experimentação Animal Legislação e Ética.** Available from: <http://www.cobea.org.br/>.

CODEX ALIMENTARIUS. **Codex standard for fermented milks.** *Codex Stan 243-2003*. Revision, 2018. Roma, 2018.

ÇOMAK GÖÇER, E. M.; KOPTAGEL, E. Microbiological and rheological properties of nut-based beverages fermented with kefir. **Available at SSRN 4156590.**

CONTE, J.; POTOZNIAK, M. J.; TOBE, S. S. Using synthetic oligonucleotides as standards in probe-based qPCR. **Biotechniques**, v. 64, n. 4, p. 177-179, 2018.

COSTA, K. **Avaliação da viabilidade de microrganismos isolados de grãos de kefir submetidos ao processo de liofilização para formulação de culturas iniciadoras.** 120p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, 2019.

DE LEBLANC, A. E. M.; CASTILLO, N. A.; PERDIGON, G. Anti-infective mechanisms induced by a probiotic *Lactobacillus* strain against *Salmonella enterica* serovar. Typhimurium infection. **International Journal of Food Microbiology**, 138, n. 3, p. 223-231, 2010.

DESHWAL, G. K., et al. Review on factors affecting and control of post-acidification in yoghurt and related products. **Trends in Food Science & Technology**, v. 109, p. 499-512, 2021.

DO CARMO, A. P. **Production of Direct Vat Set culture of *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 cultivated in Minas Frescal cheese whey**. 84 f. Dissertação (Mestrado em Associações micorrízicas; Bactérias lácticas e probióticos; Biologia molecular de fungos de interesse) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. **A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue**. 1987.

ERDOGAN, F. S., et al. The effect of kefir produced from natural kefir grains on the intestinal microbial populations and antioxidant capacities of Balb/C mice. **Food Research International (Ottawa, Ont.)**, v. 115, p. 408, 2019.

FADDA, M. E., et al. In vitro screening of *Kluyveromyces* strains isolated from Fiore Sardo cheese for potential use as probiotics. **LWT - Food Science and Technology**, v. 75, p. 100–106, 2017.

FARAG, M. A., et al. The Many Faces of Kefir Fermented Dairy Products: Quality Characteristics, Flavour Chemistry, Nutritional Value, Health Benefits, and Safety. **Nutrients**, 12, n. 2, Jan 2020.

FARNWORTH, E. Kefir - A complex probiotic. **Food Science & Technology Bulletin: Functional Foods**, 2, p. 1-17, 04/01 2005.

FELLOWS, P. J. Freeze drying and freeze concentration. **In: Food Processing Technology** (Fourth edition). Editora Elsevier, 2017. P. 929-945.

FERREIRA, C. L. L. F. Grupo de bactérias lácticas e aplicação tecnológica de bactérias probióticas. **In: Prebióticos e Probióticos – Atualização e Prospecção**. Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2012. p. 1-25.

FONSECA, J. F. et al. Probiotic effect of *Bifidobacterium longum* 5^{1A} and *Weissella paramesenteroides* P1 on gerbils infected with *Giardia lamblia*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 127, n. 4, p. 1184-1191, 2019.

FONTANA, L., et al. Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. **The British journal of nutrition**, 109, p. S35-50, 2013.

FOWLER, A.; TONER, M. Cryo-injury and biopreservation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1066, n. 1, p. 119-135, 2005.

GAO, J., et al. Metagenome analysis of bacterial diversity in Tibetan kefir grains. **European Food Research and Technology**, 236, n. 3, p. 549-556, 2013.

GAO, W.; ZHANG, L. Comparative analysis of the microbial community composition between Tibetan kefir grains and milks. **Food Research International**, 116, p. 137-144, 2019.

GAROFALO, C., et al. Study of kefir drinks produced by backslopping method using kefir grains from Bosnia and Herzegovina: Microbial dynamics and volatilome profile. **Food Research International**, v. 137, p. 109369, 2020.

GARROTE, G. L., ABRAHAM, A. G., ANTONI, G. L. Microbial interactions in kefir: A natural probiotic drink. **Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications**, p. 327, 2010.

GAVA, A. J.; SILVA, C. A. B.; FRIAS, J. R. G. **Tecnologia de alimentos: princípios e aplicações**. São Paulo: Nobel, 2008. p. 309-314.

GLIBOWSKI, P.; KOWALSKA, A. Rheological, texture and sensory properties of kefir with high performance and native inulin. **Journal of Food Engineering**, 111, n. 2, p. 299-304, 2012.

GOLOWCZYC, M. A., et al. Cellular injuries of spray-dried *Lactobacillus* spp. isolated from kefir and their impact on probiotic properties. **International Journal of Food Microbiology**, 144, n. 3, p. 556-560, 2011.

GOLOWCZYC, M. A., et al. Preservation of probiotic strains isolated from kefir by spray drying. **Letters in Applied Microbiology**, 50, n. 1, p. 7-12, 2010.

GOLOWCZYC, M. A., et al. Survival of spray-dried *Lactobacillus* kefir is affected by different protectants and storage conditions. **Biotechnology Letters**, 33, n. 4, p. 681-686, 2011.

GONZÁLEZ, L., et al. Selection of lactic acid bacteria isolated from San Simón da Costa Cheese (PDO) in order to develop an autochthonous starter culture. **Advances in Microbiology**, v. 5, n. 11, p. 748, 2015.

GRØNNEVIK, H.; FALSTAD, M.; NARVHUS, J. A. Microbiological and chemical properties of Norwegian kefir during storage. **International Dairy Journal**, v. 21, n. 9, p. 601-606, 2011.

GUIMARÃES, G. **Seleção de leveduras com potencial probiótico a partir de amostras isoladas de grãos de kefir cultivados em leite e em água com açúcar mascavo**. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Microbiologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2019.

GUL, O., et al. Manufacture and characterization of kefir made from cow and buffalo milk, using kefir grain and starter culture. **Journal of Dairy Science**, 98, n. 3, p. 1517-1525, 2015.

GUT, A. M., et al. Characterization of yeasts isolated from traditional kefir grains for potential probiotic properties. **Journal of Functional Foods**, 58, p. 56-66, 2019.

GUT, A. M., et al. Kefir characteristics and antibacterial properties - Potential applications in control of enteric bacterial infection. **International Dairy Journal**, 118, p. 105021, 2021/07/01/ 2021.

GÜZEL-SEYDIM, Z. B., et al. Determination of organic acids and volatile flavor substances in kefir during fermentation. **Journal of Food composition and Analysis**, v. 13, n. 1, p. 35-43, 2000.

GUZEL-SEYDIM, Z. B., et al. Review: Functional properties of kefir. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 51, n. 3, p. 261-268, 2011.

GUZEL-SEYDIM, Z. B., et al. Turkish kefir and kefir grains: Microbial enumeration and electron microscobic observation. **International Journal of Dairy Technology**, 58, p. 25-29, 2005.

HANSEN, E. B. Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future. **International Journal of Food Microbiology**, v. 78 p. 119-131, 2002.

HATMAL, M. M., et al. Exploring the influence of culture conditions on kefir's anticancer properties. **Journal of Dairy Science**, 101, n. 5, p. 3771-3777, 2018.

HEMME, D., FOUCAUD-SCHEUNEMANN, C. *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. **International Dairy Journal**, v. 14, n. 6, p. 467-494, 2004.

- HIKMETOGLU, M., et al. Changes in carbohydrate profile in kefir fermentation. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 23, p. 100220, 2020.
- HUANG, S., et al. Spray drying of probiotics and other food-grade bacteria: A review. **Trends in Food Science & Technology**, 63, p. 1-17, 2017.
- HUBALEK, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. **Cryobiology**, v. 46, p. 205-229, 2003.
- IRIGOYEN, A., et al. Influence of different technological parameters in the evolution of pH during fermentation of kefir. **Milchwissenschaft**, 58, n. 11-12, p. 631-633, 2003.
- IRIGOYEN, A., et al. Microbiological, physicochemical, and sensory characteristics of kefir during storage. **Food Chemistry**, 90, n. 4, p. 613-620, 2005.
- JOHN, S.; DEESEENTHUM, S. Properties and benefits of kefir - A review. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, 37, p. 275-282, 05/01 2015.
- KANEHISA, M. et al. KEGG for taxonomy-based analysis of pathways and genomes. **Nucleic Acids Research**, 2022.
- KAZOU, M., et al. Zooming into the microbiota of home-made and industrial kefir produced in greece using classical microbiological and amplicon-based metagenomics analyses. **Frontiers in Microbiology**, 12, p. 621069, 2021.
- KIM, D. H., et al. Comparison of traditional and backslipping methods for kefir fermentation based on physicochemical and microbiological characteristics. **Short Communication LWT - Food Science and Technology**, 2018.
- KIM, S., et al. Development of *Leuconostoc lactis*-specific quantitative PCR and its application for identification and enumeration in fermented foods. **Food Analytical Methods**, v. 13, n. 4, p. 992-999, 2020.
- KOŁAKOWSKI, P.; OZIMKIEWICZ, M. Restoration of kefir grains subjected to different treatments. **International Journal of Dairy Technology**, v. 65, n. 1, p. 140-145, 2012.
- KOS, B., et al. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. **Journal Applied Microbiology**, 94, n. 6, p. 981-987, 2003.
- LAIÑO, J., et al. Immunoregulatory effects triggered by lactic acid bacteria exopolysaccharides: New insights into molecular interactions with host cells. **Microorganisms**, 4, n. 3, 2016.
- LAROSA, C. P. et al. Sheep milk kefir sweetened with different sugars: Sensory acceptance and consumer emotion profiling. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 1, p. 295-300, 2021.
- LEITE, A. M. O., et al. Assessment of the microbial diversity of Brazilian kefir grains by 552 PCR-DGGE and pyrosequencing analysis. **Food Microbiology**, v. 31, n. 2, p. 215-221, 2012.
- LEITE, A. M. O., et al. Microbiological and chemical characteristics of Brazilian kefir during fermentation and storage processes. **Journal of Dairy Science**, 96, n. 7, p. 4149-4159, 2013.
- LEITE, A. M., et al. Probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains isolated from Brazilian kefir grains. **Journal of Dairy Science**, 98, n. 6, p. 3622-3632, 2015.

LI, B., et al. Effects of cryoprotectants on viability of *Lactobacillus reuteri* CICC 6226. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 92, p. 609-616, 2011.

LI, W., et al. Fermentation characteristics of *Bac2* subsp. *lactis* isolated from naturally fermented dairy products and screening of potential starter isolates. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1794, 2020.

LIM, Y. H., et al. Comparative studies of versatile extracellular proteolytic activities of lactic acid bacteria and their potential for extracellular amino acid productions as feed supplements. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 10, n. 1, p. 1-13, 2019.

LIU, J.R., et al. The anti-allergenic properties of milk kefir and soymilk kefir and their beneficial effects on the intestinal microflora. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 86, n. 15, p. 2527-2533, 2006.

MAGALHÃES, K. T., et al. Brazilian kefir: structure, microbial communities and chemical composition. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 693-702, 2011

MANINI, F., et al. Characterization of lactic acid bacteria isolated from wheat bran sourdough. **LWT - Food Science and Technology**, 66, p. 275-283, 2016.

MARCHIORI, J. M. **Efeito protetor de *Weissella paramesenteroides* P1 na mucosite intestinal induzida por 5-fluorouracil em camundongos**. 64p. Dissertação (mestrado em Microbiologia). Universidade Federal de Minas Gerais, 2020.

MARTINS, F. S., et al. Efeito do método de conservação na viabilidade, reativação, colonização intestinal e efeito imunomodulador de dois produtos probióticos contendo *Saccharomyces boulardii* ou *Lev1*. **Higiene Alimentar**, v. 21, p. 460-461, 2007.

MARTINS, F.S., et al. Estudo do potencial probiótico de linhagens de *Lev1* através de testes in vitro. **Revista de Biologia e Ciencias da Terra**, 5, p. 0, 2005.

MASCO, L., et al. *In vitro* assessment of the gastrointestinal transit tolerance of taxonomic reference strains from human origin and probiotic product isolates of *Bifidobacterium*. **Journal of Dairy Science**, 90, n. 8, p. 3572-3578, 2007.

MATOUSKOVA, P., et al. Stress effect of food matrices on viability of probiotic cells during model digestion. **Microorganisms**, v. 9, n. 8, p. 1625, 2021.

MAZAHARI ASSADI, M.; POURAHMAD, R.; MOAZAMI, N. Use of isolated kefir starter cultures in kefir production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 16, p. 541-543, 2012.

MELEH, H. U., et al. Isolation and safety characterisation of lactobacilli strains with antimicrobial properties as potential probiotics for human use. **LWT - Food Science and Technology**, 131, p. 109796, 2020.

MENG, X. C., et al. Anhydrobiotics: The challenges of drying probiotic cultures. **Food Chemistry**, 106, n. 4, p. 1406-1416, 2008.

MIYAMOTO-SHINOHARA, Y., et al. Survival of yeasts stored after freeze-drying or liquid-drying. **The Journal of General and Applied Microbiology**, 56, n. 2, p. 107-119, 2010.

- MONTEL MENDOZA, G., et al. Survival and beneficial properties of lactic acid bacteria from ranculture subjected to freeze-drying and storage. **Journal of Applied Microbiology**, 116, n. 1, p. 157-166, 2014.
- MORGAN, C. A., et al. Preservation of micro-organisms by drying; A review. **Journal of Microbiological Methods**, 66, n. 2, p. 183-193, 2006.
- MORIYA, Y., et al. KAAS: an automatic genome annotation and pathway reconstruction server. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. suppl_2, p. W182-W185, 2007.
- MOURA, C.S.S. **Estudo *in vitro* e *in vivo* do efeito probiótico de *Weissella paramesenteroides* P1 no tratamento da infecção causada por Rotavírus**. 58p. Dissertação (mestrado em Genética). Universidade Federal de Minas Gerais, 2018.
- MOURA, M. **Produção de etanol e xilitol a partir de D-xilose por linhagens de *Candida (Spathaspora) materiae***. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, 2015.
- NAMBOU, K., et al. A novel approach of direct formulation of defined starter cultures for different kefir-like beverage production. **International Dairy Journal**, 34, n. 2, p. 237-246, 2014.
- NAMI, Y., et al. Novel autochthonous lactobacilli with probiotic aptitudes as a main starter culture for probiotic fermented milk. **Food Science and Technology**, v. 98, p. 85–93, 2018.
- NARDI, R. D., et al. Antagonism against anaerobic and facultative bacteria through a diffusible inhibitory compound produced by *Lactobacillus* sp. isolated from the rat fecal microbiota. **Anaerobe**, v. 3, n. 5, p. 409-411, 1999.
- NEJATI, F.; JUNNE, S.; NEUBAUER, P. A big world in small grain: a review of natural milk kefir starters. **Microorganisms**, v. 8, n. 2, p. 192, 2020.
- NIELSEN, B.; GÜRAKAN, G. C.; UNLÜ, G. Kefir: a multifaceted fermented dairy product. **Probiotics Antimicrob Proteins**, 6, n. 3-4, p. 123-135, 2014.
- O'BRIEN, K., et al. Sensory analysis of a kefir product designed for active cancer survivors. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 6, p. 4349-4353, 2017.
- OLIVEIRA, J. S., et al. In vitro and in vivo evaluation of two potential probiotic lactobacilli isolated from cocoa fermentation (*Theobroma cacao* L.). **Journal of Functional Foods**, 47, p. 184-191, 2018.
- O'SULLIVAN, J. J., et al. Atomisation technologies used in spray drying in the dairy industry: A review. **Journal of Food Engineering**, n. 243, p. 57-69, 2019.
- OTLES, S.; ÇAĞINDI, Ö. Kefir: A Probiotic dairy-composition, nutritional and therapeutic aspects. **Pakistan Journal of Nutrition**, n.2, 2003.
- PAIVA, I. M. **Caracterização estrutural e avaliação da capacidade imunomodulatória de exopolissacarídeos produzidos por lactobacilos isolados de kefir**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.
- PAPADIMITRIOU, K., et al. Discovering probiotic microorganisms: in vitro, in vivo, genetic and omics approaches. **Frontiers in Microbiology**, 6, p. 58, 2015.
- PAPAVASILIOU, G., et al. Production of freeze-dried kefir culture using whey. **International Dairy Journal**, 18, n. 3, p. 247-254, 2008.

- PARENTE, E., et al. (Ed.). **Cheese (Fourth Edition)**. San Diego: Academic Press, 2017. p. 201-226.
- PEIGHAMBARDoust, S. H.; GOLSHAN TAFTI, A.; HESARI, J. Application of spray drying for preservation of lactic acid starter cultures: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, n. 5, p. 215-224, 2011.
- PINHEIRO, A. C. M; NUNES, C. A.; VIETORES, V. Sensomaker: A tool for sensorial characterization of food products. **Ciência e Agrotecnologia**. v. 37, p. 199-201, 2013.
- POLO, L., et al. Influence of freezing temperatures prior to freeze-drying on viability of yeasts and lactic acid bacteria isolated from wine. **Journal of Applied Microbiology**, 122, n. 6, p. 1603-1614, 2017.
- PRADO, G. K. S., et al. *Weissella paramesenteroides* P1 ameliorate the experimental amoebic colitis by increasing the expression of MUC-2 and the intestinal epithelial regeneration. **Journal of Applied Microbiology**, v. 129, n. 6, p. 1706-1719, 2020.
- PRADO, M. R., et al. Milk kefir: composition, microbial cultures, biological activities, and related products. **Frontiers in Microbiology**, 6, p. 1177-1177, 2015.
- PRASANNA, P. H. P.; GRANDISON, A. S.; CHARALAMPOPOULOS, D. Effect of dairy-based protein sources and temperature on growth, acidification and exopolysaccharide production of *Bifidobacterium* strains in skim milk. **Food Research International**, 47, n. 1, p. 6-12, 2012.
- RAJAM, R.; SUBRAMANIAN, Parthasarathi. Encapsulation of probiotics: past, present and future. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 11, n. 1, p. 1-18, 2022.
- RANADHEERA, R. D. C. S.; BAINES, S. K.; ADAMS, M. C. Importance of food in probiotic efficacy. **Food research international**, v. 43, n. 1, p. 1-7, 2010.
- RATHNAYAKA, R. Effect of freeze-drying on viability and probiotic properties of a mixture of probiotic bacteria. **ARNP Journal of Science and Technology**, 3, p. 1074-1078, 2013.
- RATTRAY, F. P.; O'CONNELL, M. J. **Fermented Milks | Kefir**. In, 2011. p. 518-524.
- RIOS, D. L. **Caracterização funcional da comunidade de bactérias lácticas, bactérias acéticas e leveduras de bebidas de kefir de leite e kefir de água do Brasil e da Argentina por análise metatranscriptômica**. Tese (doutorado em Genética). Universidade Federal de Minas Gerais, 2020.
- RISHABH, Dwivedi et al. Freeze dried probiotic carrot juice powder for better storage stability of probiotic. **Journal of Food Science and Technology**, p. 1-9, 2021.
- SALVA, S., et al. Development of a fermented goats' milk containing *Lactobacillus rhamnosus*: in vivo study of health benefits. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 13, p. 2355-2362, 2011.
- SANDES, S., et al. *Weissella paramesenteroides* P1 plays an immunobiotic role in gut-brain axis, reducing gut permeability, anxiety-like and depressive-like behaviors in murine models of colitis and chronic stress. **Food Research International**, v. 137, p. 109741, 2020.
- SANTIVARANGKNA, C., et al. Damage of cell envelope of *Lactobacillus helveticus* during vacuum drying. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, n. 3, p. 748-756, 2007.
- SANTIVARANGKNA, C.; KULOZIK, U.; FOERST, P. Inactivation mechanisms of lactic acid starter cultures preserved by drying processes. **Journal of Applied Microbiology**, 105, n. 1, p. 1-13, 2008.

SARLAK, T., et al. Effects of starter culture and storage temperature on functional, microbial and sensory characteristics of kefir during storage. **Journal of Pharmaceutical and Health Sciences**, v. 5, n. 1, p. 23–35, 2017.

SCHUCK, P., et al. Recent advances in spray drying relevant to the dairy industry: A comprehensive critical review. **Drying Technology**, 34, n. 15, p. 1773-1790, 2016.

SCHUCK, P., et al. Spray drying of dairy bacteria: New opportunities to improve the viability of bacteria powders. **International Dairy Journal**, v. 31, n. 1, p. 12-17, 2013.

SHARMA, Ruchi; RASHIDINEJAD, Ali; JAFARI, Seid Mahdi. Application of spray dried encapsulated probiotics in functional food formulations. **Food and Bioprocess Technology**, v. 15, n. 10, p. 2135-2154, 2022

SETTACHAIMONGKON, S., et al. Influence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 on post-acidification, metabolite formation and survival of starter bacteria in set-yoghurt. **Food Microbiology**, v. 59, p. 14-22, 2016.

SHABANDEH, M. Size of the anti-aging market worldwide from 2018 to 2023. **Statista**, May, v. 15, 2020.

SILVA, B. C., et al. *In vitro* assessment of functional properties of lactic acid bacteria isolated from faecal microbiota of healthy dogs for potential use as probiotics. **Beneficial Microbes**, v. 1, p. 1-9, 2013.

SILVA, C. F. G., et al. Development and characterization of a soymilk Kefir-based functional beverage. **Food Science and Technology**, v. 38, p. 543-550, 2018.

SILVA, S. H., et al. Antagonism against *Vibrio cholerae* by diffusible substances produced by bacterial components of the human faecal microbiota. **Journal of Medical Microbiology**, v. 50, n. 2, p. 161-164, 2001.

SIMOVA, E., et al. Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 28, n. 1, p. 1-6, 2002.

SLATTERY, C.; COTTER, P. D.; O'TOOLE, P. W. Analysis of health benefits conferred by *Lactobacillus* species from kefir. **Nutrients**, 11, n. 6, p. 1252, 2019.

SURBER, G., et al. Exopolysaccharides from *Bac2* affect manufacture, texture and sensory properties of concentrated acid milk gel suspensions (fresh cheese). **International Dairy Journal**, 112, p. 104854, 2021.

SURONO, S.; HOSONO, A. Starter Cultures. **Elsevier**, 2011.

TRIPATHI, M. K.; GIRI, S. K. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. **Journal of Functional Foods**, 9, p. 225-241, 2014.

UNTERGASSER A. et al. Primer 3 - New capabilities and interfaces. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n.15, p. e115 – e115, 2012.

VALENTE, G. L. C., et al. Effect of storage on physico-chemical, microbiological and sensory characteristics of goat milk fermented by *Lactobacillus* strains isolated from minas artisanal cheeses. **International Journal of Food Studies**, v. 10, n. 2, 2021.

VIEIRA, L. Q., et al. Uso de probióticos na prevenção e tratamento de infecções e inflamações gastrointestinais. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 17, n. 1-2, p. 45-53, 2007.

VILLANOEVA, C. N. B. C. **Avaliação da qualidade microbiológica e físico-química de kefir e da atividade biológica da bebida de *Lactobacillus* spp. isolados de diferentes grãos e exopolissacarídeos**. 135p. Tese (Doutorado em Microbiologia), Universidade Federal de Minas Gerais. 2016.

VILLANOEVA, C. N. B., et al. Functionally active microbiome and physicochemical properties of milk and sugary water kefir from Brazil. **Austin Food Sciences**, v. 6, n.1, p. 1042, 2021.

VIMERCATI, W. C., et al. Physicochemical, rheological, microbiological and sensory properties of newly developed coffee flavored kefir. **LWT - Food Science and Technology**, v. 123, p. 109069, 2020.

VINDEROLA, C. G.; REINHEIMER, J. A. Lactic acid starter and probiotic bacteria: A comparative “*in vitro*” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. **Food Research International**, v. 36, n. 9–10, p. 895–904, 2003.

VINDEROLA, G., et al. Usefulness of a set of simple in vitro tests for the screening and identification of probiotic candidate strains for dairy use. **LWT - Food Science and Technology**, 41, n. 9, p. 1678-1688, 2008.

WANG, H. et al. Chemical, physiochemical, and microstructural properties, and probiotic survivability of fermented goat milk using polymerized whey protein and starter culture Kefir Mild 01. **Journal of food science**, v. 82, n. 11, p. 2650-2658, 2017.

WELMAN, A. D.; MADDOX, I. S. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. **Trends in Biotechnology**, 21, n. 6, p. 269-274, 2003.

WSZOLEK, M., et al. Properties of kefir made in Scotland and Poland using bovine, caprine and ovine milk with different starter cultures. **LWT - Food Science and Technology**, 34, n. 4, p. 251-261, 2001.

YERLIKAYA, O. Probiotic potential and biochemical and technological properties of *Bac2 ssp. lactis* strains isolated from raw milk and kefir grains. **Journal of Dairy Science**, 102, n. 1, p. 124-134, 2019.

YILMAZ, İ.; DOLAR, M. E.; ÖZPINAR, H. Effect of administering kefir on the changes in fecal microbiota and symptoms of inflammatory bowel disease: A randomized controlled trial. **The Turkish Journal of Gastroenterology : The Official Journal of Turkish Society of Gastroenterology**, 30, n. 3, p. 242-253, 2019.

ZANIRATI, D. F., et al. Selection of lactic acid bacteria from Brazilian kefir grains for potential use as starter or probiotic cultures. **Anaerobe**, 32, p. 70-76, 2015.

ZAROOUR, K., et al. Analysis of technological and probiotic properties of Algerian *Bac3* strains isolated from dairy and non-dairy products. **Journal of Functional Foods**, 49, p. 351-361, 2018.

ZAYED, G.; ROOS, Y. H. Influence of trehalose and moisture content on survival of *Lactobacillus salivarius* subjected to freeze-drying and storage. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 9, p. 1081–1086, 2004.

10. APÊNDICES

APÊNDICE A – Curvas padrão (qPCR) – Quantificação da linhagem P1 nas bebidas produzidas com C3

(a) Bebidas preparadas com inóculo de [REDACTED]:

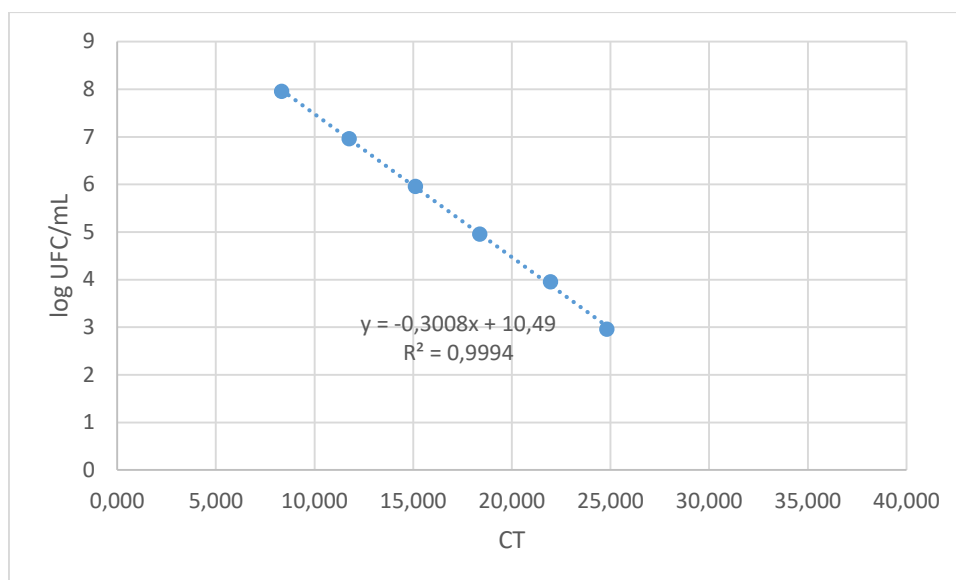


Figura 28 - Curva padrão para cálculo da concentração da linhagem P1 (log UFC/mL), construída a partir de amostras extraídas do crescimento de 1×10^9 UFC/mL em caldo MRS em função do *Cycle Threshold* da qPCR.

(b) Bebidas preparadas com inóculos de [REDACTED]:

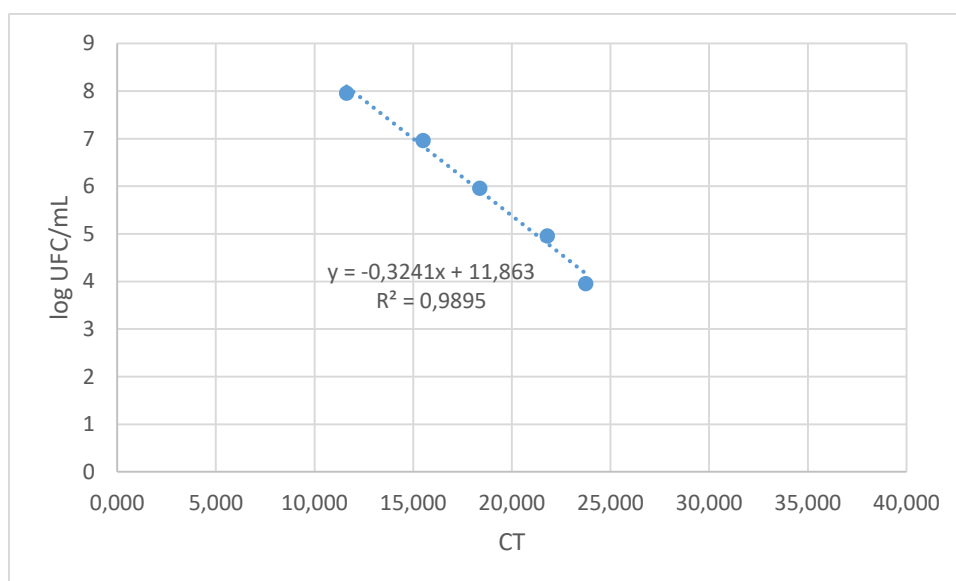


Figura 29 - Curva padrão para cálculo da concentração da linhagem P1 (log UFC/mL), construída a partir de amostras extraídas do crescimento de 1×10^9 UFC/mL em caldo MRS em função do *Cycle Threshold* da qPCR.

APÊNDICE B – Curva padrão para o ácido lático (HPLC)

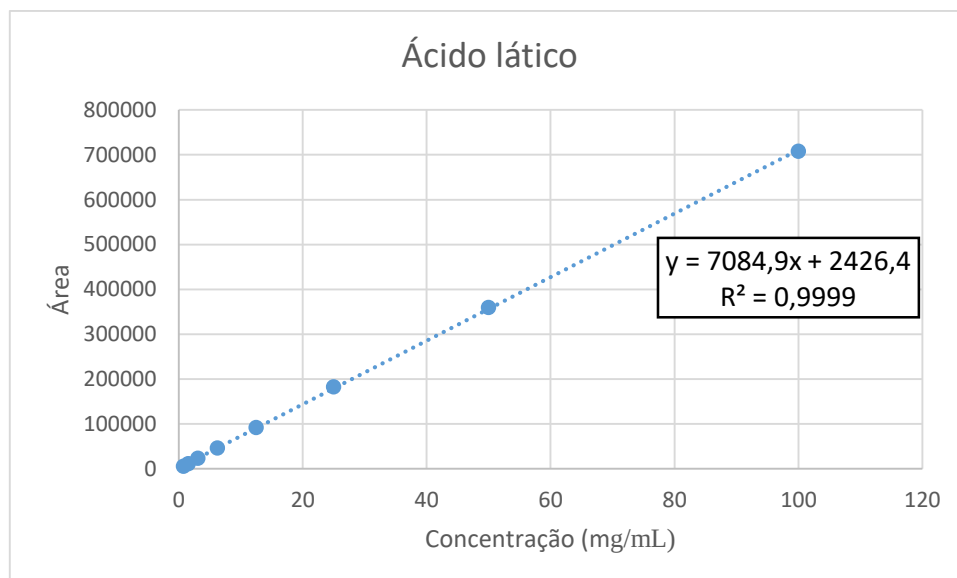


Figura 30 - Curva padrão para determinação da concentração (mg/mL) de ácido lático por HPLC nas amostras de kefir de leite.

APÊNDICE C – FICHAS DISTRIBUÍDAS NA ANÁLISE SENSORIAL

(a) Questionário:

Estudo para desenvolvimento de novos produtos. Se você concordou em participar deste estudo, por favor responda as questões solicitadas abaixo. As informações serão mantidas confidenciais. Obrigada pela colaboração!

Nome: _____

Sexo: () Feminino () Masculino () Não binário

Data: _____

Faixa etária: () até 18 anos () entre 18 e 25 anos () entre 25 e 40 anos
() 40 e 60 anos () acima de 60 anos

Questionário:

- Você tem hábito de consumir algum leite fermentado? () sim () não
- Se sim, com que frequência?
() tomo frequentemente () tomo ocasionalmente () nunca tomo
- Quais destes produtos você consome? (*pode marcar mais de uma opção*)
() iogurte natural () iogurte saborizado () kefir de leite () coalhada
() leite fermentado (tipo *Yakult*) () outro, qual? _____
- Você já conhece o que é o kefir de leite? () sim () não
- Já consome kefir de leite? () sim () não

(b) Ficha de avaliação quanto a aceitação e intenção de compra:

Testes afetivos de aceitação e intenção de compra de kefir de leite

Avaliador: _____ Data: _____ Código da amostra: _____

Você está recebendo uma amostras de kefir de leite. Por favor, indique o quanto você gostou ou desgostou deste produto quanto aos atributos solicitados, usando a escala abaixo. Beba um pouco de água para que não haja interferência de avaliação desta para as demais amostras que você receberá.

5 – Gostei muito**4 – Gostei****3 – Nem gostei nem desgostei****2 – Não gostei****1 – Desgostei muito**

Textura	Odor	Sabor	Cor	Impressão global

Por favor, avalie também considerando que este produto estivesse à venda, qual seria a sua intenção de compra:

☐ 5 – Decididamente compraria☐ 4 – Provavelmente compraria☐ 3 – Talvez sim/ talvez não☐ 2 – Provavelmente não compraria☐ 1 – Decididamente não compraria

Por quê? _____

Comentários: _____

OBRIGADA PELA PARTICIPAÇÃO!**(c) Termo de consentimento livre e esclarecido**

Título da Pesquisa: *Obtenção de culturas iniciadoras para produção de kefir de leite adicionadas ou não de linhagem probiótica*

Nome dos Pesquisadores Envolvidos: Elisabeth Neumann e Karen Costa

O(A) senhor(a) está sendo convidado(a) a participar desta pesquisa, de forma voluntária, que tem a finalidade de avaliar o grau de aceitação de amostras de kefir de leite, de acordo com uma escala hedônica de pontos. Além disso, gostaríamos que avaliasse também a intenção de compra das bebidas lácteas fermentadas analisadas. _____

_____. Esses micro- organismos podem ser utilizados como iniciadores para produção de kefir, conforme definido pela legislação brasileira (Instrução Normativa nº 46, de 23/10/2007, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Essa pesquisa contará com pessoas maiores de 18 anos que tenham o hábito de consumir leites fermentados, sendo que o sexo e a idade não são fatores que interferem nessa pesquisa.

O(A) senhor(a), como voluntário(a), tem a liberdade de se recusar a participar dessa pesquisa, agora ou em qualquer momento da sua participação. Não haverá qualquer forma de pagamento pela

participação do(a) senhor(a) na pesquisa, porém será disponibilizado apoio em caso de geração de algum risco à integridade física, mental ou de qualquer outra natureza ao participante.

O(A) senhor(a) irá avaliar os leites fermentados produzidos nessa pesquisa através de formulários próprios.

A participação nesta pesquisa não traz complicações, uma vez que é seguro consumir kefir de leite. Riscos mínimos de alterações nos parâmetros físico-químicos e microbiológicos das amostras de kefir de leite que o(a) senhor(a) irá experimentar foram descartados, uma vez que todas as formulações foram previamente submetidas a análises definidas pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados, conforme Instrução Normativa no 46, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento estabelecidas antes da análise. Todas as amostras que estiverem fora dos padrões de identidade e/ou qualidade definidos pela legislação serão descartadas. Além disso, os procedimentos adotados nesta pesquisa obedecem aos Critérios da Ética em Pesquisa com Seres Humanos conforme Resolução no 466/12 do Conselho Nacional de Saúde.

Caso tenha alergia e/ou intolerância a leite e seus derivados, não recomendamos a sua participação, apesar dos leites fermentados serem conhecidamente menos envolvidos e relacionados a esses tipos de reações.

Todas as informações coletadas nesse estudo são confidenciais e somente os pesquisadores terão acesso aos dados, que serão divulgados de forma conjunta, sem citar o nome de nenhum participante. As informações serão arquivadas por cinco anos, sob a responsabilidade da pesquisadora principal, professora Elisabeth Neumann, no Departamento de Microbiologia, da Universidade Federal de Minas Gerais.

Ao participar desta pesquisa, o(a) senhor(a) não terá benefício direto, mas esperamos que este estudo traga informações importantes sobre a produção de kefir de leite, de forma que os pesquisadores se comprometem a divulgar o conhecimento obtido com os resultados dessa pesquisa.

O(A) senhor(a) não terá nenhum tipo de despesa para participar dessa pesquisa.

Contamos com uma equipe de colaboradores especializada nesse tipo de pesquisa e esperamos que a sua experiência seja a mais confortável e breve possível. Garantimos que estamos fazendo de tudo para minimizar qualquer desconforto ou inconveniência durante a sua participação.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias, sendo que uma delas será arquivada pela pesquisadora responsável, professora Elisabeth Neumann, no Departamento de Microbiologia, da Universidade Federal de Minas Gerais, e a outra será fornecida ao senhor(a).

Após estes esclarecimentos, solicitamos o seu consentimento de forma livre para participar desta pesquisa e pedimos que preencha, por favor, os itens que se seguem:

Confirmo que recebi via deste termo de consentimento, e autorizo a execução do trabalho de pesquisa e a divulgação dos dados obtidos neste estudo ao assinar o presente documento.

Obs: Não assine esse termo se ainda tiver qualquer dúvida a respeito do que foi explicado acima.

Consentimento Livre e Esclarecido

Tendo em vista os itens acima apresentados, eu, de forma livre e esclarecida, manifesto meu consentimento em participar da pesquisa:

Nome do Participante da Pesquisa

Assinatura do Participante da Pesquisa



Assinatura do Pesquisador Principal Elisabeth Neumann

Em caso de dúvidas quanto aos procedimentos envolvidos na pesquisa, sinta-se à vontade para entrar em contato com o pesquisador principal:

Elisabeth Neumann (3409-2737 – eneumann@icb.ufmg.br)

Em caso de dúvidas quanto aos aspectos éticos envolvidos na pesquisa, sinta-se à vontade para entrar em contato com o COEP:

Cômite de Ética em Pesquisa - Av. Antônio Carlos, 6627 – Unidade Administrativa II – 2º andar – Sala 2005 – Campus Pampulha – Belo Horizonte – MG – Brasil – CEP: 31270-901 – Tel: (31) 3409-4592 - Email: coep@prpg.ufmg.br

APÊNDICE D – Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da UFMG para os experimentos de análise sensorial do kefir produzido com as culturas iniciadoras propostas neste estudo

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Obtenção de culturas iniciadoras para produção de kefir de leite adicionadas ou não de linhagem probiótica

Pesquisador: ELISABETH NEUMANN

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 30181420.8.0000.5149

Instituição Proponente: Universidade Federal de Minas Gerais

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.082.452

Apresentação do Projeto:

A proposta aqui apresentada é parte de um projeto maior que visa desenvolver bebidas lácteas fermentadas utilizando combinações de microorganismos isolados de grãos de kefir circulantes no Brasil. Serão

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

APÊNDICE E – Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) para os experimentos *in vivo* do presente estudo

(a) CEUA Protocolo: 257/2016



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 257/2016
Título do projeto: Avaliação do potencial probiótico de bactérias lácticas e leveduras isoladas de grãos de kefir e da atividade biológica de exopolissacarídeos produzidos por esses micro-organismos.
Finalidade: Pesquisa
Pesquisador responsável: Elisabeth Neumann
Unidade: Instituto de Ciências Biológicas
Departamento: Departamento de Microbiologia

Situação atual: [Decisão Final](#)

Aprovado na reunião do dia 24/10/2016.

Belo Horizonte, 25/10/2016.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - ceua@prpq.ufmg.br

(b) CEUA Protocolo 281/2022:

Decisão Final - Aprovado - Protocolo CEUA: 281/2022 (CEUA-UFMG)

1 message

ceua@prpq.ufmg.br <ceua@prpq.ufmg.br>
To: enemann@icb.ufmg.br, elisabeth.neumann@gmail.com

Tue, Nov 22, 2022 at 10:16 AM

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS****CEUA**
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 281/2022**Título do projeto:** Avaliação do efeito protetor de kefir produzido com culturas iniciadoras e de linhagens de bactérias lácticas que as compõem em modelo murino de infecção por *Salmonella Typhimurium*.**Finalidade:** Pesquisa**Pesquisador responsável:** Elisabeth Neumann**Unidade:** Instituto de Ciencias Biologicas**Departamento:** Departamento de Microbiologia**Situação atual:** [Decisão Final - Aprovado](#)

Aprovado na reunião ordinária on-line do dia 21/11/2022. Validade: 21/11/2022 à 20/11/2027.

Belo Horizonte, 22/11/2022.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - ceua@prpq.ufmg.br

APÊNDICE F – Concentração de microrganismos nas amostras de kefir de leite ao longo do armazenamento refrigerado

Tabela 12 - Contagem total de bactérias ácido-láticas (UFC/mL) no kefir preparado com grãos (KLCU) e com culturas iniciadoras (C1 e C3), recém desidratadas (T0) e após seis meses de armazenamento (T180).

Amostras						
KLCU	4,77 ± 0,61 ^{Bb}	6,81 ± 0,05 ^{Bab}	8,48 ± 0,04 ^a	8,30 ± 0,92 ^a	8,07 ± 0,53 ^a	7,16 ± 0,88 ^{Bab}
C1 (T0)	6,36 ± 0,35 ^{Ab}	9,16 ± 0,22 ^{Aab}	9,30 ± 0,14 ^a	9,19 ± 0,07 ^a	8,57 ± 0,04 ^{ab}	8,13 ± 0,07 ^{Ab}
C3 (T0)	6,19 ± 0,15 ^{Ab}	8,88 ± 0,57 ^{Aa}	9,33 ± 0,10 ^a	8,80 ± 0,06 ^a	8,48 ± 0,11 ^a	8,59 ± 0,14 ^{ABa}
C1 (180)	6,54 ± 0,0 ^b	9,21 ± 0,09 ^a	8,97 ± 0,10 ^a	8,76 ± 0,09 ^a	9,09 ± 0,50 ^a	8,37 ± 0,10 ^a
C3 (T180)	6,25 ± 0,03 ^b	9,32 ± 0,16 ^a	9,21 ± 0,13 ^a	9,13 ± 0,18 ^a	8,86 ± 0,36 ^a	8,77 ± 0,10 ^a

^{a, b}: Letras minúsculas distintas em uma mesma linha indicam diferença significativa pelo teste de Tukey (p < 0,05).

^{A, B}: Letras maiúsculas distintas em uma mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste de Tukey (p < 0,05).

Tabela 13 - Contagem total de leveduras (UFC/mL) no kefir preparado com grãos (KLCU) e com culturas iniciadoras (C1 e C3), recém desidratadas (T0) e após seis meses de armazenamento (T180).

Amostras						
KLCU	4,10 ± 0,02 ^b	4,43 ± 0,02 ^b	5,44 ± 0,11 ^a	5,71 ± 0,36 ^a	5,68 ± 0,39 ^a	5,50 ± 0,28 ^a
C1 (T0)	3,97 ± 0,70	4,38 ± 0,42	4,55 ± 0,53	4,57 ± 0,51	4,49 ± 0,45	4,34 ± 0,62
C3 (T0)	3,98 ± 0,71	4,52 ± 0,41	4,95 ± 0,0	4,52 ± 0,54	4,49 ± 0,54	4,47 ± 0,89
C1 (180)	3,00 ± 0,0 ^b	4,72 ± 0,60 ^a	4,10 ± 0,59 ^{ab}	4,76 ± 0,37 ^a	5,07 ± 0,02 ^a	5,03 ± 0,31 ^a
C3 (T180)	3,39 ± 0,12 ^b	4,69 ± 0,11 ^a	4,88 ± 0,38 ^a	5,02 ± 0,30 ^a	5,36 ± 0,01 ^a	5,05 ± 0,10 ^a

^{a, b}: Letras minúsculas distintas em uma mesma linha indicam diferença significativa pelo teste de Tukey (p < 0,05).

^{A, B}: Letras maiúsculas distintas em uma mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste de Tukey (p < 0,05).

APÊNDICE G – Perfil de acidificação das amostras de kefir de leite

Tabela 14 - Perfil de acidificação do kefir preparado com grãos (KLCU) e com as culturas iniciadoras (C1 e C3), recém desidratadas (T0) e após seis meses de armazenamento (T180).

Amostras						
KLCU	6,55 ± 0,11 ^a	5,21 ± 0,10 ^{Ab}	4,15 ± 0,30 ^c	4,10 ± 0,13 ^{Bc}	3,91 ± 0,11 ^{Bc}	3,85 ± 0,02 ^{Bc}
C1 (T0)	6,55 ± 0,11 ^a	4,51 ± 0,14 ^{Bb}	4,51 ± 0,16	4,52 ± 0,10 ^{Ab}	4,70 ± 0,02 ^{Ab}	4,73 ± 0,05 ^{Ab}
C3 (T0)	6,55 ± 0,11 ^a	4,53 ± 0,20 ^{Bb}	4,51 ± 0,20 ^b	4,53 ± 0,22 ^{Ab}	4,65 ± 0,02 ^{Ab}	4,71 ± 0,19 ^{Ab}
C1 (180)	6,55 ± 0,11 ^a	4,48 ± 0,03 ^b	4,44 ± 0,04 ^b	4,58 ± 0,02 ^b	4,59 ± 0,12 ^b	4,61 ± 0,14 ^b
C3 (T180)	6,55 ± 0,11 ^a	4,66 ± 0,25 ^b	4,59 ± 0,05 ^b	4,58 ± 0,14 ^b	4,67 ± 0,10 ^b	4,62 ± 0,08 ^b

^{a, b}: Letras minúsculas distintas em uma mesma linha indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

^{A, B}: Letras maiúsculas distintas em uma mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

APÊNDICE H – Ensaios *in vivo* com a administração de kefir de leite

Administração de C1, C2, KLCU em modelo murino de infecção por *S. Typhimurium*.

(a) Sobrevivência:

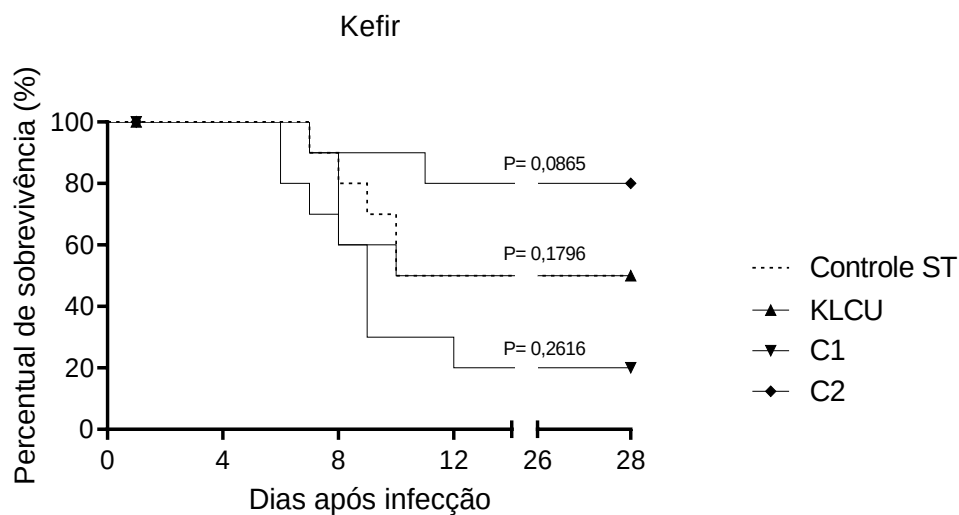


Figura 31 - Percentual (%) de sobrevivência de camundongos Balb/C infectados com *S. Typhimurium*, tratados ou não com kefir preparado com grãos KLCU (▲) ou com as culturas iniciadoras C1 (▼) e C2 (◆), (n=10). Os valores de p correspondem à comparação entre cada grupo tratado com kefir e os controle ST.

[illegible]

APÊNDICE I – Ensaio de atividade antagonista *in vitro* para as linhagens Bac2 e Bac3 isoladas de grãos de kefir de leite

Tabela 17 - Atividade antagonista entre as linhagens que compõe as culturas iniciadoras, medidas através de halos de inibição (mm).

Antagonista/Reveladora	Halo de inibição (mm)
Bac2 / Bac3	-
Bac2 / Bac1	-
Bac2 / P1	38,92 ± 0,63
Bac2 / Lev1	-
Bac3 / Bac2	-
Bac3 / Bac1	-
Bac3 / P1	-
Bac3 / Lev1	-
Bac1 / Bac2	-
Bac1 / Bac3	-
Bac1 / P1	-
Bac1 / Lev1	-
Lev1 / Bac2	-
Lev1 / Bac3	-
Lev1 / Bac1	-
Lev1 / P1	-
P1 / Bac2	-
P1 / Bac3	-
P1 / Bac1	-
P1 / Lev1	a*

a*: ausência de crescimento na linhagem reveladora.

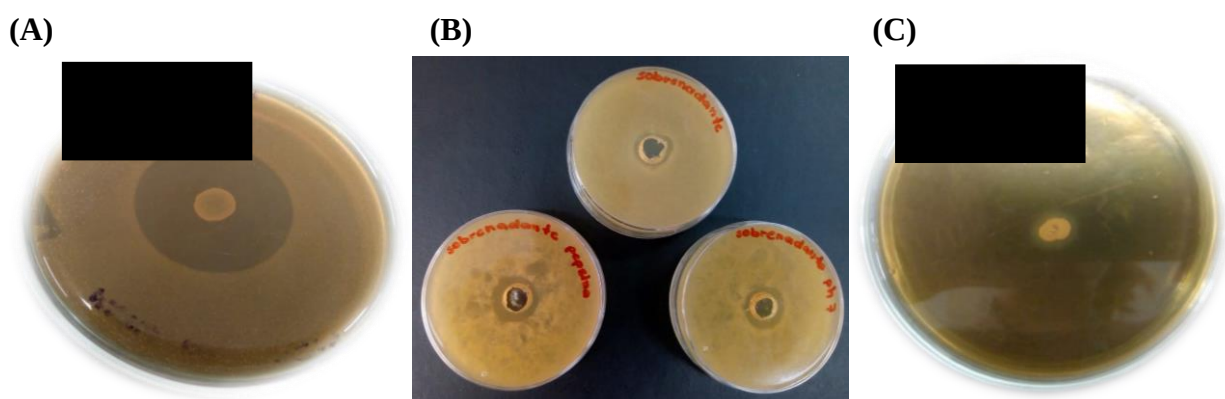


Figura 33 - Antagonismo *in vitro* entre linhagens que compõe a cultura iniciadora proposta para produção de kefir adicionada de linhagem probiótica - C2. (A) Inibição de Bac2 sobre P1; (B) sobrenadante livre de células da linhagem Bac2 frente ao crescimento da linhagem P1 e (C) Fator de crescimento observado entre Lev1 – Bac2.

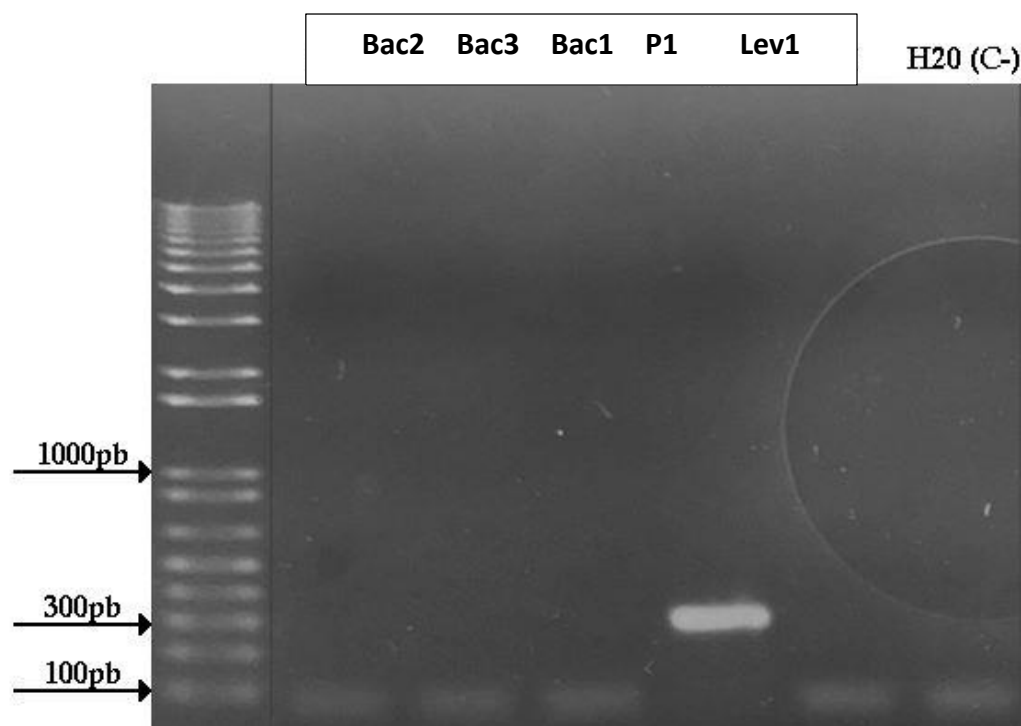
APÊNDICE K – Análise da PCR do amplificado do gene *Holin* para cada organismo

Figura 34 - Foto de eletroforese em gel de agarose 1% mostrando a presença ou ausência do produto de PCR do gene *Holin* nos microrganismos que compõem as culturas iniciadoras C1 e C3.

APÊNCIDE L – Produções ao longo do período de 2019 a 2023

- 1- (2023) Evaluation of the beneficial effects of milk kefir administration and the probiotic potential of bacterial strains from Brazilian grains (em construção/correção e tradução)

Possíveis revistas para publicação: Food Microbiology, Applied Microbiology and Biotechnology, Food Research International.

- 2- (2023) In vitro evaluation of probiotic and technological properties of lactic acid bacteria isolated from artisanal cheese produced in the Serra Geral – Minas Gerais – Brazil

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

- 3- (2022) Genotypic characterization of coagulase negative *Staphylococcus* species from bovine milk found on properties and municipalities of northern Minas Gerais

International Journal of Development Research
(DOI: <https://doi.org/10.37118/ijdr.25959.12.2022>)

- 4- (2022) Copaiba oleoresin activity against prevalent microorganisms in chronic wound infections

Wounds International
(<https://www.woundsinternational.com/journals/issue/663/article-details/copaiba-oleoresin-activity-against-prevalent-microorganisms-chronic-wound-infections>)

- 5- (2022) Contribuições socioambientais provenientes do reaproveitamento de óleo de cozinha usado

Revista Ciência em Extensão
(DOI: <https://doi.org/10.23901/1679-4605.2021v17p206-222>)

- 6- (2022) Tratamento de feridas: Efeitos *in vitro* de aplicações farmacoterapêuticas do óleo de girassol (*Helianthus annuus*)

Revista de Enfermagem Referência
(DOI: 10.12707/RVI22026)

- 7- Caracterização físico-química e sensorial da polpa de acerola atomizada utilizando diferentes agentes carreadores e de seus sucos reconstituídos

Pesquisa e Extensão em Engenharia de Alimentos
(DOI: 10.29327/541993)

- 8- (2021) Microencapsulation of *Bifidobacterium longum* 5^{1A} cells by spray drying and its incorporation in acerola (*Malpighia emarginata*) pulp powder

International Journal of Food Science and Technology

(DOI: <https://doi.org/10.1111/ijfs.15418>)

- 9- (2020) In Vitro Selection and In Vivo Trial of *Lactobacillus* Strains for Use a Potential Probiotics for Laying Hens.

International Journal of Veterinary Science & Technology
(ISSN: 2640-4397)

- 10- (2019) Physicochemical, immunomodulatory and safety aspects of milks fermented with *Lactobacillus paracasei* isolated from kefir

Food Research International
(<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.04.041>)

- 11- (2023) Registro de *Know-how* em andamento, na Coordenadoria de Transferência e Inovação Tecnológica (CTIT), da Universidade Federal de Minas Gerais.