



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

**AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE MICRO-ORGANISMOS ISOLADOS DE
GRÃOS DE KEFIR SUBMETIDOS AO PROCESSO DE LIOFILIZAÇÃO PARA
FORMULAÇÃO DE CULTURAS INICIADORAS**

KAREN COSTA

Belo Horizonte/MG

2019



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

**AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE MICRO-ORGANISMOS ISOLADOS DE
GRÃOS DE KEFIR SUBMETIDOS AO PROCESSO DE LIOFILIZAÇÃO PARA
FORMULAÇÃO DE CULTURAS INICIADORAS**

KAREN COSTA

Dissertação apresentada junto ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Elisabeth Neumann

Belo Horizonte/MG
2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

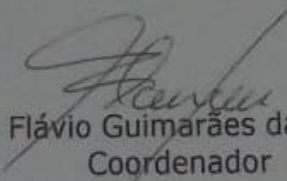
ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE KAREN COSTA
Nº REGISTRO: 2017662040

Às 14:30 horas do dia 18 de fevereiro de 2019, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Prof. Jacques Robert Nicoll, Profa. Andreia Marçal da Silva (UFSJ) e a Profa. Elisabeth Neumann - Orientadora, para julgar o trabalho final "Avaliação da viabilidade de microrganismos isolados de grãos de kefir submetidos ao processo de liofilização para formulação de culturas iniciadoras", da aluna **Karen Costa**, requisito final para a obtenção do Grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Flávio Guimarães da Fonseca - Coordenador do Programa, 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 pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 18 de fevereiro de 2019.

Dr. Prof. Jacques Robert Nicoli _____

Dra. Profa. Andreia Marçal da Silva _____

Profa. Elisabeth Neumann Orientadora _____


Prof. Flávio Guimarães da Fonseca
Coordenador

"Sempre parece ser impossível, até que seja feito"

(Nelson Mandela)

AGRADECIMENTOS

À Deus pela minha vida e força para seguir em frente.

À minha orientadora Prof.^a Elisabeth Neumann pela orientação, confiança, disponibilidade, compreensão frente às minhas dificuldades, apoio durante todo mestrado e principalmente na execução deste trabalho. Ao Prof. Jacques Robert Nicoli por ser sempre atencioso, pela disponibilidade, os ensinamentos, confiança e sobretudo sua contribuição na análise dos resultados aqui apresentados. À prof.^a Andreia Marçal por aceitar gentilmente o convite para composição da banca examinadora, certa da sua contribuição significativa para este trabalho e sobretudo por seu intermédio, confiança e incentivo que me deu para seguir no caminho da pesquisa. Vocês são exemplos de profissionais que desejo me espelhar!

À minha mãe Vera, ao meu pai Denis e irmã Denise pelo apoio e companheirismo, pelo carinho dedicado a mim e todo aprendizado e condições criadas para meu amadurecimento pessoal. Ao meu companheiro Leandro pela presença, compreensão nos momentos que precisei me ausentar, pelo apoio emocional e por me encorajar a crescer profissionalmente. À minha prima Caroline pela amizade, incentivo e disponibilidade sempre que precisei. Vocês são fundamentais!

Às pessoas incríveis que conheci na UFMG e pude conviver durante esses dois anos de mestrado, de modo especial Gabriele, Vivian, Mônica, Jonathan, Ingrid, Mariana, Gabriel, João Carlos, Luísa, Rodrigo, Spencer, César, Gustavo e Ramon. Muito obrigada pelo carinho, alegria, incentivo, pelo aprendizado co-construído e por contribuírem para que a caminhada se tornasse mais agradável!

Aos amigos e colegas do LEFM e LABIO, em especial Gabriele, Ingrid, Mariana, Gabriel, Vivian, Ramon e Prisca que auxiliaram na execução dos experimentos. Obrigada pela disponibilidade, apoio e respeito dedicados a este trabalho!

À técnica do laboratório Rosângela pelo carinho, pela sua dedicação e ajuda na organização do material residual dos experimentos. Ao Jamil, por sua paciência e disponibilidade em ajudar sempre, pelo apoio técnico e todo aprendizado compartilhado, principalmente durante os experimentos de liofilização dos micro-organismos e determinação de ácidos orgânicos e etanol por HPLC.

À Katharina e Fernanda, por também me auxiliarem durante os experimentos de determinação de ácidos orgânicos e etanol por HPLC, principalmente na análise dos resultados finais.

Aos órgãos financiadores deste trabalho, em especial a CAPES, por conceder a bolsa.

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!

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	v
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	viii
LISTA DE FIGURAS	x
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xvii
1. INTRODUÇÃO	18
2. REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1. Leites fermentados	20
2.2. Kefir: definição, características gerais e histórico	21
2.3. Perfil microbiológico: grãos e bebida	24
2.4. Métodos de produção de kefir	25
2.5. Culturas iniciadoras (<i>Starter</i>)	27
2.6. Liofilização (<i>Freeze-drying</i>)	31
2.6.1. Agentes crioprotetores	32
3. JUSTIFICATIVA	35
4. OBJETIVO GERAL	37
4.1. Objetivos específicos	37
5. METODOLOGIA	38
5.1. Culturas de micro-organismos	38
5.2. Preparo das amostras	38
5.3. Desidratação das culturas por liofilização (<i>Freeze-drying</i>)	39
5.4. Determinação da viabilidade e sobrevivência após liofilização e durante armazenamento	40
5.5. Determinação do padrão de crescimento <i>in vitro</i>	40
5.6. Elaboração de bebidas fermentadas a partir de culturas liofilizadas	41
5.7. Análises microbiológicas das bebidas fermentadas	43

5.8. Análises físico-químicas das bebidas fermentadas	43
5.8.1. Medida do pH das bebidas fermentadas.....	43
5.8.2. Determinação de etanol, ácido acético e ácido lático nas bebidas fermentadas.	43
5.9. Análises estatísticas.....	44
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
6.1. Viabilidade após liofilização e armazenamento de linhagens isoladas de grãos de kefir	45
6.2. Padrão de crescimento <i>in vitro</i> após liofilização e armazenamento de linhagens isoladas de grãos de kefir	62
6.3. Perfil de acidificação de bebidas fermentadas a partir de culturas iniciadoras liofilizadas durante a produção e estocagem.....	84
6.4. Caracterização microbiológica de bebidas fermentadas a partir de culturas iniciadoras liofilizadas durante a produção e estocagem	89
6.5. Concentração de etanol, ácido lático e ácido acético nas bebidas fermentadas a partir de culturas iniciadoras liofilizadas durante a produção e estocagem.....	97
7. CONCLUSÃO	105
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	107
10. APÊNDICES.....	119
Apêndice A – Resultados de viabilidade (log UFC/mL) dos micro-organismos isolados de grãos de kefir antes e após a liofilização e durante armazenamento.	119
Apêndice B – Cálculo da quantidade de sacarose utilizada na produção das bebidas .	124

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	por cento
°C	graus Celsius
μL	microlitros
μm	micrômetros
μg	microgramas
ABS	absorbância
ARDRA	Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis
BAL	bactérias ácido-láticas
cm	centímetros
CO ₂	dióxido de carbono
DVS	Direct Vat Set
DO	densidade ótica
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
g	gramas
g/L	gramas/litro
KA	kefir de água
KL	kefir de leite
KLA	kefir de leite adoçado
KACU	kefir de água de Curitiba/PR
KLBH	kefir de leite de Belo Horizonte/MG
KLCU	kefir de leite de Curitiba/PR
KLCUsac	kefir de leite adoçado de Curitiba/PR
KLDI	kefir de leite de Divinópolis/MG
KLVI	kefir de leite de Viçosa/MG
KASA	kefir de água de Salvador/BA
L	litro
<i>Lc. lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
LEV	leveduras
<i>Ln. mesenteroides</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>

log	logaritmo
mM	mili molar
mm	milímetros
mmol/L	milimol/litro
m/m	massa/massa
mg/mL	miligramas/mililitro
m/v	massa/volume
mg	miligramas
mL	mililitros
Mpa	megapascal
MRS	de Man, Rogosa and Sharpe
nm	nanômetros
Pa	Pascal
PCR	reação em cadeia da polimerase
pH	potencial hidrogeniônico
ppm	partes por milhão
p/v	peso/volume
RNA _r	RNA ribossomal
SAL	salina
SAC	sacarose
SKM	<i>skim milk</i>
T	tempo
T'	tempo antes da liofilização
T ₀	tempo logo após a liofilização
TREA	trealose
T _g	Temperatura de transição vítrea
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
v/v	volume/volume
YPG	<i>Yeast Peptone Glucose</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema da produção de kefir usando culturas comerciais (DVS).....	30
Figura 2 - Fluxograma de elaboração da bebida fermentada partir de culturas iniciadoras....	42
Figura 3 - Contagem de células viáveis (log UFC/g) logo após a liofilização (T0) e nos tempos 15, 45, 90 e 180 dias de armazenamento a 5°C e 25°C de <i>Lactococcus lactis</i> (4U), isolado do grão de kefir de leite de Divinópolis - MG. A linhagem foi liofilizada utilizando os seguintes crioprotetores: TREA (trealose 5% p/v); SKM (leite desnatado 10% p/v); SAC (sacarose 15% p/v) e como controle SAL (salina 0,85% p/v). Os resultados apresentados são médias de dois experimentos.....	46
Figura 4 - Contagem de células viáveis (log UFC/g) logo após a liofilização (T0) e nos tempos 15, 45, 90 e 180 dias de armazenamento a 5°C e 25°C de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> (11U), isolado do grão de kefir de leite de Viçosa – MG. A linhagem foi liofilizada utilizando os seguintes crioprotetores: TREA (trealose 5% p/v); SKM (leite desnatado 10% p/v); SAC (sacarose 15% p/v) e como controle SAL (salina 0,85% p/v). Os resultados apresentados são médias de dois experimentos.....	47
Figura 5 - Contagem de células viáveis (log UFC/g) logo após a liofilização (T0) e nos tempos 15, 45, 90 e 180 dias de armazenamento a 5°C e 25°C de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> (11U2), isolado do grão de kefir de leite de Viçosa – MG. A linhagem foi liofilizada utilizando os seguintes crioprotetores: TREA (trealose 5% p/v); SKM (leite desnatado 10% p/v); SAC (sacarose 15% p/v) e como controle SAL (salina 0,85% p/v). Os resultados apresentados são médias de dois experimentos.....	48
Figura 6 - Contagem de células viáveis (log UFC/g) logo após a liofilização (T0) e nos tempos 15, 45, 90 e 180 dias de armazenamento a 5°C e 25°C de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> (12U2), isolado do grão de kefir de leite de Viçosa – MG. A linhagem foi liofilizada utilizando os seguintes crioprotetores: TREA (trealose 5% p/v); SKM (leite desnatado 10% p/v); SAC (sacarose 15% p/v) e como controle SAL (salina 0,85% p/v). Os resultados apresentados são médias de dois experimentos.....	49
Figura 7 - Contagem de células viáveis (log UFC/g) logo após a liofilização (T0) e nos tempos 15, 45, 90 e 180 dias de armazenamento a 5°C e 25°C de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (7M), isolado do grão de kefir de leite de Salvador - BA. A linhagem foi liofilizada utilizando os seguintes crioprotetores: TREA (trealose 5% p/v); SKM (leite desnatado 10% p/v); SAC (sacarose 15% p/v) e como controle SAL (salina 0,85% p/v). Os resultados apresentados são médias de dois experimentos.....	50
Figura 8 - Contagem de células viáveis (log UFC/g) logo após a liofilização (T0) e nos tempos 15, 45, 90 e 180 dias de armazenamento a 5°C e 25°C de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (6M), isolado do grão de kefir de leite de Curitiba – PR. A linhagem foi liofilizada utilizando os seguintes crioprotetores: TREA (trealose 5% p/v); SKM (leite desnatado 10% p/v); SAC (sacarose 15% p/v) e como controle SAL (salina 0,85% p/v). Os resultados apresentados são médias de dois experimentos.....	51
Figura 9 - Contagem de células viáveis (log UFC/g) logo após a liofilização (T0) e nos tempos 15, 45, 90 e 180 dias de armazenamento a 5°C e 25°C de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (2M), isolado do grão de kefir de água de Curitiba – PR. A linhagem foi liofilizada utilizando os seguintes crioprotetores: TREA (trealose 5% p/v); SKM (leite desnatado 10% p/v); SAC (sacarose 15% p/v) e como controle SAL (salina 0,85% p/v). Os resultados apresentados são de apenas um experimento.	52

- Figura 10** - Contagem de células viáveis (log UFC/g) logo após a liofilização (T0) e nos tempos 15, 45, 90 e 180 dias de armazenamento a 5°C e 25°C de *Saccharomyces unisporus* (5M), isolado do grão de kefir de leite de Curitiba - PR. A linhagem foi liofilizada utilizando os seguintes crioprotetores: TREA (trealose 5% p/v); SKM (leite desnatado 10% p/v SAC (sacarose 15% p/v) e como controle SAL (salina 0,85% p/v). Os resultados apresentados são médias de dois experimentos..... 53
- Figura 11** - Contagem de células viáveis (log UFC/g) logo após a liofilização (T0) e nos tempos 15, 45, 90 e 180 dias de armazenamento a 5°C e 25°C de *Lachancea fermentati* (9S), isolado do grão de kefir de água de Salvador – BA. A linhagem foi liofilizada utilizando os seguintes crioprotetores: TREA (trealose 5% p/v); SKM (leite desnatado 10% p/v SAC (sacarose 15% p/v) e como controle SAL (salina 0,85% p/v). Os resultados apresentados são médias de dois experimentos..... 54
- Figura 12** - Padrão de crescimento de *Lactococcus lactis* 4U em caldo MRS a 28 °C. A cinética de crescimento foi avaliada pela medida da absorbância a 600 nm a cada 30 minutos, durante 24 horas. O resultado é a média de três a seis leituras. As curvas representam o padrão de crescimento logo após a liofilização (a) e após o armazenamento de 45 dias a 25 ± 2 °C (b) e 5 ± 2 °C (c), e de 180 dias a 25 ± 2 °C (d) e 5 ± 2 °C (e). A linhagem foi liofilizada em solução salina 0,85% p/v (SAL) ou na presença dos seguintes crioprotetores: TREA (trealose 5% p/v); SKM (leite desnatado 10% p/v); SAC (sacarose 15% p/v). A curva de crescimento da linhagem antes da liofilização foi utilizada como controle. Os desvios-padrão das médias permaneceram entre 3,28 x 10⁻⁶ e 0,16. 65
- Figura 13** - Padrão de crescimento de *Leuconostoc mesenteroides* 11U em caldo MRS a 28 °C. A cinética de crescimento foi avaliada pela medida da absorbância a 600 nm a cada 30 minutos, durante 24 horas. O resultado é a média de três a seis leituras. As curvas representam o padrão de crescimento logo após a liofilização (a) e após o armazenamento de 45 dias a 25 ± 2 °C (b) e 5 ± 2 °C (c), e de 180 dias a 25 ± 2 °C (d) e 5 ± 2 °C (e). A linhagem foi liofilizada em solução salina 0,85% p/v (SAL) ou na presença dos seguintes crioprotetores: TREA (trealose 5% p/v); SKM (leite desnatado 10% p/v); SAC (sacarose 15% p/v). A curva de crescimento da linhagem antes da liofilização foi utilizada como controle. Os desvios-padrão das médias permaneceram entre 1,31 x 10⁻⁶ e 0,14. 67
- Figura 14** - Padrão de crescimento de *Leuconostoc mesenteroides* 11U2 em caldo MRS a 28 °C. A cinética de crescimento foi avaliada pela medida da absorbância a 600 nm a cada 30 minutos, durante 24 horas. O resultado é a média de três a seis leituras. As curvas representam o padrão de crescimento logo após a liofilização (a) e após o armazenamento de 45 dias a 25 ± 2 °C (b) e 5 ± 2 °C (c), e de 180 dias a 25 ± 2 °C (d) e 5 ± 2 °C (e). A linhagem foi liofilizada em solução salina 0,85% p/v (SAL) ou na presença dos seguintes crioprotetores: TREA (trealose 5% p/v); SKM (leite desnatado 10% p/v); SAC (sacarose 15% p/v). A curva de crescimento da linhagem antes da liofilização foi utilizada como controle. Os desvios-padrão das médias permaneceram entre 7,55 x 10⁻⁶ e 0,15. 69
- Figura 15** - Padrão de crescimento de *Leuconostoc mesenteroides* 12U2 em caldo MRS a 28 °C. A cinética de crescimento foi avaliada pela medida da absorbância a 600 nm a cada 30 minutos, durante 24 horas. O resultado é a média de três a seis leituras. As curvas representam o padrão de crescimento logo após a liofilização (a) e após o armazenamento de 45 dias a 25 ± 2 °C (b) e 5 ± 2 °C (c), e de 180 dias a 25 ± 2 °C (d) e 5 ± 2 °C (e). A linhagem foi liofilizada em solução salina 0,85% p/v (SAL) ou na presença dos seguintes crioprotetores: TREA (trealose 5% p/v); SKM (leite desnatado 10% p/v); SAC (sacarose 15% p/v). A curva de

- crescimento da linhagem antes da liofilização foi utilizada como controle. Os desvios-padrão das médias permaneceram entre $7,54 \times 10^{-6}$ e 0,17..... 71
- Figura 16** - Padrão de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* 7M em caldo YPG a 37 °C. A cinética de crescimento foi avaliada pela medida da absorbância a 600 nm a cada 30 minutos, durante 24 horas. O resultado é a média de três a seis leituras. As curvas representam o padrão de crescimento logo após a liofilização (a) e após o armazenamento de 45 dias a 25 ± 2 °C (b) e 5 ± 2 °C (c), e de 180 dias a 25 ± 2 °C (d) e 5 ± 2 °C (e). Os desvios-padrão das médias permaneceram entre $5,94 \times 10^{-4}$ e 0,12..... 74
- Figura 17** - Padrão de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* 6M em caldo YPG a 37 °C. A cinética de crescimento foi avaliada pela medida da absorbância a 600 nm a cada 30 minutos, durante 24 horas. O resultado é a média de três a seis leituras. As curvas representam o padrão de crescimento logo após a liofilização (a) e após o armazenamento de 45 dias a 25 ± 2 °C (b) e 5 ± 2 °C (c), e de 180 dias a 25 ± 2 °C (d) e 5 ± 2 °C (e). Os desvios-padrão das médias permaneceram entre $1,41 \times 10^{-4}$ e 0,13..... 76
- Figura 18** - Padrão de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* 2M em caldo YPG a 37 °C. A cinética de crescimento foi avaliada pela medida da absorbância a 600 nm a cada 30 minutos, durante 24 horas. O resultado é a média de três a seis leituras. As curvas representam o padrão de crescimento logo após a liofilização (a) e após o armazenamento de 45 dias a 25 ± 2 °C (b) e 5 ± 2 °C (c), e de 180 dias a 25 ± 2 °C (d) e 5 ± 2 °C (e). Os desvios-padrão das médias permaneceram entre $2,09 \times 10^{-4}$ e 0,12..... 78
- Figura 19** - Padrão de crescimento de *Saccharomyces unisporus* 5M em caldo YPG a 30 °C. A cinética de crescimento foi avaliada pela medida da absorbância a 600 nm a cada 30 minutos, durante 24 horas. O resultado é a média de três a seis leituras. As curvas representam o padrão de crescimento logo após a liofilização (a) e após o armazenamento de 45 dias a 25 ± 2 °C (b) e 5 ± 2 °C (c), e de 180 dias a 25 ± 2 °C (d) e 5 ± 2 °C (e). Os desvios-padrão das médias permanecera entre $6,43 \times 10^{-4}$ e 0,16..... 80
- Figura 20** - Padrão de crescimento de *Lachancea fermentati* 9S em caldo YPG a 37 °C. A cinética de crescimento foi avaliada pela medida da absorbância a 600 nm a cada 30 minutos, durante 24 horas. O resultado é a média de três a seis leituras. As curvas representam o padrão de crescimento logo após a liofilização (a) e após o armazenamento de 45 dias a 25 ± 2 °C (b) e 5 ± 2 °C (c), e de 180 dias a 25 ± 2 °C (d) e 5 ± 2 °C (e). Os desvios-padrão das médias permanecera entre $1,34 \times 10^{-4}$ e 0,19..... 82
- Figura 21** - Valores de pH das bebidas fermentadas à base de leite, obtidas por inoculação de culturas iniciadoras ou dos grãos de kefir (controle), durante o processo de produção e armazenamento refrigerado a 5 °C por 28 dias..... 86
- Figura 22** - Valores de pH das bebidas fermentadas à base de leite adicionado de sacarose, obtidas por inoculação de culturas iniciadoras ou dos grãos de kefir (controle), durante o processo de produção e armazenamento refrigerado a 5 °C por 28 dias. 88
- Figura 23** - Valores de pH das bebidas fermentadas à base de água adicionada de açúcar mascavo, obtidas por inoculação de culturas iniciadoras ou dos grãos de kefir (controle), durante o processo de produção e armazenamento refrigerado a 5 °C por 28 dias. 88
- Figura 24** - Densidade populacional de BAL (log UFC/mL) das bebidas fermentadas à base de leite, obtidas por inoculação de culturas iniciadoras ou dos grãos de kefir (controle), durante o processo de produção e armazenamento refrigerado a 5 °C por 28 dias. 89
- Figura 25** - Densidade populacional de LEV (log UFC/mL) das bebidas fermentadas à base de leite, obtidas por inoculação de culturas iniciadoras ou dos grãos de kefir (controle), durante o processo de produção e armazenamento refrigerado a 5 °C por 28 dias. 91

- Figura 26** - Densidade populacional de BAL (log UFC/mL) das bebidas fermentadas à base de leite adicionado de sacarose, obtidas por inoculação de culturas iniciadoras ou dos grãos de kefir (controle), durante o processo de produção e armazenamento refrigerado a 5 °C por 28 dias.....92
- Figura 27** - Densidade populacional de LEV (log UFC/mL) das bebidas fermentadas à base de leite adicionado de sacarose, obtidas por inoculação de culturas iniciadoras ou dos grãos de kefir (controle), durante o processo de produção e armazenamento refrigerado a 5 °C por 28 dias.....93
- Figura 28** - Densidade populacional de BAL (log UFC/mL) das bebidas fermentadas à base de água adicionada de açúcar mascavo, obtidas por inoculação de culturas iniciadoras ou dos grãos de kefir (controle), durante o processo de produção e armazenamento refrigerado a 5 °C por 28 dias.....95
- Figura 29** - Densidade populacional de LEV (log UFC/mL) das bebidas fermentadas à base de água adicionada de açúcar mascavo, obtidas por inoculação de culturas iniciadoras ou dos grãos de kefir (controle), durante o processo de produção e armazenamento refrigerado a 5 °C por 28 dias.....97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Bactérias lácticas e leveduras isoladas de grãos de kefir.	39
Tabela 2 - Viabilidade (log UFC/mL) de <i>Lactococcus lactis</i> (4U) antes (T') e após liofilização (T0). A linhagem foi liofilizada utilizando os seguintes crioprotetores: TREA (trealose 5% p/v); SKM (leite desnatado 10% p/v); SAC (sacarose 15% p/v) e como controle SAL (salina 0,85% p/v). Os resultados apresentados são médias de dois experimentos.	46
Tabela 3 - Viabilidade (log UFC/mL) de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> (11U) antes (T') e após liofilização (T0). A linhagem foi liofilizada utilizando os seguintes crioprotetores: TREA (trealose 5% p/v); SKM (leite desnatado 10% p/v); SAC (sacarose 15% p/v) e como controle SAL (salina 0,85% p/v). Os resultados apresentados são médias de dois experimentos.	47
Tabela 4 - Viabilidade (log UFC/mL) de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> (11U2) antes (T') e após liofilização (T0). A linhagem foi liofilizada utilizando os seguintes crioprotetores: TREA (trealose 5% p/v); SKM (leite desnatado 10% p/v); SAC (sacarose 15% p/v) e como controle SAL (salina 0,85% p/v). Os resultados apresentados são médias de dois experimentos.	48
Tabela 5 - Viabilidade (log UFC/mL) de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> (12U2) antes (T') e após liofilização (T0). A linhagem foi liofilizada utilizando os seguintes crioprotetores: TREA (trealose 5% p/v); SKM (leite desnatado 10% p/v); SAC (sacarose 15% p/v) e como controle SAL (salina 0,85% p/v). Os resultados apresentados são médias de dois experimentos.	49
Tabela 6 - Viabilidade (log UFC/mL) de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (7M) antes (T') e após liofilização (T0). A linhagem foi liofilizada utilizando os seguintes crioprotetores: TREA (trealose 5% p/v); SKM (leite desnatado 10% p/v); SAC (sacarose 15% p/v) e como controle SAL (salina 0,85% p/v). Os resultados apresentados são médias de dois experimentos.	50
Tabela 7 - Viabilidade (log UFC/mL) de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (6M) antes (T') e após liofilização (T0). A linhagem foi liofilizada utilizando os seguintes crioprotetores: TREA (trealose 5% p/v); SKM (leite desnatado 10% p/v); SAC (sacarose 15% p/v) e como controle SAL (salina 0,85% p/v). Os resultados apresentados são médias de dois experimentos.	51
Tabela 8 - Viabilidade (log UFC/mL) de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (2M) antes (T') e após liofilização (T0). A linhagem foi liofilizada utilizando os seguintes crioprotetores: TREA (trealose 5% p/v); SKM (leite desnatado 10% p/v); SAC (sacarose 15% p/v) e como controle SAL (salina 0,85% p/v). Os resultados apresentados são de apenas um experimento.	52
Tabela 9 - Viabilidade (log UFC/mL) de <i>Saccharomyces unisporus</i> (5M) antes (T') e após liofilização (T0). A linhagem foi liofilizada utilizando os seguintes crioprotetores: TREA (trealose 5% p/v); SKM (leite desnatado 10% p/v); SAC (sacarose 15% p/v) e como controle SAL (salina 0,85% p/v). Os resultados apresentados são médias de dois experimentos.	53
Tabela 10 - Viabilidade (log UFC/mL) de <i>Lachancea fermentati</i> (9S) antes (T') e após liofilização (T0). A linhagem foi liofilizada utilizando os seguintes crioprotetores: TREA (trealose 5% p/v); SKM (leite desnatado 10% p/v); SAC (sacarose 15% p/v) e como controle SAL (salina 0,85% p/v). Os resultados apresentados são médias de dois experimentos.	54
Tabela 11 - Formulações de cultura iniciadora para produção das bebidas fermentadas.	85
Tabela 12 - Concentrações de etanol nas formulações fermentadas por culturas iniciadoras (% v/v de bebida fermentada) ao longo de 28 dias sob refrigeração (5 ± 2 °C).	98
Tabela 13 - Concentração de ácido láctico nas formulações fermentadas por culturas iniciadoras (g/100g de bebida fermentada) ao longo de 28 dias sob refrigeração (5 ± 2 °C).	101
Tabela 14 - Concentrações de ácido acético nas formulações fermentadas por culturas iniciadoras (mg/mL de bebida fermentada) ao longo de 28 dias sob refrigeração (5 ± 2 °C).	102

Tabela 15 - Viabilidade (log UFC/mL) de <i>Lactococcus lactis</i> (4U) liofilizado em diferentes crioprotetores durante armazenamento (25 ± 2 °C e 5 ± 2 °C). Média de dois experimentos realizados em tempos diferentes.....	119
Tabela 16 - Viabilidade (log UFC/mL) de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> (11U) liofilizado em diferentes crioprotetores durante armazenamento (25 ± 2 °C e 5 ± 2 °C). Média de dois experimentos realizados em tempos diferentes.	119
Tabela 17 - Viabilidade (log UFC/mL) de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> (11U2) liofilizado em diferentes crioprotetores durante armazenamento (25 ± 2 °C e 5 ± 2 °C). Média de dois experimentos realizados em tempos diferentes.	120
Tabela 18 - Viabilidade (log UFC/mL) de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> (12U2) liofilizado em diferentes crioprotetores durante armazenamento (25 ± 2 °C e 5 ± 2 °C). Média de dois experimentos realizados em tempos diferentes.	120
Tabela 19 - Viabilidade (log UFC/mL) de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (7M) liofilizado em diferentes crioprotetores durante armazenamento (25 ± 2 °C e 5 ± 2 °C). Média de dois experimentos realizados em tempos diferentes.	121
Tabela 20 - Viabilidade (log UFC/mL) de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (6M) liofilizado em diferentes crioprotetores durante armazenamento (25 ± 2 °C e 5 ± 2 °C). Média de dois experimentos realizados em tempos diferentes.	121
Tabela 21 - Viabilidade (log UFC/mL) de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (2M) liofilizado em diferentes crioprotetores durante armazenamento (25 ± 2 °C e 5 ± 2 °C). Resultados de um único experimento.	122
Tabela 22 - Viabilidade (log UFC/mL) de <i>Saccharomyces unisporus</i> (5M) liofilizado em diferentes crioprotetores durante armazenamento (25 ± 2 °C e 5 ± 2 °C). Média de dois experimentos realizados em tempos diferentes.	122
Tabela 23 - Viabilidade (log UFC/mL) de <i>Lachancea fermentati</i> (9S) liofilizado em diferentes crioprotetores durante armazenamento (25 ± 2 °C e 5 ± 2 °C). Média de dois experimentos realizados em tempos diferentes.....	123

RESUMO

Kefir é uma bebida fermentada, produzida pela inoculação dos grãos de kefir em substratos como leite e água açucarada. Estes grãos são constituídos por uma microbiota diversificada de bactérias e leveduras em associação simbiótica, envolvidos em uma matriz polissacarídica (kefirano). 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 se restringe ao ambiente doméstico, com inoculação direta dos grãos no substrato que se deseja fermentar. A bebida resultante não é padronizada, pois as características sensoriais e reológicas podem variar de acordo com as condições de manutenção e cultivo dos grãos. Para a produção padronizada em escala industrial de kefir torna-se necessário o uso de culturas iniciadoras. Diante disso, objetivou-se nesta pesquisa avaliar o efeito da liofilização, na presença ou não de sacarose, trealose ou *skim milk* como agentes crioprotetores, sobre a viabilidade e o padrão de crescimento de culturas lácticas (*Lactococcus* spp.; *Leuconostoc* spp.) e leveduras (*Saccharomyces* spp, *Lachancea fermentati*) isoladas de grãos de kefir de leite e água circulantes no território nacional, logo após a liofilização e durante o armazenamento a 5 ± 2 °C e 25 ± 2 °C. De modo geral, o uso de agentes crioprotetores no processo de desidratação e a temperatura de 5 ± 2 °C foram os parâmetros testados que permitiram maior manutenção da sobrevivência dos micro-organismos à liofilização. Uma linhagem de cada gênero de bactérias lácticas e uma levedura foram selecionados a partir da análise dos resultados quanto ao perfil de resistência ao processo, a fim de comporem formulações de culturas iniciadoras liofilizadas. Para cada formulação de cultura iniciadora testada foi verificado que as características físico-químicas (pH, ácido láctico, ácido acético e etanol) e microbiológicas (contagens de células viáveis) das bebidas produzidas à base de leite apresentaram características bem próximas ao kefir produzido com os grãos. Além disso, foram atendidos os padrões mínimos exigidos pela legislação brasileira, ao longo de 28 dias de armazenamento refrigerado. Desta forma, concluiu-se que foi possível a produção de kefir de leite fermentado com cultura iniciadora, a partir do uso de combinações de micro-organismos liofilizados isolados dos grãos de kefir.

Palavras-chave: kefir, cultura iniciadora, liofilização.

ABSTRACT

Kefir is a fermented beverage, traditionally made by the inoculation of kefir grains in food matrices, like milk and sugary water. These grains are constituted by a highly diverse microbiota of bacteria and yeast in a symbiotic association. These mixtures of microorganisms present in kefir grains are found surrounded by a matrix which has a polysaccharide nature, known as kefiran. Despite of several studies had demonstrated health benefits with the consumption of kefir, in Brazil the consumption of this beverage is still incipient, and the production is restrict to the domestic environment, with a direct inoculation of the grains in the substrate. This process results in non-standard beverages, with organoleptic and rheological characteristics that could vary depending on the conditions of maintenance and cultivation of the grains. For standardized large-scale production of kefir, it is necessary the use of starter cultures. Therefore, the aim of this research is to evaluate the effect of lyophilization on the viability and the growth pattern of lactic acid bacteria (*Lactococcus* spp.; *Leuconostoc* spp.) and yeasts (*Saccharomyces* spp, *Lachancea fermentati*) isolated from Brazilian kefir grains, right after the lyophilization process, using sucrose, threalose or skim milk as crioprotectants, and during storage at 5 ± 2 °C e 25 ± 2 °C. The use of cryoprotectants in the dehydration process and storage at 5 ± 2 °C allowed greater survival of the microorganisms to lyophilization. It were selected strains of each gender of acid lactic bacteria and yeast by analysis of the results on the profile of resistance to the process in order to compose formulations of lyophilized starter cultures. For each formulation of the starter culture tested, the physical-chemical (pH, lactic acid, acetic acid and ethanol) and microbiological (viable cells count) characteristics of the beverages made from milk presented characteristics very close to kefir produced with the grains. In addition, the standards required by Brazilian legislation were maintained along 28 days of refrigerated storage. Thus, it was demonstrated that it was possible to produce fermented milk kefir with starter culture, using combinations of lyophilized microorganism isolated from the kefir grains.

Key-words: kefir, starter culture, freeze drying.

1. INTRODUÇÃO

Kefir corresponde ao produto lácteo fermentado resultante da ação da 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), compondo os chamados grãos de kefir. Acredita-se que este produto, tradicionalmente artesanal, já era consumido pelos russos nas montanhas do Cáucaso no final do século XIX e, atualmente, é bastante difundido como alimento probiótico 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).

Por apresentar em sua constituição micro-organismos já caracterizados em diversos estudos como probióticos, o consumo adequado (com relação a frequência e proporção) gera inúmeros benefícios relatados na literatura científica, tais como propriedades antimicrobianas (SANTOS *et al.*, 2003; CHIFIRIUC *et al.*, 2011), anti-carcinogênicas e de inibição no crescimento de tumores (LEBLANC *et al.*, 2007), redução dos níveis de colesterol (HUANG *et al.*, 2013), melhora dos sintomas de intolerância à lactose (HERTZLER *et al.*, 2003) e capacidade de estimular as respostas imunológicas inatas de defesa contra patógenos (VINDEROLA *et al.*, 2006). Desta maneira, o kefir pode ser considerado um complexo produto com potencial probiótico, que desempenha várias propriedades funcionais e terapêuticas (GARROTE *et al.* 2010; KAKISU *et al.*, 2011; JOHN; DEESEENTHUM, 2015; FIORDA *et al.*, 2017). Considerando os inúmeros potenciais benefícios para saúde do hospedeiro, cresce o interesse industrial de produção de kefir (KIM *et al.*, 2018).

Os parâmetros físico-químicos e microbiológicos gerais do kefir são bem estabelecidos, porém algumas variações podem ocorrer dependendo da microbiota iniciadora presente nos grãos. Vale ressaltar que a composição microbiológica do leite fermentado e dos grãos de kefir são similares (KOLAKOWSKI; OZIMKIEWICZ, 2012). Acredita-se que populações bastante específicas presentes nos grãos contribuem para características sensoriais peculiares verificadas no produto fermentado (LEITE *et al.*, 2012). Sendo assim, conhecer a composição microbiológica e as características físico-químicas dos grãos de kefir e da bebida corresponde ao primeiro passo para se investigar e implementar uma produção industrial do produto em larga escala (MAGALHÃES *et al.*, 2011). Entretanto, um fator limitante para a indústria é a

produção padronizada dos grãos de kefir capaz de resultar numa bebida com características semelhantes às obtidas pelos grãos de kefir artesanal (KÖK TAS, 2015).

A utilização dos grãos de kefir para desenvolvimento de uma cultura iniciadora necessita da adoção de tecnologias que permitam a preservação dos grãos não só de forma confiável, ou seja, livre de contaminação, mas também econômica, visando facilitar a produção industrial e comercialização da bebida fermentada. Alguns métodos de preservação dos grãos de kefir já foram testados, como por exemplo na pesquisa desenvolvida por Witthuhn *et al.* (2005) que avaliaram o impacto de quatro diferentes métodos de preservação, a citar: liofilização, refrigeração a 4 °C, secagem ao ar livre e congelamento a -18 °C, sobre a atividade dos grãos de kefir durante 10 meses de armazenamento. Foi observado que as quatro técnicas foram capazes de preservar os grãos de kefir no período avaliado, entretanto os grãos liofilizados e secos ao ar livre apresentaram aumento significativo na fase lag e menor taxa inicial de redução do pH.

Nos últimos anos, pode-se observar 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 empregadas há várias décadas na preservação de culturas microbianas de modo geral, pois são capazes de manter a viabilidade dos micro-organismos durante longos períodos de armazenamento. Métodos como a liofilização (*freeze-drying*) em particular 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 potencialmente probióticas (MORGAN *et al.*, 2006; MENG *et al.*, 2008).

Desta maneira, objetivou-se neste trabalho liofilizar culturas isoladas de grãos de kefir circulantes no Brasil, a fim de acompanhar a viabilidade e o padrão de crescimento destas linhagens após o processo de liofilização. Além disso, foram selecionadas linhagens para o desenvolvimento de culturas iniciadoras, na tentativa de produção de bebidas à base de leite e água adicionada de açúcar mascavo semelhantes às bebidas tradicionalmente conhecidas, preparadas com os grãos de kefir de leite e de água.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Leites fermentados

Os leites fermentados são basicamente produzidos a partir da conversão de lactose presente no leite em ácido láctico, devido ao metabolismo microbiano de culturas iniciadoras (ARYANA; OLSON, 2017). A produção é realizada em diversos países e utiliza o método mais antigo empregado para conservação de alimentos, a fermentação, que objetiva prolongar a vida de prateleira do leite, matéria-prima de alta perecibilidade nestes produtos. Os métodos de obtenção dos leites fermentados são bastante complexos por envolverem conhecimentos em diversas áreas como microbiologia, enzimologia, engenharia, física, química e bioquímica (TAMIME, 2002).

A classificação como leite fermentado é dada aos produtos obtidos a partir da fermentação láctica resultante da ação de cultivos de micro-organismos específicos capazes de gerar alterações na matéria-prima, tais como decréscimo do pH e formação de coágulo devido precipitação isoelétrica das proteínas do leite (ou leite reconstituído). Para isto, estes cultivos devem ser viáveis e estarem ativos e abundantes no produto final, durante todo o prazo de validade especificado pelo fabricante (BRASIL, 2007; CODEX ALIMENTARIUS, 2018). Vale ressaltar ainda que a Instrução Normativa nº 46 do MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), do ano de 2007, regulamenta que as contagens de bactérias ácido lácticas totais presentes em leite fermentados e/ou cultivados devem alcançar populações mínimas de 10^6 UFC (Unidades formadoras de colônias) /mL ou g do produto. Atualmente, a maioria dos produtos fermentados lácteos utilizam bactérias ácido-lácticas (BAL), incluindo gêneros de *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* e *Leuconostoc* (ARYANA; OLSON, 2017).

Exemplos de leites fermentados reconhecidos pela legislação brasileira são: iogurte, leite fermentado ou cultivado, leite acidófilo, coalhada, kumys e kefir. Cada um deles possuem características e processos de produção típicos que permitem a distinção em relação aos demais. O iogurte, por exemplo, utiliza obrigatoriamente como inóculo uma mistura de *Streptococcus salivarius* spp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* (ARYANA; OLSON, 2017). O kefir como bebida possui não só a presença de bactérias ácido-lácticas, mas também a presença leveduras.

2.2. Kefir: definição, características gerais e histórico

O Kefir tem sido descrito como bebida fermentada pela ação de bactérias e leveduras incorporadas em uma matriz composta de proteínas e polissacarídeos, conhecida como kefirano. Toda esta estrutura constitui os grãos de kefir (AHMED *et al.*, 2013; NIELSEN *et al.*, 2014; ROSA *et al.*, 2017). A associação simbiótica complexa dos grãos é comumente inoculada em leite de vaca ou água adicionada de açúcar mascavo. Entretanto, já existem relatos de sua adição em outras matrizes alimentícias lácteas, como leite de cabra ou ovelha, e em não-lácteas, tais como extrato de noz, soja, coco, arroz e amendoim (MAGALHÃES *et al.*, 2011; NIELSEN *et al.*, 2014; OTLES; CAGINDI, 2003).

Os grãos de kefir possuem variação no comprimento de 1-3 cm, formato irregular e coloração que pode variar do branco ao amarelo. São basicamente estruturas lobuladas semelhantes a couve-flor, de textura firme e aspecto viscoso (FARNWORTH, 2005; AHMED *et al.*, 2013; GAO; LI, 2016). A composição microbiológica destes grãos é constituída por bactérias ácido lácticas, bactérias ácido acéticas e leveduras. O metabolismo simbiótico destes micro-organismos durante a fermentação é o responsável pela produção de ácido láctico, dióxido de carbono, etanol e compostos aromáticos, capazes de atribuir a bebida fermentada propriedades e características sensoriais únicas (OTLES; CAGINDI, 2003).

Segundo o *Codex Alimentarius* (2018), kefir é o leite fermentado por culturas de micro-organismos iniciadores preparados a partir dos grãos de kefir, *Lactobacillus 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. Os grãos de kefir também são constituídos por espécies de leveduras fermentadoras de lactose como a espécie de *Kluyveromyces marxianus* e não fermentadoras de lactose, como as espécies de *Saccharomyces unisporus*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces exiguus* (CODEX ALIMENTARIUS, 2018). Por outro lado, a legislação brasileira ressalta ainda a presença de outros micro-organismos, como *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium* sp. e *Streptococcus salivarius* subsp *thermophilus* (BRASIL, 2007). A interação microbiana existente no kefir é bastante complexa devido a diversidade da microbiota individual observada nos grãos. Entretanto, algumas espécies de *Lactobacillus* estão sempre presentes, como *L. acidophilus*, *L. plantarum* (NIELSEN *et al.*, 2014).

Com relação as características físico-químicas, o *Codex Alimentarius* (2018) também preconiza alguns parâmetros que contemplam a bebida fermentada kefir de leite, tais como a

presença mínima de 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 0,6. Em contrapartida, no Brasil a concentração de ácido láctico na bebida fermentada pelos grãos de kefir não deve exceder 1% do volume total, ou seja, deve conter no máximo 1 g de ácido láctico a cada 100 g do produto fermentado. Com relação ao conteúdo de proteínas deve-se apresentar no mínimo 2,9 g a cada 100 g do produto. O kefir, assim como para os leites fermentados, são classificados de acordo com seu conteúdo de matéria gorda láctea, dada em gramas a cada 100 gramas do produto, sendo: com creme (mínimo de 6 g); integral (3,0 a 5,9 g); parcialmente desnatado (0,6 a 2,5 g) e desnatado (máximo de 0,5 g). A legislação determina ainda que a porcentagem de etanol nas bebidas estejam 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 (OMS) e Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO). Sobre o kefir de água ainda não existem especificações regulamentadas por lei.

A composição química e nutricional desta bebida fermentada depende diretamente da matéria-prima utilizada, bem como o seu conteúdo de gorduras e a composição de micro-organismos presentes no grão ou culturas iniciadoras empregadas no processo. O kefir contém todos os nutrientes importantes e durante a fermentação majoritariamente têm-se a formação de ácido láctico, CO₂ e álcool que garantem ao kefir sabor levemente ácido e refrescante (OTLES CAGINDI, 2003; AHMED *et al.*, 2013). Já foi relatado conteúdo de 1,98 g/L de CO₂ e 0,48% de álcool (BESHKOVA *et al.*, 2002). Além disso, vários compostos responsáveis pelo *flavour*, tais como acetaldeído e diacetil (BESHKOVA *et al.*, 2003; OTLES; CAGINDI, 2003), ácido pirúvico, ácido hopúrico, propiônico e butírico (GÜZEL-SEYDIM *et al.*, 2000a) já foram encontrados. O kefir contém ainda vitaminas, minerais e aminoácidos essenciais para manutenção das funções do organismo. É rico em vitamina B₁, B₁₂ cálcio, ácido fólico e vitamina K (OTLES; CAGINDI, 2003). Além disso, a concentração total de micro-organismos no kefir deve ser no mínimo de 10⁷ UFC/g e 10⁴ UFC/g de BAL e leveduras, respectivamente (JOHN; DEESEENTHUM, 2015; CODEX ALIMENTARIUS, 2018).

Segundo relatos encontrados na literatura científica, a origem do kefir antecede os registros escritos. Histórias surgiram desde então para tentar explicar a formação dos primeiros grãos originais de kefir. Diz a lenda que o profeta Muhammad presenteou os cristãos ortodoxos, que viviam na região montanhosa do Cáucaso na Ásia Central, com grãos de kefir que foram passados de geração para geração. Estes eram cultivados artesanalmente em leite de vaca ou cabra, dentro de sacos de couro ou em barris de carvalho (FARNWORTH, 1999; OTLES;

CAGINDI, 2003; FARNWORTH, 2005; NIELSEN *et al.*, 2014). Dessa forma, o conhecimento da produção e consumo de kefir se espalhou pelas montanhas e outras regiões e, atualmente, é uma bebida fermentada bem conhecida na Europa Oriental e em outros lugares do mundo, sendo produzida não só de forma artesanal em alguns países, inclusive no Brasil, mas também em escala industrial, como na Alemanha, Áustria, França, Luxemburgo, República Tcheca, Eslováquia, Polônia e Israel (NIELSEN *et al.*, 2014; ROSA *et al.*, 2017).

Os grãos de kefir não são capazes de se formarem espontaneamente quando culturas isoladas destes grãos são colocadas para crescerem juntas em tubos de ensaio. Além disso, também não pode ser sintetizado artificialmente. Somente sob condições favoráveis ocorre o desenvolvimento dos grãos. O método tradicional de fermentação do leite por grãos de kefir mais difundido na literatura científica baseia-se na utilização de sacos de pele de cabra (FARNWORTH; MAINVILLE, 2003; NIELSEN *et al.*, 2014). Em função do armazenamento do leite nestes sacos, visando a preservação e aumento da sua vida-útil, ocorreu acidentalmente a formação dos grãos de kefir na antiguidade (FARNWORTH; MAINVILLE, 2003).

Motaghi *et al.* (1997) testaram produzir grãos de kefir utilizando sacos de pele de cabra cheios de leite pasteurizado e adicionados de inóculo da microbiota de ovelhas. Posteriormente, estas estruturas foram incubadas a 24-26°C, homogeneizadas e após a formação do coágulo, cerca de 75% do conteúdo coagulado foi substituído por leite fresco. Ao final de 12 semanas repetindo o procedimento foi observado o desenvolvimento de uma camada polissacarídica na parte interna dos sacos, e quando estas camadas foram removidas e propagadas em leite pasteurizado, originavam a mesma formação de coágulo no leite. Aparentemente, os autores concluíram ter chegado a algo semelhante aos grãos.

Brigitte (2016) realizou experimentos reproduzindo condições de cultivo caseira dos grãos de kefir em leite pasteurizado. Foi utilizado neste ensaio, cultura *starter* de kefir adquirida no mercado, contendo os seguintes isolados liofilizados em leite em pó desnatado e ácido ascórbico: *Streptococcus lactis*, *S. diacetylactis*, *S. cremoris*, *Lactobacillus casei*, *L. acidophilus*, leveduras *Saccharomyces lactis* e *S. cerevisiae* (levedura Ale da Califórnia, WLP001). Foi confeccionada uma bolsa caseira junto com cristais de açúcar. As bolsas foram imersas parcialmente em leite pasteurizado. Após fermentação a 28-30 °C por 24 horas, as bolsas foram transferidas para leite fresco e 10% v/v do leite fermentado, chamado de “meio fermento”, utilizado para impulsionar a fermentação. Após o final do período de transferências para novo substrato, um material granular foi descoberto dentro das bolsas. Este material foi

coletado e gerou grãos de diferentes dimensões. Os grãos menores foram destinados a produção tradicional de kefir. Ao que foi descrito, as culturas iniciadoras originais estavam encapsuladas de forma natural no que parecia ser um grão. Este estudo corresponde ao primeiro relato documentado com sucesso que conseguiu chegar a algo semelhante aos grãos de kefir conhecidos.

2.3. Perfil microbiológico: grãos e bebida

Os grãos de kefir são constituídos por uma comunidade microbiológica complexa, na qual tem-se a presença de diferentes micro-organismos, predominantemente bactérias ácido lácticas e leveduras (PRADO *et al.*, 2015). Devido à natureza fastidiosa das culturas que compõem os grãos, os primeiros isolamentos foram bastante difíceis por causa, principalmente, das bactérias ácido lácticas que em sua maioria são micro-organismos anaeróbios aerotolerantes com exigências nutricionais adicionais para crescimento. Mesmo assim, muitos micro-organismos já foram isolados e identificados a partir dos grãos e da bebida, como espécies de bactérias ácido lácticas (*Lactobacillus* sp.; *Lactococcus* sp.; *Leuconostoc* sp.) e leveduras (*Saccharomyces* sp.; *Kluyveromyces* sp., *Candida* sp., *Mycotorula* sp., *Torulaspora* sp., *Cryptococcus* sp., *Pichia* sp.) (NIELSEN *et al.*, 2014). A combinação de técnicas dependentes e independentes de cultivos é de fundamental importância para investigar a diversidade microbiana tanto nos grãos, como na bebida fermentada (GAROFALO *et al.*, 2015; BENGGOA *et al.*, 2018).

A composição microbiana dos grãos de kefir varia consideravelmente com a origem geográfica do grão, método e substrato empregado na produção (GAROFALO *et al.*, 2015; PRADO *et al.*, 2015). Portanto, grãos de kefir do Tibete se difere dos russos, irlandeses, de Taiwan e da Turquia (PRADO *et al.*, 2015). Wang *et al.* (2012) examinaram grãos de kefir e determinou na região externa a presença de lactococos e leveduras, enquanto internamente foi verificada predominância de lactobacilos.

Alguns estudos demonstram esta realidade, como o realizado por Garofalo *et al.* (2015) que investigaram a microbiota presente nos grãos de kefir de diferentes regiões da Itália, utilizando análises de microscopia eletrônica de varredura, contagens de micro-organismos viáveis em meios de cultura seletivos e as técnicas da biologia molecular: PCR-DGGE e pirosequenciamento. *Lactobacillus kefirianofaciens* e *Dekkera anomala* foram as espécies de bactéria e levedura mais encontradas, respectivamente.

Pesquisas semelhantes têm sido realizadas a fim de determinar os principais micro-organismos presentes nos grãos de kefir brasileiros. Neste contexto, Zanirati *et al.* (2015) isolaram e identificaram 108 bactérias ácido-lácticas de grãos de kefir de leite e de água

adicionada de açúcar mascavo provenientes de cinco locais diferentes do Brasil. Apenas nos grãos de leite foram encontradas espécies de *L. kefir*, *L. kefiranofaciens*, *Leuconostoc mesenteroides*, enquanto *L. parafarraginis*, *L. diolivorans* e *Oenococcus oeni* foram identificados apenas nos grãos de água.

No que concerne a composição microbiológica da bebida fermentada pelos grãos de kefir, Magalhães *et al.* (2011) identificaram 359 isolados com relevante presença de bactérias ácido lácticas (60,5%), seguido de leveduras (30,6%) e apenas 8,9% de bactérias ácido acéticas. Dentre as espécies mais encontradas foram citadas: *Lactobacillus paracasei* (89 isolados) entre bactérias lácticas; *Acetobacter lovaniensis*, representando as bactérias ácido acéticas (32 isolados) e a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (41 isolados). Leite e colaboradores (2012) também investigaram os micro-organismos presentes em amostra brasileira de kefir de leite durante produção e armazenamento refrigerado, através de métodos dependentes e independentes de cultivo. Foi possível determinar a presença de *Lac. lactis* spp. *cremoris* e *Lac. lactis* ssp. *lactis*, *Ln. mesenteroides*, *A. lovaniensis* e *S. cerevisiae*, *L. kefiranofaciens*, *L. kefir* e *L. parakfir* na bebida fermentada pelos grãos. De acordo com Marsh *et al.* (2013), a bebida possui menor diversidade microbiana se comparada aos grãos de kefir.

2.4. Métodos de produção de kefir

O método tradicional, comumente difundido e aplicado para obtenção artesanal de kefir corresponde a inoculação direta dos grãos em leite cru. No entanto, existem diversas maneiras de produção e algumas variações vêm sendo investigadas pelos estudiosos de alimentos, a fim de aplicar técnicas mais modernas, capazes de obter um produto final semelhante ao que se conhece como kefir (OTLES; CAGINDI, 2003; FARNWORTH, 2005).

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 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 a 5 agitações manuais. Após a formação do coágulo, resfriou-se lentamente o produto final da fermentação até 10 °C/20 horas. Os grãos de kefir foram recuperados e lavados com água destilada esterilizada, com auxílio de uma peneira. Ao final do processo, 400 mL da bebida fermentada foram distribuídos em garrafas de vidro e acondicionados a 4 °C. O grande diferencial em relação aos demais leites fermentados é que

no kefir os grãos inoculados são recuperados ao final do processo de fermentação (GUZEL-SEYDIM *et al.*, 2011), como pode ser observado no fluxograma apresentado na Figura 1.

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. Além disso, a diversidade da microbiota dos grãos resulta em fermentação irregular, o que prejudica na padronização do produto (ASSADI *et al.*, 2000; WITTHUHN *et al.*, 2005; NAMBOU *et al.*, 2014; NIELSEN *et al.*, 2014). Vale ressaltar ainda a instabilidade da microbiota, pois em cada recuperação e nova inoculação dos grãos no substrato podem ocorrer alterações na composição microbiana e consequente declínio na qualidade da bebida (NIELSEN *et al.*, 2014; SIMOVA *et al.*, 2002).

Outro método estudado se baseou na utilização de culturas puras isoladas dos grãos de kefir e das linhagens produtoras de iogurte. Beshkova *et al.* (2012) 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) de iogurte; *L. helveticus* MP12 (2% m/v); *Lac. lactis* C15 (1%) e *S. cerevisiae* A13 (0,5% m/v). Por outro lado, na fermentação sucessiva, o leite nas mesmas condições foi inoculado com as culturas iniciadoras de iogurte (*S. thermophilus* T15 e *L. bulgaricus* HP1 a 2% m/v) e com os isolados dos grãos de kefir, *L. helveticus* MP12 (2% m/v) e *Lac. lactis* C15 (1% m/v). A incubação foi a 28 °C ou até pH 4,7. Após resfriamento do coágulo formado, adicionou-se sacarose (0,45%) e a levedura *S. cerevisiae* A13 (0,5% m/v). A mistura foi então agitada, envasada e incubada a 20 °C por mais 16 horas. Diversos outros estudos também utilizaram como inóculo culturas puras isoladas ou não dos grãos de kefir (ASSADI *et al.*, 2000; MAGALHÃES *et al.*, 2011; NAMBOU *et al.*, 2014; GUL *et al.*, 2015; SARLAK *et al.*, 2017).

É importante salientar que independentemente do método empregado, os parâmetros microbiológicos, a composição química e sensorial, tais como o *flavour*, aroma e sabor levemente ácido característico são afetados diretamente pelo tamanho do inóculo adicionado ao substrato, uso de agitação durante a fermentação, além da temperatura, duração do resfriamento e maturação após processo fermentativo (FARNWORTH, 2005).

Mais recentemente, Kim *et al.* (2018) elucidaram método proposto para produção industrial de kefir. O chamado “*backslopping*” tem como objetivo a produção em larga escala da bebida fermentada, contendo a microbiota original dos grãos de kefir. O método consiste

basicamente na utilização de pequeno volume da própria bebida fermentada como inóculo. “*Backslopping*” já tem sido aplicada na produção de chucrute, massa azeda e *koumiss*, produtos que ainda pouco se sabe sobre a ecologia microbiana. Com relação aos resultados obtidos neste estudo, houve aumento do rendimento na produção da bebida em 50 vezes. Além disso, as características microbiológicas, nutricionais e físico-químicas (exceto contagens de *L. kefir*, % de carboidrato e pH) foram semelhantes ao kefir preparado a partir dos grãos. Entretanto, o processo pode gerar alterações microbianas no produto final, uma vez que algumas espécies-chave da fermentação podem ser perdidas ao longo do tempo, como *L. kefir*, *L. kefiranofaciens*, *L. parakefir*.

2.5. Culturas iniciadoras (*Starter*)

As culturas iniciadoras ou *starters* são linhagens de micro-organismos utilizados pela indústria de alimentos capazes de promover a fermentação de matérias-primas, permitindo assim a preservação e qualidade de alimentos perecíveis. O emprego destas culturas se tornou bastante usual no final do século XIX, impulsionando assim a produção de cervejas, vinho, vinagre e pão. O princípio básico de sua utilização requer conhecimentos do metabolismo, fisiologia microbiana e suas interações com o produto alimentício. Diversos alimentos são produzidos por fermentação tais como vinhos, vinagre, cerveja, pão, pickles, leites fermentados, queijos, iogurtes, salsichas e derivados de carnes. Além disso, muitos novos produtos ainda podem ser desenvolvidos a partir de combinações de diferentes matérias-primas, culturas iniciadoras e condições de fermentação (HANSEN, 2002; AMMOR; MAYO, 2007).

Alguns critérios são importantes na seleção de linhagens potenciais para serem adotadas como culturas iniciadoras industriais. É importante optar por linhagens que não apresentem plasmídeos recombinantes, genes de virulência de bactérias patogênicas e com ausência de marcadores de resistência a antibióticos (HANSEN, 2002). Além do mais, alguns fatores de desempenho das culturas devem ser levados em consideração, tais como: adaptação a várias condições de fabricação, rendimento alto de produção, rápida acidificação no tanque, estabilidade do pH durante armazenamento, manutenção da viabilidade durante o *shelf-life* do produto e aspectos sensoriais típicos (SURONO; HOSONO, 2011). Desta maneira, existem conveniências na utilização de culturas iniciadoras, pois a aplicação permite maior confiabilidade e segurança durante o processo de fermentação, além de permitir maior flexibilidade e estabilidade à produção industrial (HANSEN, 2002).

As bactérias ácido lácticas são os micro-organismos mais amplamente aplicados na produção de alimentos em todo mundo e representam a maior parte das culturas iniciadoras

conhecidas. São estes micro-organismos os responsáveis inicialmente pela conversão dos carboidratos em metabólitos desejáveis como álcool, ácido lático, ácido acético e dióxido de carbono. Com relação às características, as BAL de modo geral são micro-organismos auxotróficos para metade dos aminoácidos totais, ou seja, têm requerimentos nutricionais complexos e geralmente necessitam ser cultivadas em meios ricos ou em leite. Além da produção de álcool e ácidos que são conservantes naturais, as bactérias lácticas também produzem compostos responsáveis pelo aroma, sabor e textura dos produtos fermentados (HANSEN, 2002; RATTRAY; O'CONNELL, 2011).

A maioria das empresas envolvidas na produção de culturas iniciadoras são fornecedoras para indústrias de 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. Neste sentido, as linhagens probióticas têm ganhado espaço no mercado, atraindo a atenção dos consumidores por promoverem saúde mediante consumo adequado (HANSEN, 2002; AMMOR; MAYO, 2007; NAMI *et al.*, 2018).

As culturas iniciadoras de bactérias lácticas destinadas à produção de leites fermentados são classificadas quanto a 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, leite fermentado e alguns tipos de queijos, e exemplos destes micro-organismos são as espécies de *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. paracasei* subsp. *paracasei*. Já as culturas mesofílicas geralmente envolvem a presença de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* e espécies de *Leuconostoc*, e são aplicadas na produção de queijos, *koumiss*, *viili* e kefir (SURONO; HOSONO, 2011).

Existem diferentes tipos de culturas iniciadoras que são classificadas como líquidas, congeladas, liofilizadas (*Dri-vac*) e congeladas concentradas (*Direct Vat Set - DVS*). A aplicação das culturas líquidas, congeladas e liofilizadas se baseia no método tradicional de preparo de uma “cultura-mãe” a partir do inóculo (líquido, congelado ou liofilizado) preparado em volume de 100 mL do meio de cultura ideal de crescimento. Subcultivos são realizados em volume maior, para impulsionar o crescimento do micro-organismo e por fim inóculos de 1% são adicionadas no tanque de fermentação. Esta técnica ainda pode ser empregada industrialmente, no entanto, apresenta algumas desvantagens por ser um procedimento que demanda tempo, uma vez que é necessário realizar propagação das culturas (pelo menos três vezes). Além disso, exigem habilidade de operadores para evitar contaminações e, para as culturas líquidas e congeladas, tem-se maior custo de transporte (DO CARMO, 2006;

SURONO; HOSONO, 2011). Vale ressaltar ainda que cultivos sucessivos podem favorecer o surgimento de linhagens mutantes ou mesmo levar a perda de certos plasmídeos funcionais (por exemplo, *Lac⁻* e *Prt⁻*), alterando as características do produto final (SURONO; HOSONO, 2011).

Uma alternativa ao uso destas culturas são as chamadas DVS para fabricação de derivados lácteos, que são adicionadas diretamente nos tanques de fermentação, devido alta viabilidade e concentração de células. As culturas DVS são obtidas a partir da centrifugação que visa a concentração das células microbianas, seguida do processo de desidratação, através da aplicação de técnicas como a liofilização ou *spray-drying*, com a finalidade de conservação das culturas (DO CARMO, 2006; SURONO; HOSONO, 2011).

Rattray; O'Connell (2011) descreveram duas maneiras de produção de kefir comercial: (i) leite inicialmente fermentado pelos grãos de kefir, sendo a bebida resultante utilizada como inóculo e (2) kefir produzido com aplicação comercial de culturas iniciadoras (DVS) diretamente inoculadas no leite. O esquema representado na Figura 1, ilustra a utilização de culturas DVS para produção de kefir.

A aplicação de culturas DVS na produção de kefir simplifica o processo de obtenção da bebida e, desde que os micro-organismos sejam cuidadosamente selecionados, permite chegar a um produto final com qualidade e propriedades sensoriais aceitáveis. Não obstante, apesar da diversidade microbiana ser inferior, a vida útil do produto é maior (cerca de 28 dias), quando comparada a bebida adquirida com os grãos de kefir (3-12 dias) (RATTRAY; O'CONNELL, 2011).

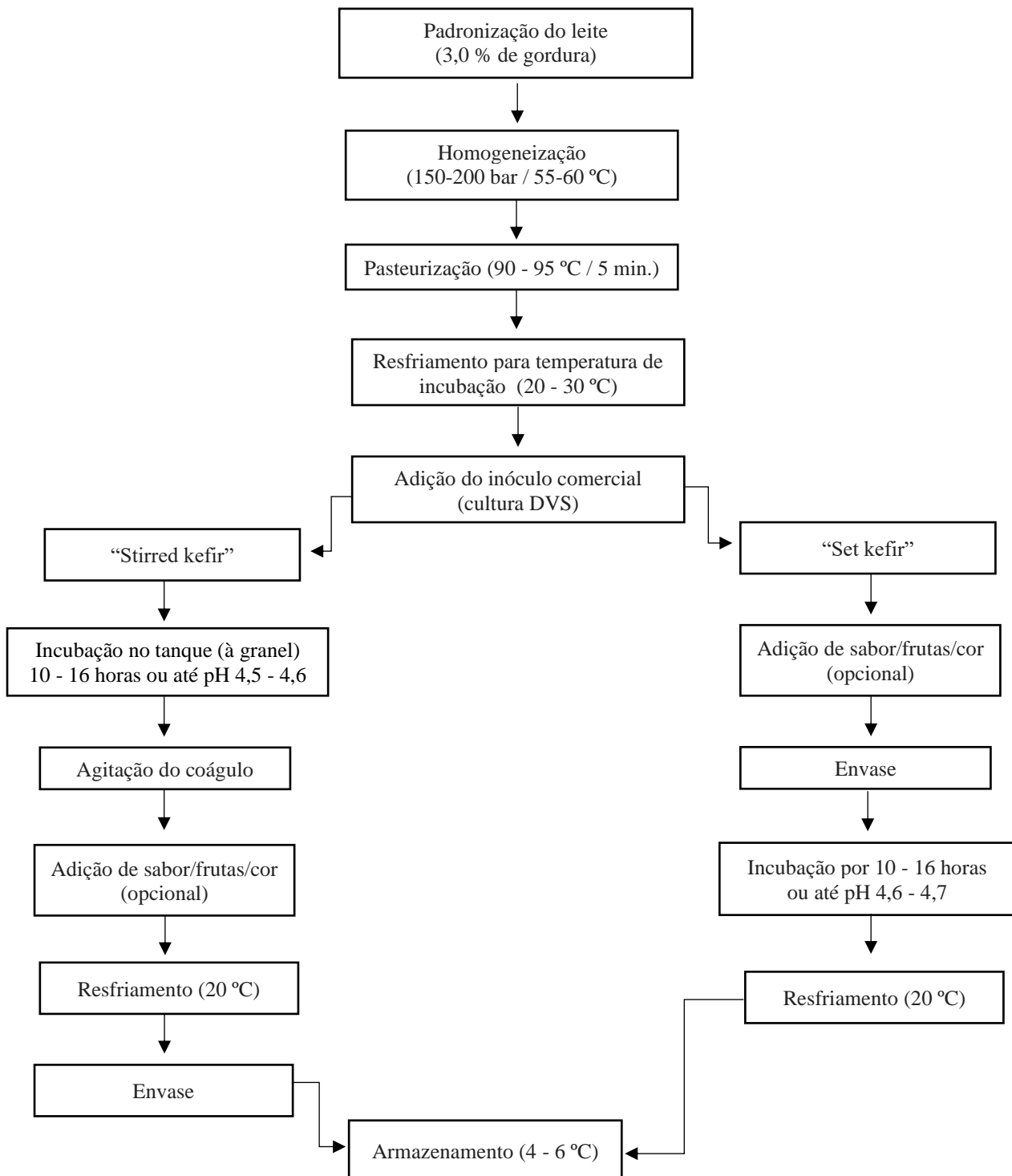


Figura 1 - Esquema da produção de kefir usando culturas comerciais (DVS).

Adaptado de (RATTRAY; O'CONNELL, 2011).

2.6. 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 (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).

Atualmente, a liofilização corresponde a técnica mais aplicada para obtenção e preservação de micro-organismos probióticos capazes de se manter viáveis por prolongados períodos de armazenamento (MENG *et al.*, 2008; KÖK TAS, 2015), além de corresponder ao método preferido por décadas para preservação de culturas iniciadoras e coleções de culturas microbianas em todo mundo, inclusive a *American Culture Type Collection* (ATCC) (MORGAN *et al.*, 2006; BOLLA *et al.*, 2010).

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 à 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, levando ao rompimento destas estruturas presentes nos micro-organismos. Assim como as demais tecnologias de desidratação, a liofilização também é influenciada por uma série de parâmetros, tais como linhagem microbiana utilizada, 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 (MENG *et al.*, 2008) e condições de armazenamento após a liofilização (MENG *et al.*, 2008; KÖK TAS, 2015). Recomenda-se para a liofilização que as culturas de micro-organismos estejam concentradas acima de 10^7 células, visando garantir sobrevivência suficiente não só depois do processo, mas também durante longos períodos de estocagem, reconstituição e propagação satisfatória das linhagens liofilizadas (BOZOGLU *et al.*, 1987; MORGAN *et al.*, 2006).

Quando escolhida como método de secagem de culturas microbianas, a liofilização também apresenta vantagens como a facilidade de transporte e armazenamento das culturas,

devido ao baixo volume obtido em pó. Entretanto, pode também provocar injúrias às células, afetando a viabilidade microbiológica da cultura, além de apresentar algumas desvantagens por ser um processo descontínuo, de alto custo de operação (KOURKOUTAS *et al.*, 2007), demandar tempo para obtenção das culturas desidratadas e pela baixa eficiência quando comparado à secagem por atomização, o que inviabiliza muitas vezes a aplicação desta tecnologia para produção de culturas iniciadoras de bactérias ácido lácticas (GONG *et al.*, 2014).

Alguns trabalhos já investigaram os efeitos gerados pela aplicação da tecnologia de liofilização em culturas isoladas de grãos de kefir. A pesquisa pioneira desenvolvida por Bolla *et al.* (2010) avaliou os efeitos causados pela técnica na viabilidade e propriedades probióticas de uma mistura contendo bactérias e leveduras isoladas de grãos de kefir (*Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces marxianus*). Os autores liofilizaram culturas de bactérias e leveduras isoladas de kefir, selecionadas em função das propriedades probióticas, obtendo ao final do processo uma mistura de micro-organismos liofilizados (MM). Além disso, o produto resultante da fermentação de leite por esta mistura também foi liofilizado (FMM). Posteriormente, verificou-se o efeito do armazenamento na viabilidade tanto dos micro-organismos 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 se comparada 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 possua as características da bebida artesanal fermentada. OUTROS PARÂMETROS?

2.6.1. Agentes crioprotetores

Os agentes crioprotetores são compostos comumente adicionados para fornecer proteção aos micro-organismos antes do congelamento ou processos de secagem (MORGAN *et al.*, 2006). Diversos crioprotetores podem ser adicionados durante a liofilização, visando minimizar os efeitos deletérios do processo aos micro-organismos. São comumente utilizados *skim milk*, proteína 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). Estes crioprotetores podem ser adicionados nos meios de crescimento dos micro-organismos ou imediatamente antes da etapa de congelamento que antecede a liofilização (MORGAN *et al.*, 2006).

Segundo Meryman (1974) e Hubalek (2003), os crioprotetores são classificados de acordo com o seu grau e tempo de penetração nas células: (a) penetração rápida (cerca de 30 minutos), protegem contra lesões causadas por congelamento lento, p. ex. metanol, etanol, dimetilformamida, metilacetamida, etilenoglicol; (b) os que penetram mais lentamente como o glicerol e (c) agentes não penetrantes, que protegem células submetidas à taxas rápidas de congelamento e descongelamento, que incluem os mono-, oligo- e polissacarídeos, manitol, sorbitol e dextrano. Estes últimos são compostos que geram proteção extracelular.

Uma abordagem mais atual, classificam os crioprotetores em duas categorias: (a) formadores de estrutura de vidro amorfo e (b) sais cristalizantes eutéticos. A primeira delas, engloba compostos tais como carboidratos, proteínas e polímeros e são responsáveis por induzir a formação de uma estrutura vítrea de alta viscosidade dentro e ao redor da célula, impedindo quaisquer mobilidades mínimas moleculares. Já os sais cristalizantes são sais eutéticos que são liberados da solução e formam estruturas cristalinas quando se atinge o ponto de congelamento. Entretanto, estes sais oferecem menor crioproteção, pois a formação de cristais de gelo ou sal pode danificar a membrana celular e durante o descongelamento o conteúdo das células podem extravasar (MORGAN *et al.*, 2006).

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 (MENG *et al.*, 2008). Açúcares como trealose e sacarose aumentam a tolerância de diversos micro-organismos à dessecação e estabilizam estruturas como proteínas e membranas, uma vez que substituem a água ao redor dos resíduos polares dentro dessas estruturas macromoleculares. Estes dois dissacarídeos formam ligações de hidrogênio que mantêm as estruturas na ausência da água retirada durante a desidratação (RUDOLPH; CROWE, 1985; LESLIE *et al.*, 1995; MORGAN *et al.*, 2006). Além disso, a trealose ainda possui alta temperatura de transição vítrea (T_g). A T_g nada mais é que a capacidade de um material amorfo rígido (sólido) ou cristalino de entrar em um estado móvel o suficiente para formar um líquido. Quanto maior a temperatura de transição vítrea, maior a estabilidade oferecida pelo crioprotetor nos materiais liofilizados (MORGAN *et al.*, 2006). Buitink e colaboradores (2000) verificaram que as proteínas também apresentavam alta temperatura de transição vítrea, até mesmo superior à dos açúcares de modo geral. Dessa maneira, soro de leite e leite em pó desnatado também são crioprotetores relevantes. Genericamente, os crioprotetores não permeáveis adsorvem na superfície microbiana e formam

uma camada viscosa, que causam efluxo parcial de água da célula e inibem a formação de cristais de gelo devido ao aumento da viscosidade da solução. Assim, mantém estrutura amorfa na proximidade das células (HUBALEK, 2003).

Muitos pesquisadores têm testado combinações de crioprotetores e verificado melhoria no desempenho. Uma mistura de crioprotetores pode produzir um efeito aditivo ou sinérgico, oferecendo proteção maior do que a ação isolada de cada um (HUBALEK, 2003). Zayed; Roos (2004) investigaram os efeitos de solução de sacarose, trealose, *skim milk* e de misturas destes compostos para verificar o efeito protetor durante a liofilização de *Lactobacillus salivarius* subsp. *Salivarius* (UCC 500) e estabilidade deste micro-organismo ao longo do armazenamento. O uso da trealose resultou em maior viabilidade (34%), se comparada aos demais crioprotetores empregados isoladamente. No entanto, quando foi utilizada a mistura (trealose + sacarose + *skim milk*) a porcentagem de sobreviventes aumentou para 74%, sendo, portanto, o meio de proteção mais eficiente. Contudo, segundo Morgan *et al.* (2006), o efeito dos crioprotetores está intimamente relacionado à linhagem de micro-organismo, ou seja, o uso de crioprotetores é linhagem-específico.

3. JUSTIFICATIVA

A bebida resultante da fermentação dos grãos de kefir adicionados comumente ao leite de vaca ou água açucarada é um produto tradicionalmente artesanal no Brasil, uma vez que os grãos são adquiridos e passados de pessoa para pessoa, sem saber ao certo qual sua origem inicial. Em virtude da alta diversidade da microbiota presente nos grãos de kefir, que variam até mesmo conforme região de origem, a indústria de alimentos encontra entraves para produção em larga escala de um produto padronizado fermentado pelos grãos. Diante da dificuldade de padronização, pesquisas de isolamento e identificação das culturas isoladas dos grãos de kefir são importantes para buscar desvendar a microbiota complexa que constituem estes grãos e, a partir daí desenvolver uma cultura iniciadora nacional, visando estimular a produção industrial de kefir no Brasil, com características semelhantes à tradicional bebida fermentada.

Na tentativa de atender a essa demanda, Zanirati (2015), desenvolveu um estudo que tinha como objetivo o isolamento e a identificação de bactérias do ácido lático e leveduras de grãos de kefir provenientes de cinco cidades brasileiras, cultivados em substratos diferentes, utilizando técnicas dependentes e independentes de cultivo. Destes isolados, algumas linhagens de *Lactobacillus* spp. já foram submetidas ao processo de liofilização na presença de concentrações distintas de diferentes agentes crioprotetores (leite desnatado, sacarose, trealose, amido e alginato de sódio), demonstrando que as linhagens apresentam diferentes perfis de resistência ao processo de secagem utilizado (ABATEMARCO, 2014).

Técnicas de secagem visando a preservação de culturas têm sido utilizadas por décadas, uma vez que culturas desidratadas requerem menores gastos com manutenção da cadeia do frio durante estocagem e distribuição, além de promover maior estabilidade das células microbianas. Entretanto, existem alguns desafios, como por exemplo a manutenção da viabilidade destas culturas, que sofrem alterações devido às modificações no metabolismo microbiano como consequência da redução da umidade. Muitos estudos estão sendo realizados a fim de determinar como reduzir os efeitos da desidratação na sobrevivência de culturas, principalmente das que possuem potencial probiótico ou qualquer outra aplicação biotecnológica. Uma das principais tecnologias aplicadas na atualidade que permitem a desidratação de culturas microbianas é a liofilização (*freeze-drying*).

Dessa forma, pretendeu-se realizar a desidratação das culturas de bactérias lácticas e leveduras isoladas de grãos de kefir, através da aplicação da técnica de *freeze-drying*, avaliar a

resistência das diferentes linhagens microbianas a este processo e verificar o potencial de uso de algumas dessas linhagens para a obtenção de bebidas fermentadas à base de leite e de água com açúcar mascavo. Os resultados obtidos neste trabalho serão de grande importância para a seleção de linhagens microbianas mais adequadas à composição de uma cultura iniciadora para produção de kefir. Esta alternativa pode ser bastante promissora para a indústria de alimentos, devido a inexistência de cultura iniciadora de kefir no Brasil.

4. OBJETIVO GERAL

Avaliar a viabilidade, o padrão de crescimento após liofilização e a potencialidade de uso de bactérias lácticas e leveduras isoladas de grãos de kefir circulantes no Brasil para geração de bebidas fermentadas à base de leite e água adicionada de açúcar mascavo.

4.1. Objetivos específicos

- i Submeter culturas de bactérias lácticas e leveduras isoladas de grãos de kefir ao processo de liofilização, utilizando para tanto os seguintes agentes crioprotetores: leite desnatado 10%, trealose 5% e sacarose 15%;
- ii Determinar a taxa de sobrevivência e o padrão de crescimento das linhagens liofilizadas durante 180 dias de armazenamento em temperatura ambiente ($25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) e de geladeira ($5^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$);
- iii Elaborar bebidas fermentadas (à base de leite e solução de açúcar mascavo), utilizando como culturas iniciadoras misturas contendo uma linhagem de cada gênero bacteriano e uma linhagem de levedura, selecionados pela resistência ao processo de conservação em estudo;
- iv Avaliar a contagem de bactérias lácticas totais e de leveduras das bebidas, logo após a fermentação e durante 28 dias de armazenamento sob refrigeração ($5 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$);
- v Determinar o pH, a concentração de ácido láctico, ácido acético e etanol nas diferentes bebidas elaboradas, logo após a fermentação e durante 28 dias de armazenamento sob refrigeração ($5^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$).

5. METODOLOGIA

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Micro-organismos (LEFM) e no Laboratório de apoio da Pós-Graduação do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB/UFMG).

5.1. Culturas de micro-organismos

Foram utilizadas no estudo proposto culturas de bactérias e leveduras apresentadas na Tabela 1, isoladas de grãos de kefir cultivados em leite ou em água adicionada de açúcar mascavo, oriundos de cinco cidades brasileiras, a listar: Belo Horizonte, Curitiba, Divinópolis, Salvador e Viçosa. Todas as culturas de bactérias foram previamente isoladas e identificadas por Zanirati (2015), por PCR ARDRA ou sequenciamento parcial do 16S RNAr. As leveduras isoladas foram submetidas à análise molecular por meio de PCR *fingerprinting*. Todas as culturas pertencem a coleção do laboratório LEFM e foram mantidas a -20°C em caldo MRS (*de Man, Rogosa and Sharpe*) para bactérias lácticas ou caldo YPG (*Yeast Peptone Glucose*) (extrato de levedura 1%, peptona 2%, glicose 2%) para leveduras, acrescidos de 20% de glicerol (80% v/v).

5.2. Preparo das amostras

O preparo das culturas de bactérias lácticas (BAL) dos gêneros *Lactococcus* e *Leuconostoc* foi realizado por meio de dois repiques sucessivos em caldo MRS e incubação a 28 °C durante 24 - 48 horas em aerobiose. As leveduras foram cultivadas em caldo YPG (extrato de levedura 1%, peptona 2%, glicose 2%) e incubados em agitador de bancada (Cientec – CT-712) a 30 °C para a linhagem 5M (*Saccharomyces cerevisiae*) e 37 °C para as demais linhagens de leveduras, por 48 horas.

As células cultivadas foram centrifugadas utilizando centrífuga (Thermo Scientific – Heraeus Megafuge 8R) a 2000 x g durante 10 minutos, lavadas por duas vezes com solução salina esterilizada 0,85% m/v e o *pellet* resultante foi ressuscitado em diferentes soluções de crioprotetores: sacarose 15% m/v, *skim-milk* 10% m/v, trealose 5% m/v. A determinação do uso destes crioprotetores foi baseada nos resultados gerados no trabalho desenvolvido por Abatemarco (2014). Como controle, as linhagens também foram ressuscitadas em solução salina 0,85% m/v. As suspensões finais continham em torno de 10⁹-10¹⁰ UFC/mL para bactérias e 10⁷ - 10⁸ UFC/mL para leveduras.

Tabela 1 - Bactérias lácticas e leveduras isoladas de grãos de kefir.

Nome da linhagem	Origem
<i>Bactérias lácticas</i>	
<i>Lactobacillus casei</i> 17U	Kefir água Belo Horizonte/MG
<i>Lactobacillus mali</i> 21U2	Kefir água Viçosa/MG
<i>Lactobacillus satsumensis</i> 18P	Kefir água Curitiba/PR
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 11U	Kefir leite Viçosa/MG
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 11U2	Kefir leite Viçosa/MG
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 12U2	Kefir leite Viçosa/MG
<i>Lactococcus lactis</i> 4U	Kefir leite Divinópolis/MG
<i>Leveduras</i>	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 6M	Kefir leite Curitiba/PR
<i>Saccharomyces unisporus</i> 5M	Kefir leite Curitiba/PR
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 7M	Kefir leite Salvador/BA
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 2M	Kefir água Curitiba/PR
<i>Lachancea fermentati</i> 9S	Kefir água Salvador/BA

Antes de serem liofilizadas, as suspensões microbianas dos gêneros *Lactococcus* e *Leuconostoc* foram diluídas serialmente em solução salina 0,85% m/v e plaqueadas em ágar MRS (diluições 10^{-2} ao 10^{-6}), seguindo de incubação a 28 °C/48 horas. A enumeração das leveduras foi através do plaqueamento das diluições 10^{-1} ao 10^{-5} das amostras em ágar YPG (extrato de levedura 1%, peptona 2%, glicose 2% + ágar bacteriológico 1,5%) e incubação a 30 °C para a linhagem 5M (*Saccharomyces cerevisiae*) e 37 °C para as demais linhagens de leveduras, por 2 a 3 dias.

As linhagens de *Lactobacillus* spp. também foram testadas com relação ao seu perfil de resistência à desidratação no trabalho anterior de Abatemarco (2014). As espécies citadas na Tabela 1 são as linhagens que apresentaram maior resistência ao processo de liofilização.

A determinação do número de células viáveis durante todo tempo de experimentação foi através das técnicas de microgota (NAGHILI *et al.*, 2013) e de espalhamento em superfície (“spread plate”), quando necessário (contagens abaixo de 4,0 log UFC/mL).

5.3. Desidratação das culturas por liofilização (*Freeze-drying*)

A técnica de liofilização foi baseada na metodologia proposta nos trabalhos de Li *et al.* (2011) e Bolla *et al.* (2010), com adaptações. Todos os micro-organismos listados na Tabela 1, exceto as espécies do gênero *Lactobacillus*, foram cultivados individualmente, segundo as

condições de crescimento já mencionadas no item anterior. Volumes 1 mL de cada suspensão microbiana (acrescida ou não de agente crioprotetor) foram distribuídos em frascos de vidro do tipo penicilina de 7 mL, previamente esterilizados e, em seguida, os conteúdos foram congelados instantaneamente utilizando-se nitrogênio líquido (-196 °C). Posteriormente, as amostras foram liofilizadas no equipamento de modelo K10, Liotop, Brasil, onde permaneceram por 24 horas a -98 °C e 4 Pa de pressão. Ao final do ciclo de liofilização, os frascos foram selados com tampas de borracha e lacres de alumínio para evitar a incorporação de umidade e então as amostras secas foram armazenadas sob refrigeração (5 ± 2 °C) e em temperatura ambiente (25 ± 2 °C).

5.4. Determinação da viabilidade e sobrevivência após liofilização e durante armazenamento

Imediatamente após a liofilização e em diferentes intervalos de tempo pré-estabelecidos (15, 45, 90 e 180 dias), amostras das linhagens liofilizadas estocadas sob refrigeração (5 ± 2 °C) e temperatura ambiente (25 ± 2 °C) foram escolhidas aleatoriamente para determinação dos micro-organismos viáveis. Para tanto, foram ressuspensas e diluídas serialmente em solução salina 0,85% m/v e plaqueadas (diluições 10^{-2} a 10^{-6}) em ágar MRS para bactérias lácticas, incubadas em estufa a 28 °C/48 horas para os gêneros *Lactococcus* e *Leuconostoc*. A enumeração das leveduras foi por meio do plaqueamento das diluições 10^{-1} ao 10^{-5} das amostras em ágar YPG (extrato de levedura 1%, peptona 2%, glicose 2%), seguindo de incubação a 30 °C para a linhagem 5M (*Saccharomyces cerevisiae*) e 37 °C para as demais linhagens de leveduras, por 2 a 3 dias.

Frascos contendo as linhagens liofilizadas na presença de cada crioprotetor foram pesados para se calcular o peso médio de cada amostra após o processo de desidratação. Mediante isso, para as bactérias ácido lácticas os valores de peso médio obtidos foram: 0,011 g para amostras liofilizadas com salina; 0,047 g para trealose; 0,105 g para *skim milk* e 0,097 g para sacarose. Para as leveduras, os valores de peso médio obtidos foram os seguintes: 0,024 g; 0,053 g; 0,113 g e 0,094 g para salina, trealose, *skim milk* e sacarose, respectivamente.

5.5. Determinação do padrão de crescimento *in vitro*

Com objetivo de determinar o padrão de crescimento *in vitro* das culturas de bactérias lácticas após a liofilização, utilizou-se o método descrito por Martins *et al.* (2007), adaptado para microplacas. Foram preparados inóculos de 2% m/v em caldo MRS a partir da cultura fresca de

cada uma das linhagens selecionadas e a partir das culturas desidratadas por liofilização. Em seguida, 200 µL dos meios inoculados (em triplicata) foram distribuídos nos poços de uma microplaca que foi incubada em um leitor ELISA (Microplate Spectrophotometer System SpectraMax 340 – Molecular Devices), obedecendo a temperatura ótima de crescimento, já descrita nos tópicos anteriores, para cada um dos gêneros de bactérias ácido lácticas deste estudo. O crescimento das culturas foi acompanhado pela leitura de OD_{600nm} a cada 30 minutos, durante 24 horas. A curva crescimento foi construída com base na média dos resultados da OD_{600nm}.

Para o padrão de crescimento *in vitro* das linhagens de leveduras também foram preparados inóculos de 2% em 10 mL de caldo YPG, a partir de cultura fresca das linhagens selecionadas e também a partir das amostras desidratadas, que permaneceram incubadas em *shaker* de bancada (Cientec – CT-712) a 30 ou 37 °C. Durante intervalos de tempos pré-definidos (0, 8, 24, 32 e 48 horas), volumes de 200 µL dos meios inoculados (em triplicata) foram distribuídos nos poços de uma microplaca para realizar leituras pontuais de densidade ótica a 600 nm em leitor ELISA (Microplate Spectrophotometer System SpectraMax 340 – Molecular Devices) (MARTINS *et al.*, 2007 adaptado).

5.6. Elaboração de bebidas fermentadas a partir de culturas liofilizadas

Para composição da cultura iniciadora (cultura *starter*) de cada bebida utilizou-se uma linhagem de cada um dos gêneros de bactérias lácticas (gêneros *Lactococcus*, *Leuconostoc* e *Lactobacillus*) e uma linhagem de levedura (gênero *Saccharomyces* e *Lachancea*), assim como considerado no trabalho desenvolvido por Carneiro (2010). As linhagens de *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Saccharomyces* escolhidas foram aquelas que obtiveram os melhores resultados nos experimentos de viabilidade e padrão de crescimento *in vitro* durante este estudo. As linhagens de *Lactobacillus* (*L. mali* 21U2, *L. satsumensis* 18P e *L. casei* 17U) foram selecionadas a partir dos resultados obtidos por Abatemarco (2014). Culturas destinadas à elaboração de bebidas à base de leite foram liofilizadas utilizando-se *skim milk* e aquelas destinadas à elaboração de bebidas à base de água foram liofilizadas utilizando-se sacarose como agente crioprotetor. As culturas foram utilizadas imediatamente após a liofilização ou num período não superior a 7 dias após a liofilização.

Os substratos utilizados para preparo foram:

- i 100 mL de leite de vaca integral (leite em pó reconstituído a 10% p/v - Itambé);
- ii 100 mL de leite de vaca integral (leite em pó reconstituído a 10% p/v - Itambé) adicionado de 31 g/L de sacarose (CARVALHO, 2011; CARNEIRO, 2010 adaptado);

iii 100 mL de solução de água adicionado de açúcar mascavo 5% p/v (Granum).

Estes substratos foram previamente autoclavados a 121 °C por 15 minutos. Inóculos das culturas liofilizadas ressuspensas em 1 mL de solução salina 0,85% foram adicionados simultaneamente aos substratos na proporção de 1% para cada linhagem selecionada, obedecendo as formulações das bebidas fermentadas. Em seguida, as amostras foram incubadas a 28 °C, por 24 horas, em estufa do tipo incubadora com convecção forçada (Isocide - ESCO Isotherm) e transferidas para geladeira (5 ± 2 °C), onde permaneceram por 28 dias.

O fluxograma apresentado na Figura 2 abaixo ilustra o passo a passo do preparo de kefir de leite, leite adoçado e água açucarada.

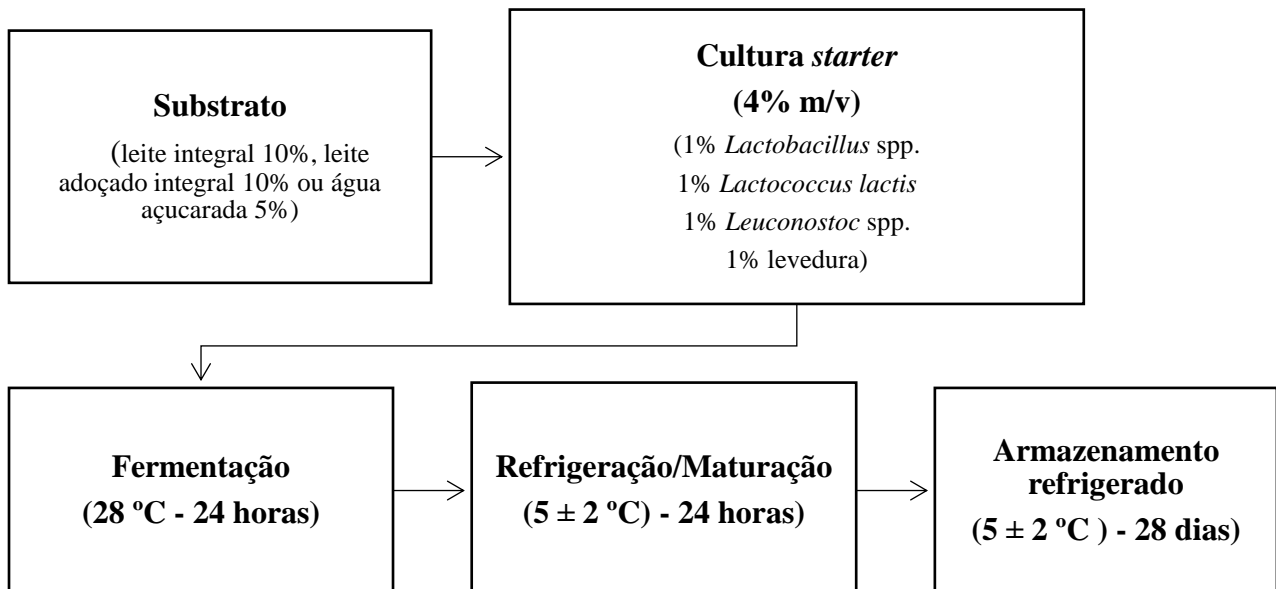


Figura 2 - Fluxograma de elaboração da bebida fermentada partir de culturas iniciadoras.

Adaptado de (BESHKOVA *et al.*, 2002)

Como controle, foram elaboradas bebidas com os mesmos substratos e nas mesmas condições, utilizando-se inóculo de 4% de grãos de kefir de leite e água (KLCU e KACU, respectivamente), provenientes da cidade de Curitiba/Paraná, que tem sido foco de estudo do nosso grupo de pesquisa.

5.7. Análises microbiológicas das bebidas fermentadas

Durante o período de 28 dias de estocagem sob refrigeração a 5 ± 2 °C determinou-se também a estabilidade das características microbiológicas das bebidas fermentadas (BRASIL, 2003). Durante o processo fermentativo das bebidas (24 e 48 horas) e nos intervalos de tempos de 7, 14 e 28 dias de armazenamento refrigerado, amostras de cada formulação foram recolhidas de forma asséptica, diluídas serialmente em solução salina 0,85% e plaqueadas por “*spread plate*” as diluições 10^{-2} a 10^{-6} para contagem de bactérias lácticas totais em ágar MRS suplementado de cicloheximida (Sigma-Aldrich/USA) (100 mg/L) e incubadas a 37 °C, em estufa aeróbica por 48 - 72 horas (SILVA *et al.* 1997; CARNEIRO, 2010; CARVALHO, 2011; VILLANOEVA, 2016).

Para determinar o número de células viáveis de leveduras nas bebidas, as diluições 10^{-1} a 10^{-5} foram plaqueadas em ágar YPG (extrato de levedura 1%, peptona 2%, glicose 2% + ágar bacteriológico 1,5%) adicionado de cloranfenicol (Sigma-Aldrich/USA) (100 mg/L) e as placas incubadas a 37 °C, durante 48 - 72 horas.

5.8. Análises físico-químicas das bebidas fermentadas

5.8.1. Medida do pH das bebidas fermentadas

Amostras de cada bebida foram recolhidas durante o processo fermentativo (24 e 48 horas) e nos tempos 7, 14 e 28 dias de armazenamento refrigerado (5 ± 2 °C) para leitura do pH utilizando potenciômetro modelo B-474 (Micronal), à temperatura ambiente (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2005).

5.8.2. Determinação de etanol, ácido acético e ácido láctico nas bebidas fermentadas

Nos mesmos intervalos de tempo descritos para as análises acima, alíquotas foram retiradas para dosagem do conteúdo de ácido láctico, ácido acético e etanol provenientes do metabolismo microbiano das linhagens de cada bebida.

Alíquotas de 1 mL de cada formulação foram inicialmente centrifugadas (Thermo Scientific – Heraeus Megafuge 8R) a 2000 x g durante 15 minutos à 4 °C, para coleta do sobrenadante das amostras e determinação dos compostos orgânicos de interesse através da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

Para a determinação da concentração etanol utilizou-se o cromatógrafo Shimadzu (Shimadzu, Japão). Cada amostra foi filtrada em membrana de acetato de celulose (Sartorius

Stedim – Biotech), com porosidade de 0,45 μm e analisadas nas seguintes condições: 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 20 μL ; detector de índice de refração RID 10-A; H_2SO_4 5mM como eluente e fluxo de 0,6 mL/min. (MOURA, 2015).

Para quantificação do ácido láctico e acético presentes nas bebidas foi necessário a realização de um pré-tratamento para a extração dos ácidos das amostras analisadas, segundo as metodologias adaptadas descritas por Fernandez-Garcia; McGregor (1994). Um mililitro de cada bebida foi diluído em 10 mL de ácido sulfúrico 4,5 mmol/L, agitado vagarosamente e misturado com um vórtex. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 2000 x g por 15 minutos. Os sobrenadantes foram filtrados em membrana de acetato de celulose (Sartorius Stedim – Biotech), com porosidade de 0,45 μm . As análises cromatográficas foram realizadas com os mesmos parâmetros descritos para determinação de etanol, porém utilizou-se neste caso detecção em comprimento de onda de 210 nm.

As concentrações finais foram calculadas a partir da comparação com dados obtidos de curvas padrão de cada um dos componentes avaliados.

5.9. Análises estatísticas

Todos os gráficos e análises estatísticas (quando necessário) dos resultados obtidos foram executados no *software* GraphPad 6 Prism® (GraphPad Software Inc.). Foram aplicados o teste Two-way ANOVA para análise de variâncias e o teste de Tukey para comparação entre as médias dos resultados de pH e contagens de micro-organismos viáveis, a fim de identificar possíveis diferenças significativas entre as bebidas fermentadas durante armazenamento ($p < 0,05$).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Viabilidade após liofilização e armazenamento de linhagens isoladas de grãos de kefir

Nove linhagens isoladas de grãos de kefir de origem brasileira foram desidratadas por liofilização, dentre elas um *Lc. lactis*, três *Ln. mesenteroides* e cinco leveduras dos gêneros *Saccharomyces* e *Lachancea*. Avaliou-se a interferência da utilização de agentes crioprotetores e a influência da temperatura na viabilidade microbiana durante o armazenamento das amostras liofilizadas, por 180 dias a 5 ± 2 °C e 25 ± 2 °C.

A liofilização é um processo tecnológico de conservação que é aplicado para desidratação de culturas de micro-organismos visando manutenção da viabilidade e atividade funcional por prolongados períodos de armazenamento (CARVALHO *et al.*, 2003). O emprego de culturas liofilizadas é bastante conveniente do ponto de vista comercial e de aplicação industrial (CARVALHO *et al.*, 2004; STRASSER *et al.*, 2008). No entanto, o processo pode gerar perdas significativas e muitas vezes irreversíveis na viabilidade dos micro-organismos (CHEN *et al.*, 2006; MORGAN *et al.*, 2006). Os principais fatores que causam lesões nas células microbianas são choque frio e alterações na permeabilidade da membrana durante a etapa de congelamento. Estas alterações da permeabilidade da parede celular e lesões metabólicas são identificados por alterações nas exigências de crescimento dos micro-organismos após o processo (BOZOGLU *et al.*, 1987).

Na literatura científica tem sido relatada ausência de condições ideais para maximizar a recuperação de micro-organismos após a liofilização, ou seja, faltam teorias genéricas para otimizar a taxa de sobrevivência que possam ser aplicadas para qualquer micro-organismo. Linhagens podem diferir em seu comportamento de secagem (LIAN *et al.*, 2002; CARVALHO *et al.*, 2003; CARVALHO *et al.*, 2004) submetidos às mesmas condições. Muitos são os trabalhos sobre liofilização de micro-organismos já publicados, porém são bastante específicos e com comportamentos particulares frente as diversas condições testadas (MORGAN *et al.*, 2006). Este comportamento linhagem-dependente foi verificado para as linhagens de *Ln. mesenteroides* e *S. cerevisiae* avaliadas neste trabalho.

Os resultados apresentados nas figuras 3 a 11 e nas tabelas 2 a 10 correspondem às contagens de células viáveis (log UFC/g) de bactérias lácticas e leveduras deste estudo, logo após a liofilização e durante armazenamento (0, 15, 45, 90 e 180 dias) a 5 ± 2 °C e 25 ± 2 °C.

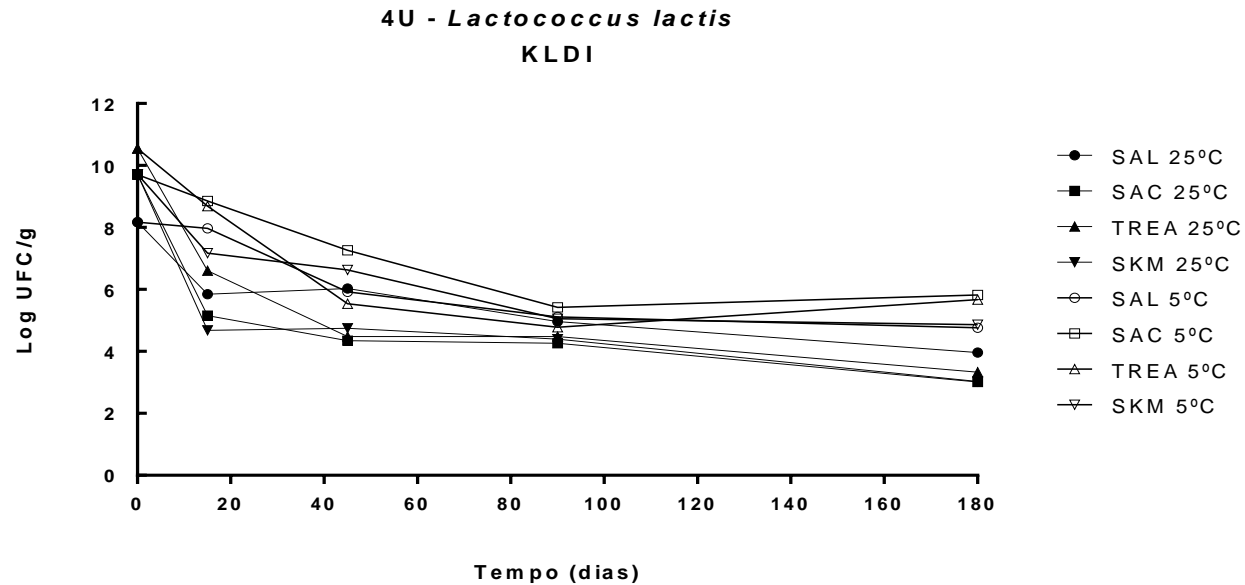


Figura 3 - Contagem de células viáveis (log UFC/g) logo após a liofilização (T₀) e nos tempos 15, 45, 90 e 180 dias de armazenamento a 5°C e 25°C de *Lactococcus lactis* (4U), isolado do grão de kefir de leite de Divinópolis - MG. A linhagem foi liofilizada utilizando os seguintes crioprotetores: TREA (trealose 5% p/v); SKM (leite desnatado 10% p/v); SAC (sacarose 15% p/v) e como controle SAL (salina 0,85% p/v). Os resultados apresentados são médias de dois experimentos.

Tabela 2 - Viabilidade (log UFC/mL) de *Lactococcus lactis* (4U) antes (T') e após liofilização (T₀). A linhagem foi liofilizada utilizando os seguintes crioprotetores: TREA (trealose 5% p/v); SKM (leite desnatado 10% p/v); SAC (sacarose 15% p/v) e como controle SAL (salina 0,85% p/v). Os resultados apresentados são médias de dois experimentos.

4U	SAL	SAC	TREA	SKM
T'	9,28	9,28	9,28	9,28
T ₀	6,21	8,69	9,21	8,73

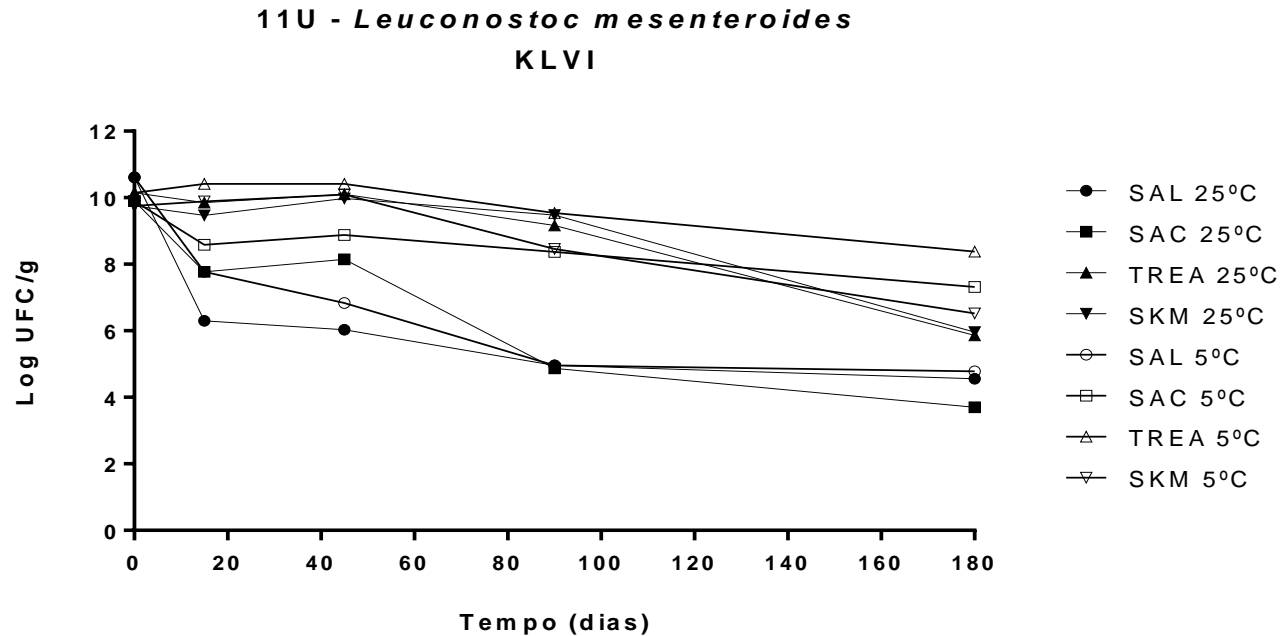


Figura 4 - Contagem de células viáveis (log UFC/g) logo após a liofilização (T0) e nos tempos 15, 45, 90 e 180 dias de armazenamento a 5°C e 25°C de *Leuconostoc mesenteroides* (11U), isolado do grão de kefir de leite de Viçosa – MG. A linhagem foi liofilizada utilizando os seguintes crioprotetores: TREA (trealose 5% p/v); SKM (leite desnatado 10% p/v); SAC (sacarose 15% p/v) e como controle SAL (salina 0,85% p/v). Os resultados apresentados são médias de dois experimentos.

Tabela 3 - Viabilidade (log UFC/mL) de *Leuconostoc mesenteroides* (11U) antes (T') e após liofilização (T0). A linhagem foi liofilizada utilizando os seguintes crioprotetores: TREA (trealose 5% p/v); SKM (leite desnatado 10% p/v); SAC (sacarose 15% p/v) e como controle SAL (salina 0,85% p/v). Os resultados apresentados são médias de dois experimentos.

11U	SAL	SAC	TREA	SKM
T'	8,87	8,87	8,87	8,87
T0	8,66	8,89	8,82	8,78

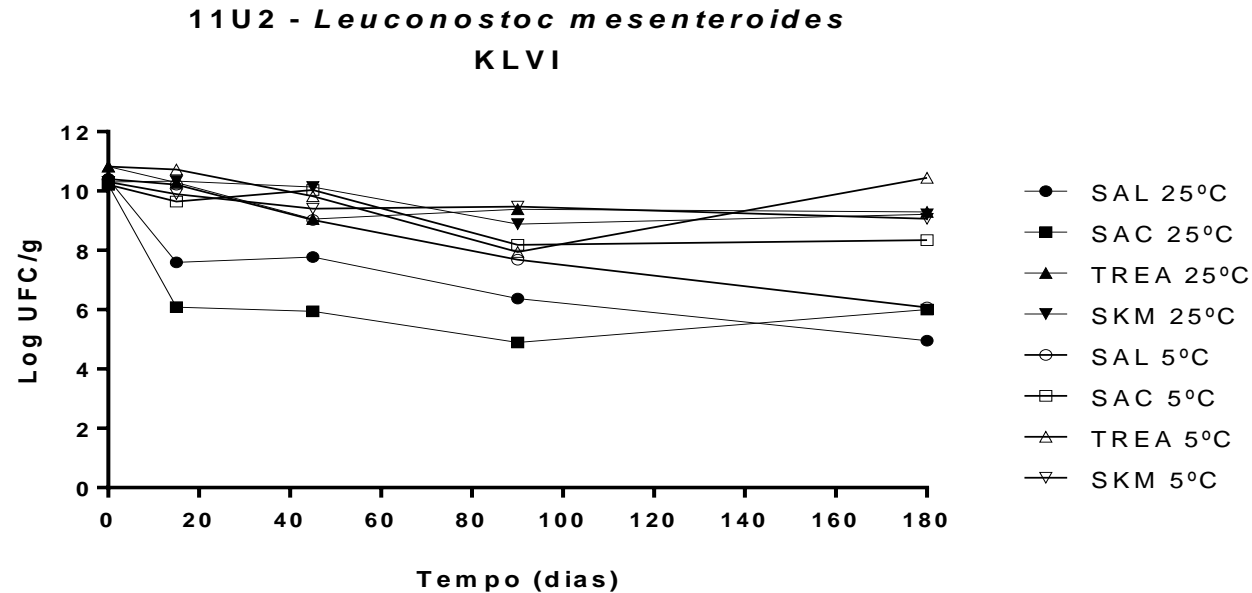


Figura 5 - Contagem de células viáveis (log UFC/g) logo após a liofilização (T0) e nos tempos 15, 45, 90 e 180 dias de armazenamento a 5°C e 25°C de *Leuconostoc mesenteroides* (11U2), isolado do grão de kefir de leite de Viçosa – MG. A linhagem foi liofilizada utilizando os seguintes crioprotetores: TREA (trealose 5% p/v); SKM (leite desnatado 10% p/v); SAC (sacarose 15% p/v) e como controle SAL (salina 0,85% p/v). Os resultados apresentados são médias de dois experimentos.

Tabela 4 - Viabilidade (log UFC/mL) de *Leuconostoc mesenteroides* (11U2) antes (T') e após liofilização (T0). A linhagem foi liofilizada utilizando os seguintes crioprotetores: TREA (trealose 5% p/v); SKM (leite desnatado 10% p/v); SAC (sacarose 15% p/v) e como controle SAL (salina 0,85% p/v). Os resultados apresentados são médias de dois experimentos.

11U2	SAL	SAC	TREA	SKM
T'	9,11	9,11	9,11	9,11
T0	8,45	9,21	9,50	9,33

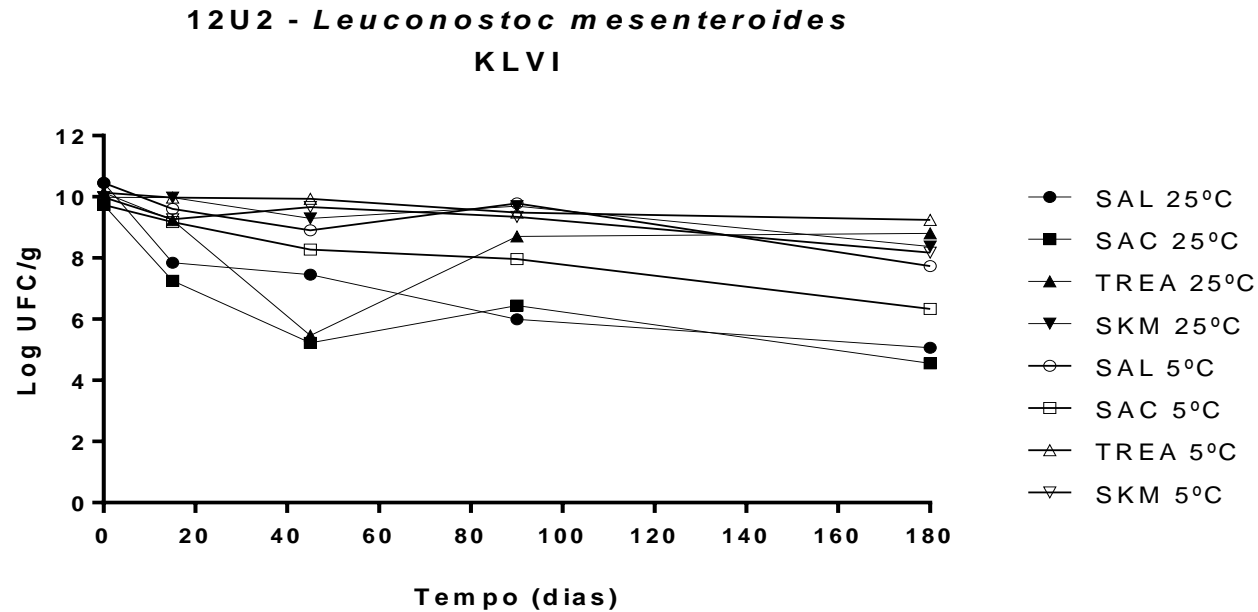


Figura 6 - Contagem de células viáveis (log UFC/g) logo após a liofilização (T0) e nos tempos 15, 45, 90 e 180 dias de armazenamento a 5°C e 25°C de *Leuconostoc mesenteroides* (12U2), isolado do grão de kefir de leite de Viçosa – MG. A linhagem foi liofilizada utilizando os seguintes crioprotetores: TREA (trealose 5% p/v); SKM (leite desnatado 10% p/v); SAC (sacarose 15% p/v) e como controle SAL (salina 0,85% p/v). Os resultados apresentados são médias de dois experimentos.

Tabela 5 - Viabilidade (log UFC/mL) de *Leuconostoc mesenteroides* (12U2) antes (T') e após liofilização (T0). A linhagem foi liofilizada utilizando os seguintes crioprotetores: TREA (trealose 5% p/v); SKM (leite desnatado 10% p/v); SAC (sacarose 15% p/v) e como controle SAL (salina 0,85% p/v). Os resultados apresentados são médias de dois experimentos.

12U2*	SAL	SAC	TREA	SKM
T'	8,83	8,83	8,83	8,83
T0	8,50	8,73	8,81	9,01

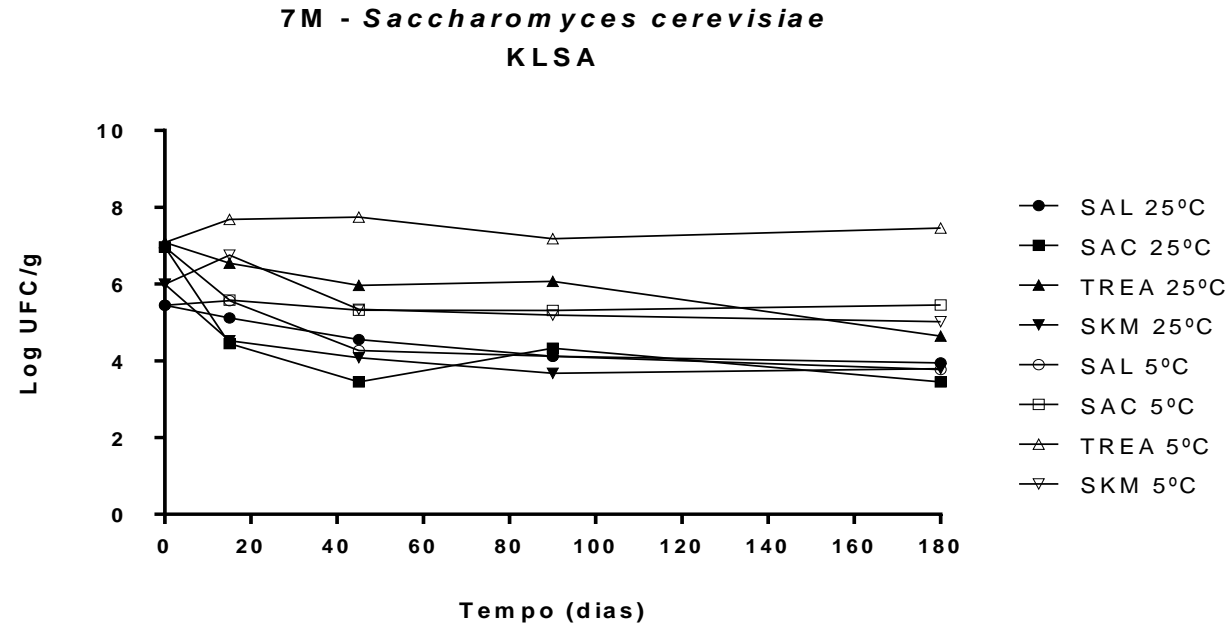


Figura 7 - Contagem de células viáveis (log UFC/g) logo após a liofilização (T₀) e nos tempos 15, 45, 90 e 180 dias de armazenamento a 5°C e 25°C de *Saccharomyces cerevisiae* (7M), isolado do grão de kefir de leite de Salvador - BA. A linhagem foi liofilizada utilizando os seguintes crioprotetores: TREA (trealose 5% p/v); SKM (leite desnatado 10% p/v); SAC (sacarose 15% p/v) e como controle SAL (salina 0,85% p/v). Os resultados apresentados são médias de dois experimentos.

Tabela 6 - Viabilidade (log UFC/mL) de *Saccharomyces cerevisiae* (7M) antes (T') e após liofilização (T₀). A linhagem foi liofilizada utilizando os seguintes crioprotetores: TREA (trealose 5% p/v); SKM (leite desnatado 10% p/v); SAC (sacarose 15% p/v) e como controle SAL (salina 0,85% p/v). Os resultados apresentados são médias de dois experimentos.

7M	SAL	SAC	TREA	SKM
T'	7,34	7,22	7,22	7,07
T ₀	3,83	6,02	5,81	4,97

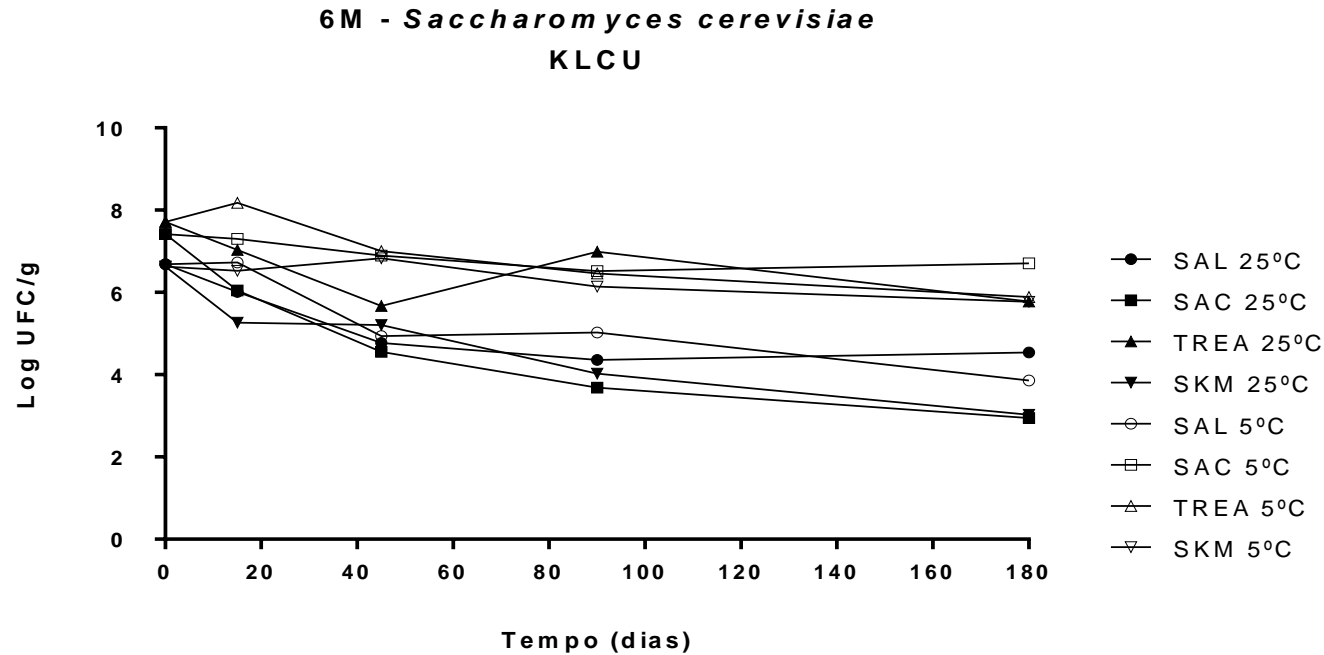


Figura 8 - Contagem de células viáveis (log UFC/g) logo após a liofilização (T₀) e nos tempos 15, 45, 90 e 180 dias de armazenamento a 5°C e 25°C de *Saccharomyces cerevisiae* (6M), isolado do grão de kefir de leite de Curitiba – PR. A linhagem foi liofilizada utilizando os seguintes crioprotetores: TREA (trealose 5% p/v); SKM (leite desnatado 10% p/v); SAC (sacarose 15% p/v) e como controle SAL (salina 0,85% p/v). Os resultados apresentados são médias de dois experimentos.

Tabela 7 - Viabilidade (log UFC/mL) de *Saccharomyces cerevisiae* (6M) antes (T') e após liofilização (T₀). A linhagem foi liofilizada utilizando os seguintes crioprotetores: TREA (trealose 5% p/v); SKM (leite desnatado 10% p/v); SAC (sacarose 15% p/v) e como controle SAL (salina 0,85% p/v). Os resultados apresentados são médias de dois experimentos.

6M	SAL	SAC	TREA	SKM
T'	7,87	7,83	7,83	7,82
T ₀	5,07	6,47	6,44	5,60

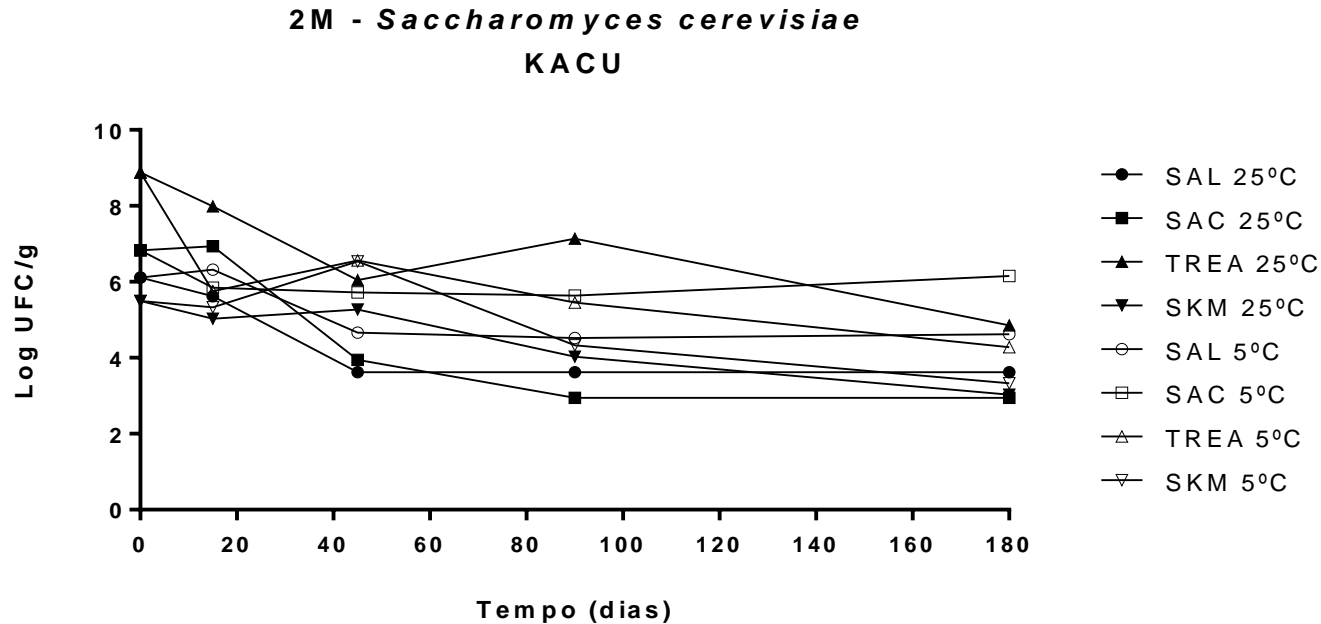


Figura 9 - Contagem de células viáveis (log UFC/g) logo após a liofilização (T0) e nos tempos 15, 45, 90 e 180 dias de armazenamento a 5°C e 25°C de *Saccharomyces cerevisiae* (2M), isolado do grão de kefir de água de Curitiba – PR. A linhagem foi liofilizada utilizando os seguintes crioprotetores: TREA (trealose 5% p/v); SKM (leite desnatado 10% p/v); SAC (sacarose 15% p/v) e como controle SAL (salina 0,85% p/v). Os resultados apresentados são de apenas um experimento.

Tabela 8 - Viabilidade (log UFC/mL) de *Saccharomyces cerevisiae* (2M) antes (T') e após liofilização (T0). A linhagem foi liofilizada utilizando os seguintes crioprotetores: TREA (trealose 5% p/v); SKM (leite desnatado 10% p/v); SAC (sacarose 15% p/v) e como controle SAL (salina 0,85% p/v). Os resultados apresentados são de apenas um experimento.

2M	SAL	SAC	TREA	SKM
T'	7,27	7,00	6,80	7,11
T0	4,49	5,88	7,60	4,47

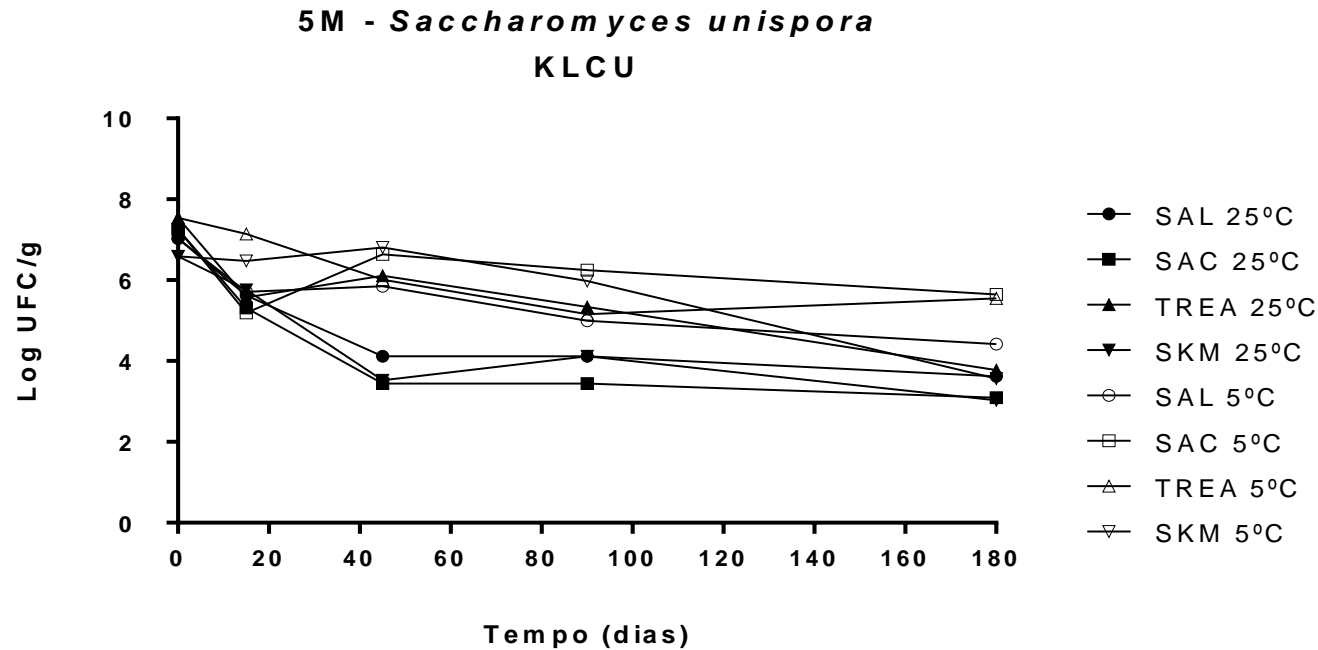


Figura 10 - Contagem de células viáveis (log UFC/g) logo após a liofilização (T₀) e nos tempos 15, 45, 90 e 180 dias de armazenamento a 5°C e 25°C de *Saccharomyces unisporus* (5M), isolado do grão de kefir de leite de Curitiba - PR. A linhagem foi liofilizada utilizando os seguintes crioprotetores: TREA (trealose 5% p/v); SKM (leite desnatado 10% p/v SAC (sacarose 15% p/v) e como controle SAL (salina 0,85% p/v). Os resultados apresentados são médias de dois experimentos.

Tabela 9 - Viabilidade (log UFC/mL) de *Saccharomyces unisporus* (5M) antes (T') e após liofilização (T₀). A linhagem foi liofilizada utilizando os seguintes crioprotetores: TREA (trealose 5% p/v); SKM (leite desnatado 10% p/v); SAC (sacarose 15% p/v) e como controle SAL (salina 0,85% p/v). Os resultados apresentados são médias de dois experimentos.

5M	SAL	SAC	TREA	SKM
T'	8,24	7,89	7,63	8,10
T ₀	5,41	6,31	6,27	5,56

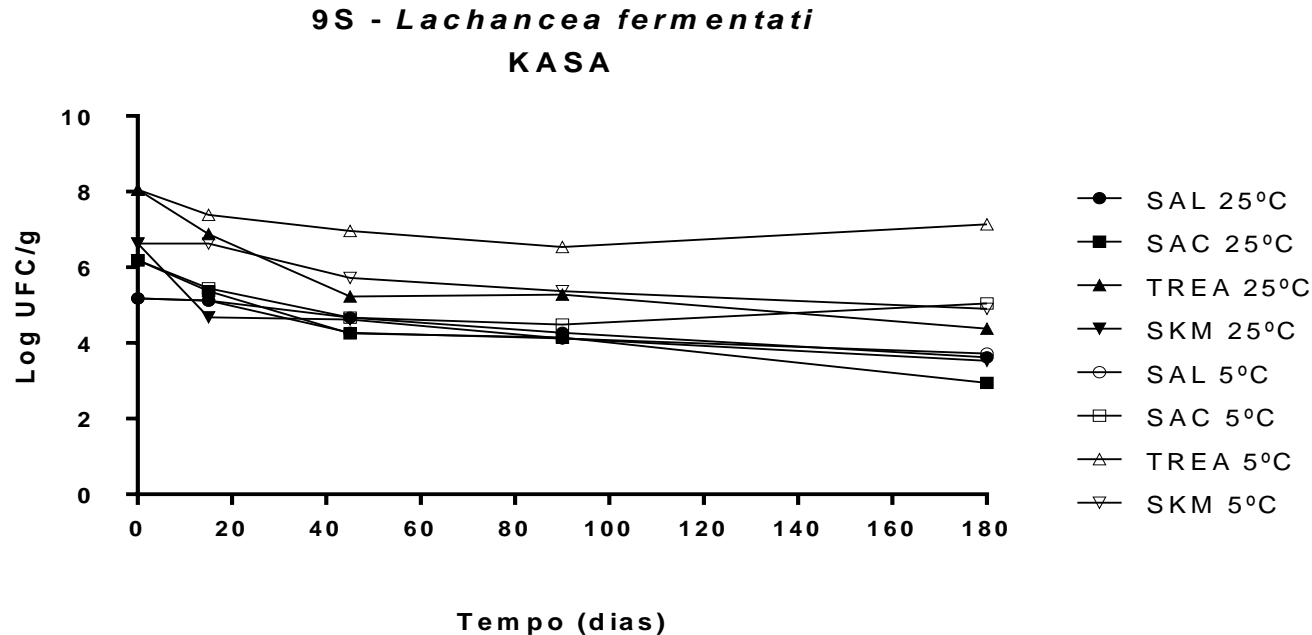


Figura 11 - Contagem de células viáveis (log UFC/g) logo após a liofilização (T₀) e nos tempos 15, 45, 90 e 180 dias de armazenamento a 5°C e 25°C de *Lachancea fermentati* (9S), isolado do grão de kefir de água de Salvador – BA. A linhagem foi liofilizada utilizando os seguintes crioprotetores: TREA (trealose 5% p/v); SKM (leite desnatado 10% p/v SAC (sacarose 15% p/v) e como controle SAL (salina 0,85% p/v). Os resultados apresentados são médias de dois experimentos.

Tabela 10 - Viabilidade (log UFC/mL) de *Lachancea fermentati* (9S) antes (T') e após liofilização (T₀). A linhagem foi liofilizada utilizando os seguintes crioprotetores: TREA (trealose 5% p/v); SKM (leite desnatado 10% p/v); SAC (sacarose 15% p/v) e como controle SAL (salina 0,85% p/v). Os resultados apresentados são médias de dois experimentos.

9S	SAL	SAC	TREA	SKM
T'	8,18	8,12	8,10	8,06
T ₀	3,56	5,24	6,78	5,60

Para análise da resistência ao processo de liofilização utilizou-se os dados obtidos em log UFC/mL para permitir comparação entre os resultados de contagens de células viáveis antes e depois da desidratação. Os dados seguem organizados nas tabelas 2 a 10, abaixo de cada uma das figuras apresentadas acima.

Análises dos resultados da viabilidade para *Lactococcus lactis* 4U (Tabela 2) mostram que a linhagem obteve maior resistência ao processo de liofilização quando utilizados os crioprotetores trealose, *skim-milk* e sacarose, com contagens médias ao final do processo de 1 a 2 ciclos log inferiores as contagens obtidas antes da liofilização. Na ausência de crioprotetor (salina; grupo controle) o micro-organismo apresentou contagem média de 6 log UFC/mL de células viáveis após liofilização, registrando queda de três ciclos log. Logo após liofilização (T0) a quantidade de micro-organismos sobreviventes variou entre 8,17 – 10,54 log UFC/g, dependendo do crioprotetor utilizado (Figura 3). No 15º dia de armazenamento a temperatura de 5 °C foi melhor (queda de 1 - 2 ciclos log) se comparado às amostras armazenadas a 25 °C (queda de 3 – 5 ciclos log). Este comportamento prevaleceu ao longo de todo tempo de experimentação. *Lc. Lactis* 4U, apesar de ter apresentado resistência ao processo de liofilização, não se manteve estável durante armazenamento, ainda que mantido a 5° C, apresentando ao final do período de 180 dias contagens de 4,76; 5,82; 5,67 e 4,86 log UFC/g apresentados no gráfico para salina, sacarose, trealose e skim milk, respectivamente. No estudo realizado por Berner; Viernstein (2006) investigaram o efeito de diferentes crioprotetores na manutenção da viabilidade de *Lactococcus lactis* e a máxima foi alcançada quando foram utilizados como crioprotetores a sacarose 15%, e as misturas de *skim milk*/sacarose 10% e 20%, caldo MRS + 5% *skim milk*/sacarose e caldo MRS + 5% *skim milk*/manitol.

Para as linhagens de *Leuconostoc mesenteroides* (11U, 11U2 e 12U2) (Figuras 4, 5 e 6), percebeu-se de modo generalizado que as melhores condições de liofilização e armazenamento ao final de 180 dias foram aquelas que utilizaram a trealose como agente de crioproteção e a estocagem a 5 °C (8,38 log UFC/g - 11U; 8,45 log UFC/g – 11U2; 8,25 log UFC/g – 12U2). Os micro-organismos foram resistentes ao processo de liofilização com redução de no máximo 1 ciclo log, independentemente ou não da adição de crioprotetor (Tabelas 3, 4 e 5). As contagens de células viáveis por grama após o processo variaram entre 9,75 – 10,61; 10,22 – 10,83 e 9,74 – 10,46 para 11U; 11U2 e 12U2, respectivamente, como observadas nos gráficos das Figuras 4, 5 e 6. Assim como *Lc. lactis*, a adição de crioprotetores preservou a viabilidade das células durante o armazenamento de todas as linhagens de *Ln. mesenteroides* (*Leuconostoc meseteroides*), sendo estas mais estáveis em relação a *Lc. lactis* (*Lactococcus lactis*). Os

crioprotetores que mais protegeram os micro-organismos foram trealose e *skim-milk*. A temperatura de 5 °C foi mais eficiente na preservação das células ao longo do tempo de experimentação. No entanto, para 11U2 e 12U2 pode-se notar que a temperatura de 25 °C permitiu manutenção da viabilidade das células liofilizadas em níveis superiores a 8 log UFC/g, para as amostras adicionadas de trealose e *skim milk*. Já foi relatado que a liofilização de *Leuconostoc* em leite suplementado com 4% de lactose foi capaz de manter a atividade metabólica característica do micro-organismo e permitiu boa sobrevivência a longos períodos de armazenamento (HEMME; FOUCAUDC-SCHEUNEMANN, 2004).

De modo geral, as linhagens de *Ln. mesenteroides* apresentaram comportamento semelhante entre si, com maior resistência à liofilização e ao armazenamento se comparado a *Lc. lactis*. Sendo *Lc. lactis* mais sensível à liofilização, a adição de agentes crioprotetores foi mais relevante para se obter maior manutenção da viabilidade após o processo. Coulibaly *et al.* (2009) estudando o perfil de resistência de *Leuconostoc mesenteroides* à liofilização determinou que o número de células viáveis após o processo com ou sem adição de crioprotetores não variou significativamente. Além disso, foi observada diminuição nas contagens de células viáveis a longo dos 90 dias de armazenamento para todas amostras, com maior queda registrada para as armazenadas a 20 °C, em relação àquelas a 4 °C. Além disso, a conservação não foi ideal durante o armazenamento, comportamento semelhante ao observado para as linhagens liofilizadas neste estudo.

As diferenças observadas nos comportamentos de *Lc. lactis* e *Ln. mesenteroides* frente à liofilização e armazenamento podem estar relacionadas às estruturas distintas destas células, assim como mencionado por Coulibaly *et al.* (2009) para explicar os resultados obtidos, em que a taxa de sobrevivência de *L. plantarum* foi ligeiramente superior à de *Ln. mesenteroides*. Estudos indicam que a oxidação lipídica dos ácidos graxos que constituem a membrana plasmática são os responsáveis pela morte celular durante o armazenamento prolongado (COULIBALY *et al.*, 2009).

A linhagem de levedura *Saccharomyces cerevisiae* 7M (Tabela 6), apresentou maior resistência ao processo de liofilização quando adicionados crioprotetores trealose e sacarose, com queda de 1 a 2 ciclos log após a desidratação. A baixa resistência da linhagem ao processo pode ser confirmada com base nos resultados obtidos para o grupo controle (sem adição; salina), no qual verificou-se queda de cerca de 4 ciclos log (Tabela 6). Dentre os crioprotetores, a trealose foi o mais eficiente, pois permitiu maior estabilidade durante o armazenamento da linhagem a 5 °C, com contagem final de células equivalente a 7,46 log UFC/g no 180º dia de

armazenamento, como pode ser observado no gráfico apresentado na Figura 7. Já para a linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* 6M (Figura 8) vale ressaltar a maior resistência sem a adição de crioprotetores, se comparada a 7M, com queda registrada de 2 ciclos log. Comportamento semelhante foi observado para as amostras com *skim milk*. No entanto, não foi verificada manutenção da viabilidade durante a estocagem das amostras controle. Foram perdidos cerca de 1 a quase 2 ciclos log durante o processo de liofilização das amostras com os crioprotetores sacarose e trealose (Tabela 7). Todas as amostras apresentaram contagens de células viáveis após o processo de liofilização acima de 6,3 log UFC/g. De forma semelhante à 7M, a manutenção e estabilidade das células viáveis durante estocagem também foi melhor na presença dos crioprotetores testados e quando armazenada a 5° C (6,71 ; 5,89 e 5,77 log UFC/g para sacarose; trealose e *skim milk*). Porém, notou-se maiores contagens para as amostras liofilizadas com sacarose (6,71).

Outra linhagem em estudo, *S. cerevisiae* 2M, também não apresentou resistência ao processo quando liofilizadas em salina e *skim milk* (queda de 3 ciclos log). A adição de crioprotetores auxiliou na resistência (queda de 2 ciclos log) (Tabela 8). No entanto, a linhagem 2M de *S. cerevisiae* foi mais sensível ao processo se comparada as demais linhagens (7M e 6M). As contagens após a liofilização atingiram o mínimo de 5,49 log UFC/g (*skim milk*) (Figura 9). Durante o tempo de armazenamento, as contagens caíram de 2 - 4 log em relação aos valores obtidos após liofilização. Apenas o uso da sacarose associado ao armazenamento a 5 ± 2 °C permitiram melhor manutenção de células viáveis até 180° dia (6,16 log UFC/g). *Saccharomyces unispora* 5M (Figura 10) apresentou contagens iniciais (tempo T0) acima de 6,6 log UFC/g para todas as condições de liofilização avaliadas neste estudo. A linhagem também foi sensível ao processo quando não adicionados crioprotetores e na presença de *skim milk* (queda de 3 ciclos log). A adição de sacarose e trealose melhoraram a resistência (queda de no máximo 1 ciclo log) (Tabela 9). Contudo, ao longo do armazenamento a 25 ± 2 °C notou-se instabilidade no número de células viáveis para todas as amostras ($< 4,0$ log UFC/g). A 5 °C as contagens apresentaram-se maiores ($> 5,5$ log UFC/g) quando na presença de crioprotetores, exceto para *skim milk* (3,57 UFC/g) no 180° dia. Assim como para 7M, a levedura *Lachancea fermentati* 9S (Figura 11) permaneceu viável e estável nas mesmas condições descritas (trealose; 5 ± 2 °C), com viabilidade de 7,14 log UFC/g no 180° dia de armazenamento. Esta levedura apresentou maior sensibilidade à liofilização e isto pode ser observado pelos resultados obtidos após o processo, no qual verificou-se queda de 5 ciclos log para o grupo controle.

Mesmo com adição de crioprotetor ocorreu diminuição das contagens de células viáveis, com perda de 2 - 3 ciclos logarítmicos (Tabela 10).

De modo geral, as leveduras foram mais sensíveis ao processo de liofilização, em relação às bactérias lácticas e a adição de crioprotetores foi fundamental para manutenção da viabilidade. Um estudo mostrou que a trealose pode melhorar os resultados obtidos imediatamente após a liofilização e durante o armazenamento (MIYAMOTO-SHINOHARA *et al.*, 2006). Leite desnatado e trealose foram utilizados como agentes crioprotetores durante a liofilização de diferentes espécies de leveduras (incluindo *Saccharomyces cerevisiae*) e foi verificado uma redução menor que 1 ciclo log durante seis meses de armazenameto das amostras a 4 °C. NYANGA *et al.* (2012). A combinação entre leite desnatado e dissacarídeos melhorou a viabilidade e estabilidade de microrganismos durante liofilização e armazenamento (ABADIAS *et al.*, 2001; LI; TIAN, 2007).

Com relação ao armazenamento, nota-se de maneira genérica a maior estabilidade das leveduras liofilizadas com adição de crioprotetores. Comportamento semelhante foi descrito por Miyamoto-Shinohara *et al.* (2006) para *S. cerevisiae*, que apesar de ter apresentado a menor taxa de sobrevivência à liofilização, exibiu menores perdas durante o armazenameto a 5 ± 2 °C.

As leveduras são células eucarióticas mais complexas que as bactérias lácticas, procariotas. Inúmeras estruturas podem sofrer danos devido à aplicação da desidratação, assim como compostos celulares e suas propriedades, principalmente aquelas relacionadas à membrana plasmática (RAPOPORT *et al.*, 2018; POLO *et al.*, 2017). Além disso, a própria configuração e organização destes micro-organismos, podem justificar sua maior sensibilidade frente à liofilização. Estes resultados corroboram os obtidos por Polo *et al.* (2017) que estudaram a liofilização de bactérias lácticas e leveduras de vinhos. Naquele trabalho foi avaliado se diferentes temperaturas de congelamento (-20, -80 e -196 °C) afetariam as taxas de sobrevivência após liofilização. As leveduras foram mais sensíveis ao processo e as melhores taxas de sobrevivência foram alcançadas quando utilizou-se as temperaturas de congelamento de -20 e -80 °C. As bactérias, por sua vez, sofreram menos durante a desidratação e a temperatura ótima para congelamento foi a de -196 °C (nitrogênio líquido). A preservação adequada permite melhorar os processos de produção inicial, nos quais estes liofilizados serão aplicados (POLO *et al.*, 2017; NYANGA *et al.*, 2012). ABADIAS *et al.* (2001) também certificaram que o congelamento a -20 °C permitiu maior preservação da levedura *Candida sake* liofilizada com adição de 10% *skim milk*. O congelamento em nitrogênio líquido, segundo estes autores, causaram danos letais às células, uma vez que o congelamento rápido dificulta a

migração da água interna para fora da célula, sendo esta congelada na parte interna, resultando em maiores danos e menor viabilidade. Miyamoto-Shinohara *et al.* (2006) também verificaram baixa sobrevivência de *Saccharomyces cerevisiae* usando nitrogênio líquido para congelamento.

Miyamoto-Shinohara *et al.* (2010), avaliando a taxa de sobrevivência de leveduras à liofilização, verificaram que a resistência ao processo é superior para as células menores, osmotolerantes e que possuem habilidade de utilizar diversos tipos de carboidratos. Além disso, a composição da parede celular e da membrana plasmática influenciam a taxa de microrganismos vivos após desidratação. Os autores registraram que quanto maior o número de glucanos na parede celular, maior a viabilidade ao final da liofilização. No entanto, durante o armazenamento o glucano pode reter umidade e diminuir a sobrevivência durante a estocagem. Os polissacarídeos extracelulares de bactérias liofilizadas também tem capacidade de aprisionar água residual e diminuir a sobrevivência durante estocagem (MIYAMOTO-SHINOHARA *et al.*, 2008). A temperatura de armazenamento após a liofilização parece influenciar também as leveduras. Alguns trabalhos certificaram que leveduras liofilizadas são mais estáveis quando armazenadas em temperaturas mais baixas (4 - 5 °C) (ABADIAS *et al.*, 2001; MIYAMOTO-SHINOHARA *et al.*, 2000, 2006, 2008, 2010; SPADARO *et al.*, 2010; POLO *et al.*, 2017).

Após a liofilização, os micro-organismos desidratados não se tornam inertes ou cessam completamente a respiração. Segundo Costa *et al.* (2002), a temperatura de armazenamento dos produtos liofilizados influencia diretamente o prazo de validade. Com aumento da temperatura, tem-se aumento da mortalidade e conseqüentemente o tempo de armazenamento se torna reduzido. Temperaturas mais baixas mantêm a atividade metabólica em níveis mais baixos e assim aumenta a estabilidade durante o armazenamento (COSTA *et al.*, 2002; SPADARO *et al.*, 2010). De modo generalizado, a temperatura de 5 ± 2 °C permitiu maior manutenção da viabilidade das linhagens deste estudo, durante o armazenamento por 180 dias.

Muitos fatores podem influenciar diretamente a viabilidade dos micro-organismos após o processo de liofilização e durante o armazenamento, como a atividade de água, o teor de umidade, temperatura de armazenamento, a exposição à luz e oxigênio, fase de crescimento, meios utilizados para crescimento, concentração celular antes da liofilização, reidratação após secagem (COSTA *et al.*, 2002; MORGAN *et al.*, 2006; COULIBALY *et al.*, 2009; SPADARO *et al.*, 2010). Neste sentido, as embalagens também são importantes para estabilidade dos liofilizados durante o armazenamento. Geralmente, os produtos liofilizados são armazenados em ampolas ou frascos de vidro (MORGAN, 2006). O uso de frascos de vidro vedados com

tampas de borracha butílica para contenção do material liofilizado, como utilizamos neste trabalho, pode apresentar desvantagens durante o armazenamento. Segundo Morgan *et al.* (2006), as rolhas não vedam adequadamente, permitindo vazamentos e liberação de compostos químicos, umidade, difusão de gás durante longos períodos de estocagem. Além disso, a temperatura e a umidade durante armazenamento podem afetar a elasticidade da borracha e influenciar na estabilidade do produto seco. Já foi determinado que durante o armazenamento pode haver aumento significativo do conteúdo de umidade e atividade de água (COULIBALY *et al.*, 2009) que interfere na sobrevivência dos micro-organismos. Uma sobrevivência maior após a liofilização parece estar relacionada a um alto nível de dessecação e vedação sob vácuo, por assegurar que a atividade de água e umidade relativa permaneçam extremamente baixas (MIYAMOTO-SHINOHARA *et al.*, 2006). Bozoglu *et al.* (1987) determinaram que a viabilidade de *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* liofilizados e armazenados em frascos de vidro selados sob vácuo e atmosfera de nitrogênio foi superior em relação as amostras armazenadas em ar. Uma alternativa ao uso dos frascos seria o armazenamento dos liofilizados em ampolas de vidro, como as utilizadas em coleções de culturas (SMITH, 2012) ou em embalagens para produtos secos como sacos plásticos de alta barreira, sacos metalizados ou *blisters* (STEFANELLO *et al.*, 2018; MORGAN *et al.*, 2006).

Geralmente, as suspensões de células microbianas submetidas à liofilização contêm mais de 10^7 - 10^8 células/mL (BOZOGLU *et al.*, 1987; MIYAMOTO-SHINOHARA *et al.*, 2000; COSTA *et al.*, 2000; MORGAN *et al.*, 2006). Poucas publicações definem uma concentração ótima de micro-organismos. No entanto, muitos estudos mostram que a liofilização de suspensões contendo altas concentrações de células é importante, uma vez que muitos microrganismos morrem durante o processo de liofilização e armazenamento a longo prazo. Quando o objetivo é conservar um determinado exemplar de cultura microbiana, é necessário que um número suficiente sobreviva e seja capaz de perpetuar a linhagem (MORGAN *et al.*, 2006). Segundo Bozoglu *et al.* (1987), uma sobrevivência de 0,1% da população original já seria suficiente para permitir a propagação da cultura. Berner; Viernsteins (2006) verificaram que a concentração inicial de 10^{10} UFC/mL combinada ao uso dos crioprotetores proporcionou as maiores recuperações de *Lc. lactis* ao final do processo de liofilização. Segundo estes autores a morte de micro-organismos é proporcional a área de contato com o meio externo. Anteriormente, Bozoglu *et al.* (1987) já haviam constatado que a fração de micro-organismos sobreviventes à liofilização aumenta, quanto maior for a concentração de biomassa durante a liofilização.

A fase de crescimento do micro-organismo também influencia a resistência à liofilização. Entretanto, a fase ótima depende do micro-organismo. De modo geral, durante a fase estacionária pode ocorrer indução de várias respostas ao estresse devido à escassez de nutrientes e fontes de carbono. Estas respostas, devido a condições adversas (inanição, pH ácido, frio, calor), permitem a sobrevivência de células (MORGAN *et al.*, 2006). Estudos que submetem micro-organismos a condições adversas de pH (ácido ou alcalino), a choques térmicos (frio ou calor) e escassez de nutrientes antes do processo de desidratação têm sido realizados para verificar a capacidade de aumento da resistência à liofilização (SALOTRA *et al.*, 1995; BROADBENT; LIN, 1999; SANDERS *et al.*, 1991; PALMFELDT; HAHN-HAGERDAL, 2000; ZIADI *et al.*, 2005; D'ANGELO *et al.*, 2017). Por exemplo, alguns trabalhos descritos na literatura já verificaram maior resistência ao processo de liofilização quando linhagens foram submetidas a choque térmico, choque frio (ZIADI *et al.*, 2005) e pH ácido (PALMFELDT; HAHN-HAGERDAL, 2000).

O uso de crioprotetores durante processos de congelamento e liofilização para aumentar a viabilidade dos micro-organismos durante o processo de secagem e armazenamento é um conhecimento bastante difundido na literatura científica. Diversos agentes crioprotetores podem ser utilizados com a finalidade de proteção de culturas microbianas. A trealose, sacarose e o *skim milk* são bastante estudados e foram os escolhidos por esta razão como agentes crioprotetores neste estudo (ABADIAS *et al.*, 2001; COSTA *et al.*, 2002; STREETER, 2003; ZAYED; ROOS, 2004; BERNER; VIERNSTEIN, 2006; ABATEMARCO, 2014; POLO *et al.*, 2017). Todavia, em alguns casos somente a adição de crioprotetor durante a liofilização não é suficiente para manutenção das células viáveis. Por este motivo, uma alternativa que vem sendo aplicada para melhorar a sobrevivência dos micro-organismos à desidratação é o enriquecimento dos meios de crescimento com crioprotetores. A liofilização gera estresse osmótico e diminuição da atividade de água. Uma alternativa para combater este estresse na célula é o acúmulo de solutos para manter o equilíbrio osmótico entre o ambiente extracelular altamente concentrado e o ambiente intracelular mais diluído. Estes solutos auxiliam na estabilização de proteínas e da membrana celular, pois substituem a água em torno dos resíduos polares e formam pontes de hidrogênio que estabilizam dentro destas estruturas macromoleculares na ausência de água (MORGAN *et al.*, 2006). Este é um dos mecanismos de proteção oferecidos pela adição de crioprotetores, como trealose e sacarose.

Alguns estudos realizados verificaram maior proteção quando se utilizou trealose como agente de crioproteção, se comparado à sacarose, em virtude da sua maior temperatura de

transição vítrea, na qual a estrutura se torna móvel suficiente para retornar à sua fase líquida. Sendo assim, a trealose oferece maior estabilidade. Além disso, há formação de cristal di-hidratado que melhora absorção de água durante a reidratação (LESLIE *et al.*, 1995; STREETER, 2003; MORGAN *et al.*, 2006). Resultados semelhantes foram encontrados neste estudo para a trealose.

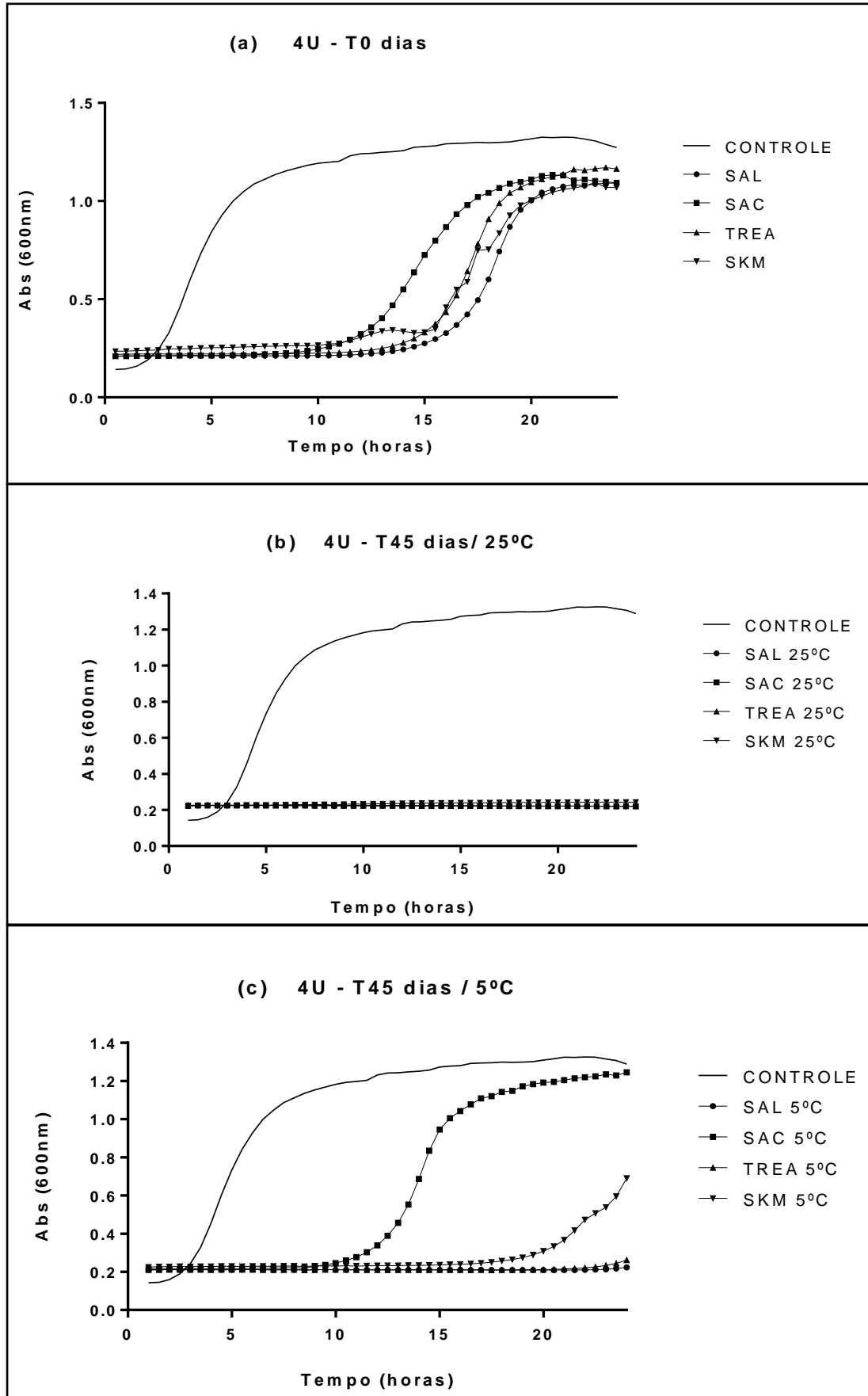
6.2. Padrão de crescimento *in vitro* após liofilização e armazenamento de linhagens isoladas de grãos de kefir

O padrão de crescimento foi acompanhado logo após a liofilização e nos tempos 15, 45 e 180 dias de armazenamento a 5 ± 2 °C e 25 ± 2 °C. Nas figuras 12 a 20 estão apresentadas as curvas de crescimento (DO_{600nm}) das linhagens isoladas de kefir, após as diferentes condições de liofilização e armazenamento.

Lactococcus lactis 4U (Figura 12a), logo após o processo de liofilização, apresentou extensão na fase lag para todas amostras em relação ao controle (micro-organismo não liofilizado) (de 2 para até 15 horas). As formulações com sacarose 15% (m/v) apresentaram menor tempo de fase lag quando comparado àquelas sem adição de crioprotetor, com trealose 5% (m/v) ou *skim milk* (10%). Pode-se observar que o rendimento da biomassa, ou seja, os valores de absorbância após 24 horas de incubação alcançaram valores iguais ao da amostra controle. Após o 45° dia de armazenamento (Figura 12b e c), notou-se que o uso de sacarose levou a um menor tempo de fase lag entre as amostras mantidas a 5 ± 2 °C, aproximadamente de 10 horas. No entanto, não houve aumento da biomassa para as culturas desidratadas armazenadas a 25 ± 2 °C. Após 180 dias, não foi observado crescimento da linhagem em nenhuma das condições de liofilização e armazenamento (Figura 12d e e).

A linhagem de *Ln. mesenteroides* 11U (Figura 13) mostrou rendimento de biomassa semelhante em todas as condições em estudo (grupos controle e experimentais), logo após a liofilização, apesar do aumento nos tempos de fase lag em todas amostras experimentais. Após o 45° dia de armazenamento pode ser observado que a temperatura a 5 ± 2 °C não afetou drasticamente as amostras liofilizadas com *skim milk* e trealose, uma vez que os tempos de fase lag permaneceram semelhantes ao grupo controle. Vale destacar o melhor desempenho das amostras de sacarose armazenadas a 5 ± 2 °C. que mesmo com aumento nos tempos de fase lag apresentou leitura de absorbância similar ao do grupo controle. Após 180 dias de armazenamento nas duas condições de temperatura testadas, notou-se baixo rendimento de biomassa (valores de D.O. menores que 0,5).

Para as demais linhagens de *Ln. mesenteroides* (11U2 e 12U2) foi possível observar alargamento da fase lag em relação ao grupo controle (cultura fresca) logo após liofilização e durante 180 dias de armazenamento para maioria das amostras (Figuras 14 e 15). O rendimento de biomassa após a liofilização foi inferior se comparado ao grupo controle para 11U2. Durante o armazenamento, as leituras de DO não ultrapassaram 0,8. No 180º dia de armazenamento a 5 ± 2 °C, trealose e *skim milk* foram as amostras com menor tempo de fase lag. A linhagem 12U2 apresentou extensão de fase lag durante o armazenamento e, no T45 dias, baixo rendimento de biomassa em relação às demais linhagens de *Ln. mesenteroides*.



Continua...

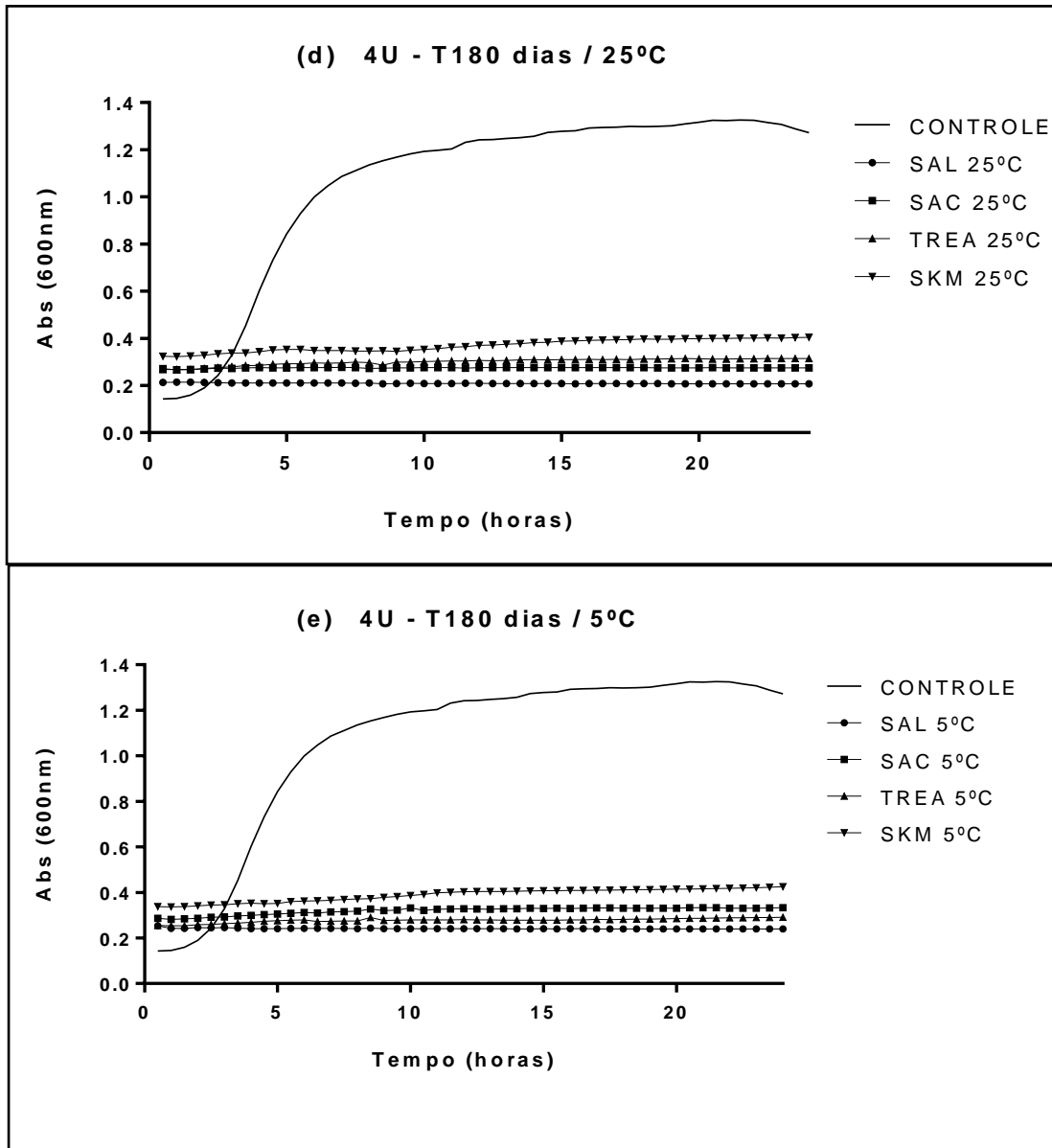
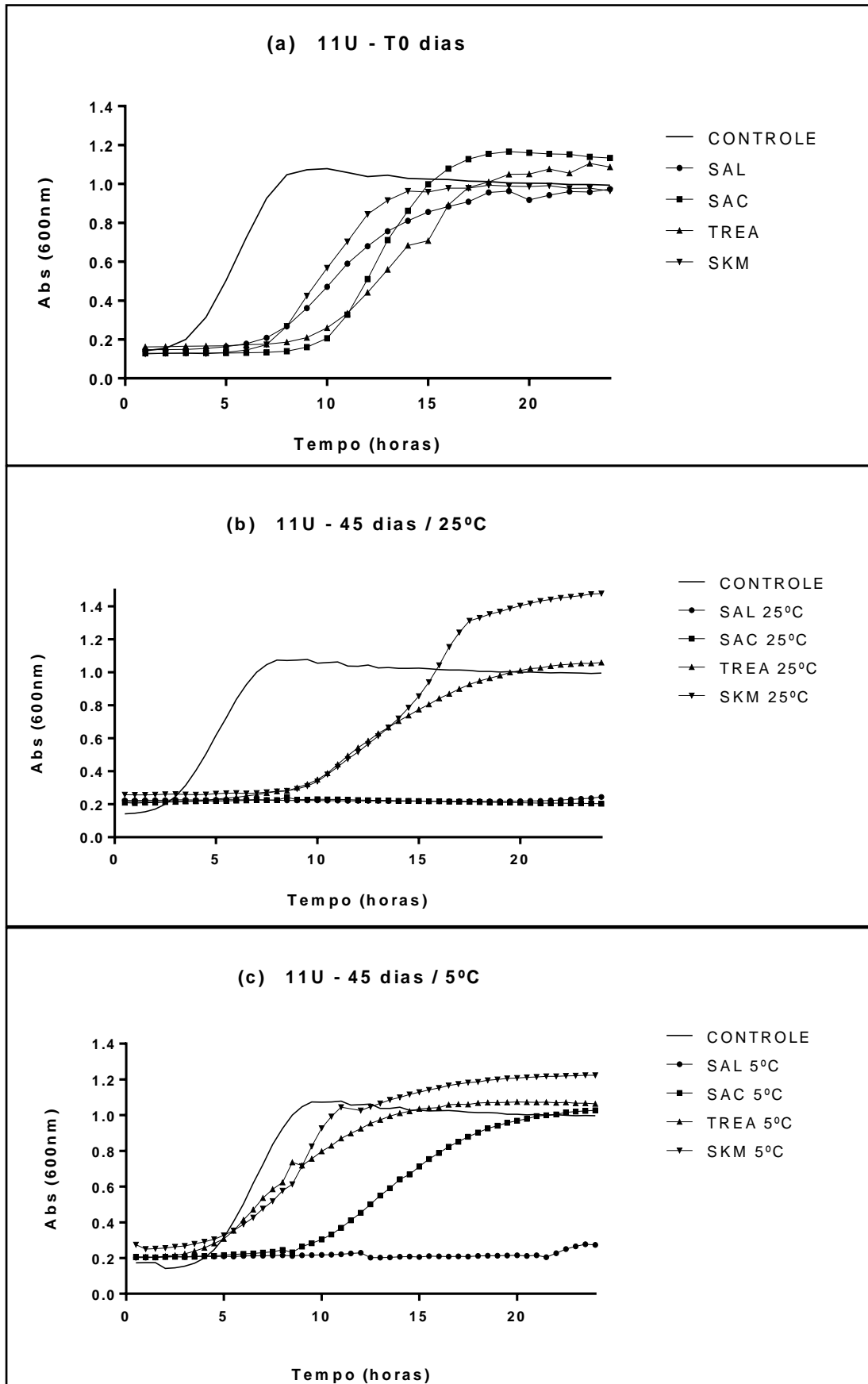


Figura 12 - Padrão de crescimento de *Lactococcus lactis* 4U em caldo MRS a 28 °C. A cinética de crescimento foi avaliada pela medida da absorbância a 600 nm a cada 30 minutos, durante 24 horas. O resultado é a média de três a seis leituras. As curvas representam o padrão de crescimento logo após a liofilização (a) e após o armazenamento de 45 dias a 25 ± 2 °C (b) e 5 ± 2 °C (c), e de 180 dias a 25 ± 2 °C (d) e 5 ± 2 °C (e). A linhagem foi liofilizada em solução salina 0,85% p/v (SAL) ou na presença dos seguintes crioprotetores: TREA (trealose 5% p/v); SKM (leite desnatado 10% p/v); SAC (sacarose 15% p/v). A curva de crescimento da linhagem antes da liofilização foi utilizada como controle. Os desvios-padrão das médias permaneceram entre $3,28 \times 10^{-6}$ e 0,16.



Continua...

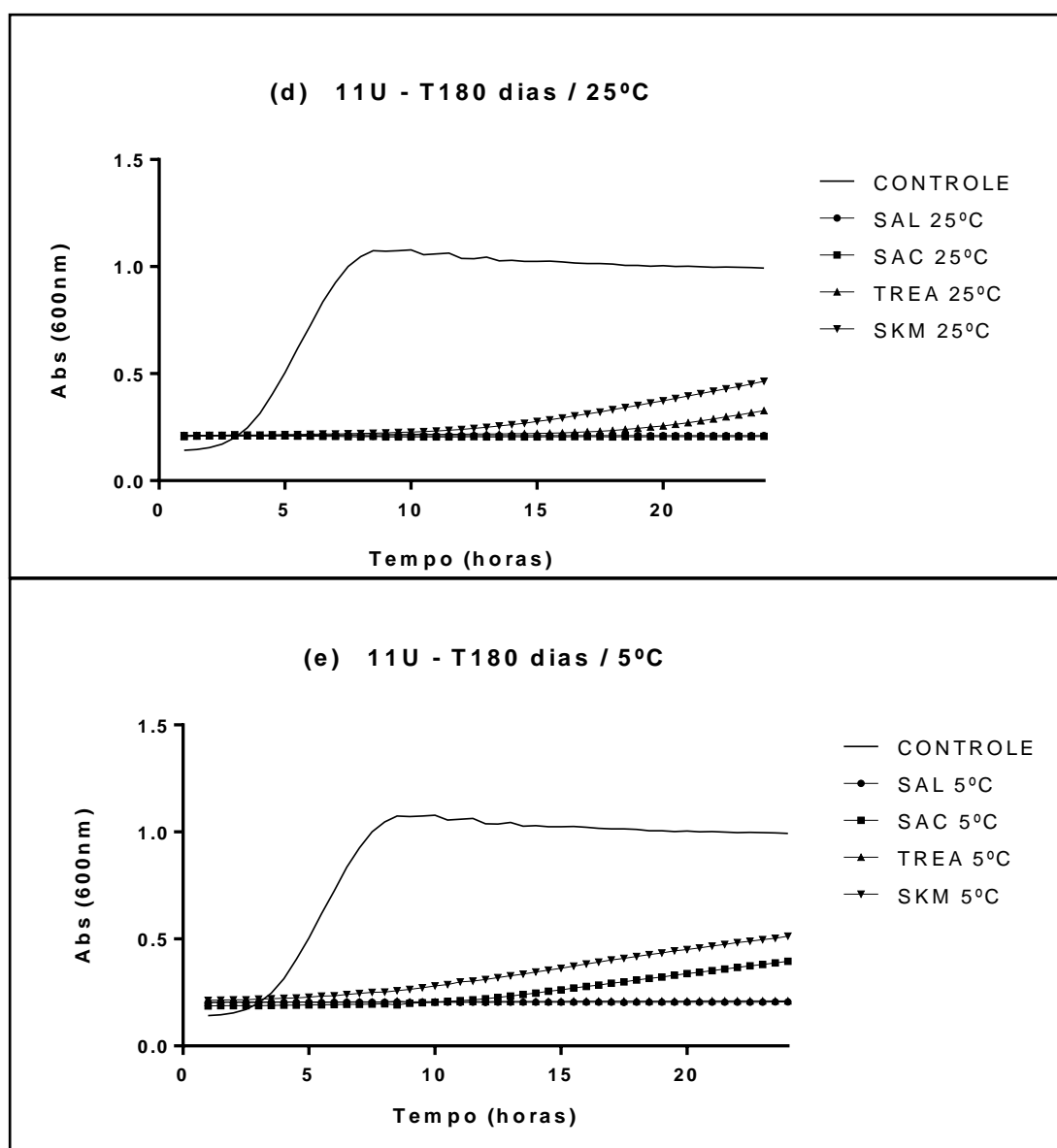
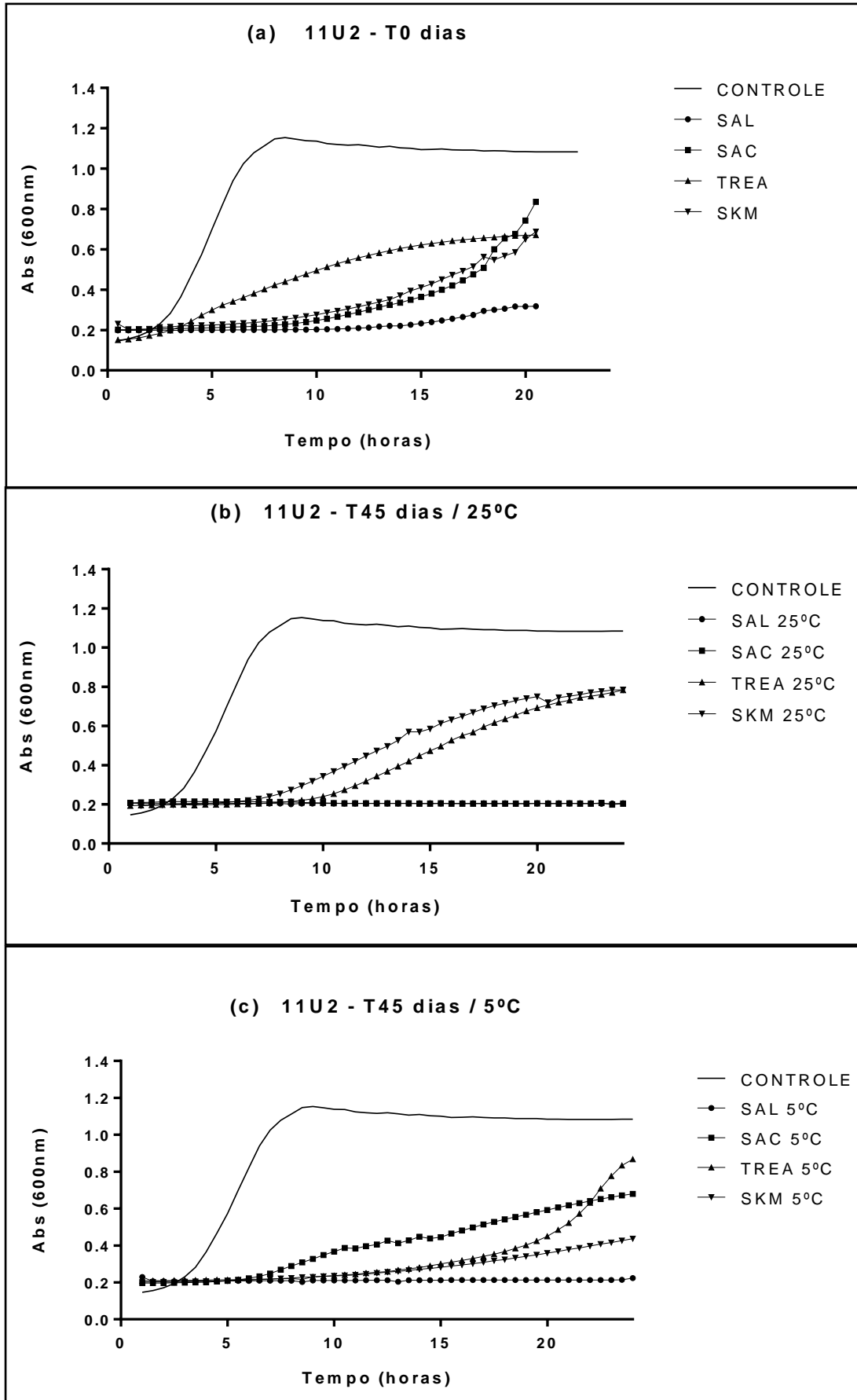


Figura 13 - Padrão de crescimento de *Leuconostoc mesenteroides* 11U em caldo MRS a 28 °C. A cinética de crescimento foi avaliada pela medida da absorbância a 600 nm a cada 30 minutos, durante 24 horas. O resultado é a média de três a seis leituras. As curvas representam o padrão de crescimento logo após a liofilização (a) e após o armazenamento de 45 dias a 25 ± 2 °C (b) e 5 ± 2 °C (c), e de 180 dias a 25 ± 2 °C (d) e 5 ± 2 °C (e). A linhagem foi liofilizada em solução salina 0,85% p/v (SAL) ou na presença dos seguintes crioprotetores: TREA (trealose 5% p/v); SKM (leite desnatado 10% p/v); SAC (sacarose 15% p/v). A curva de crescimento da linhagem antes da liofilização foi utilizada como controle. Os desvios-padrão das médias permaneceram entre $1,31 \times 10^{-6}$ e 0,14.



Continua ...

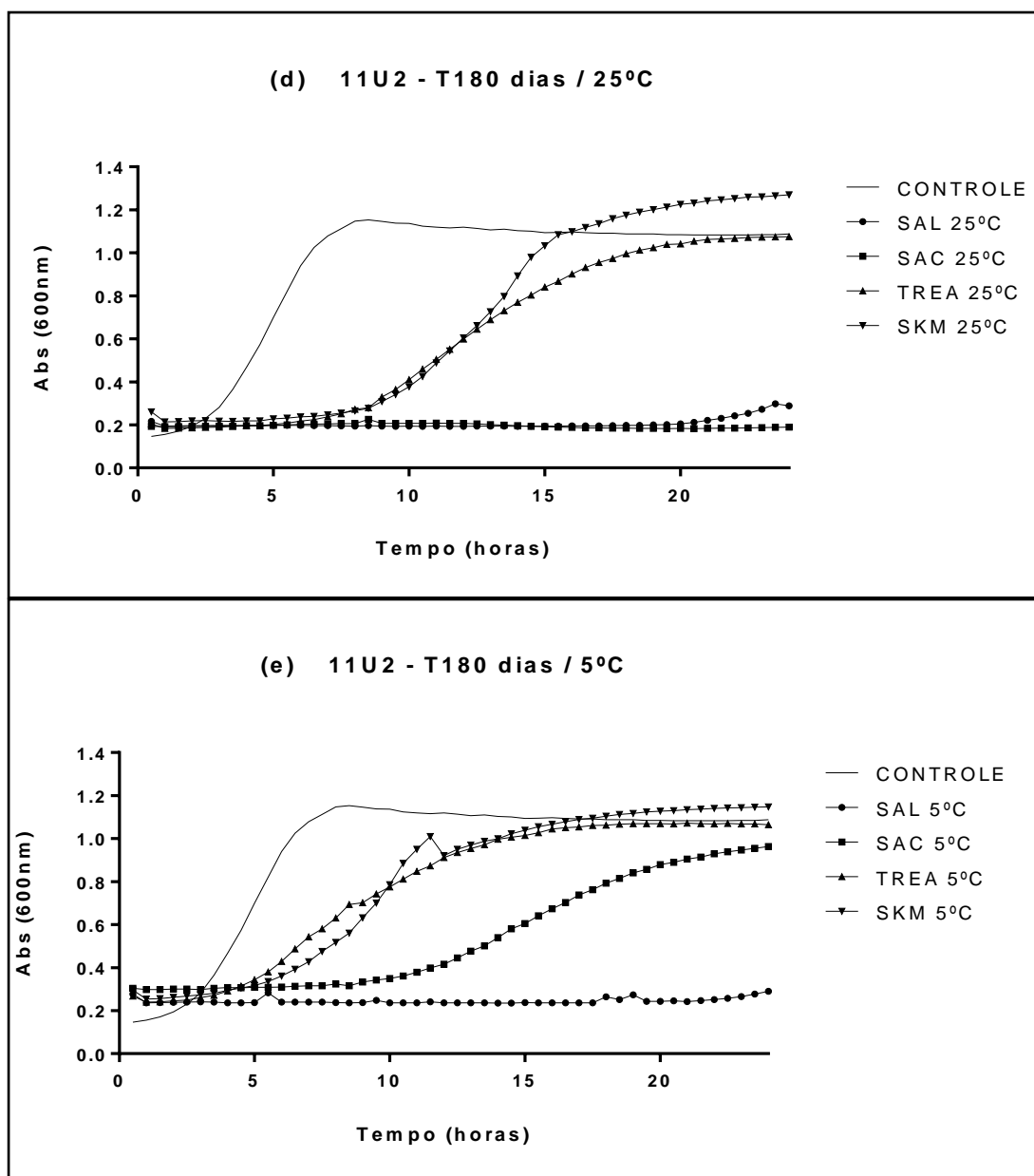
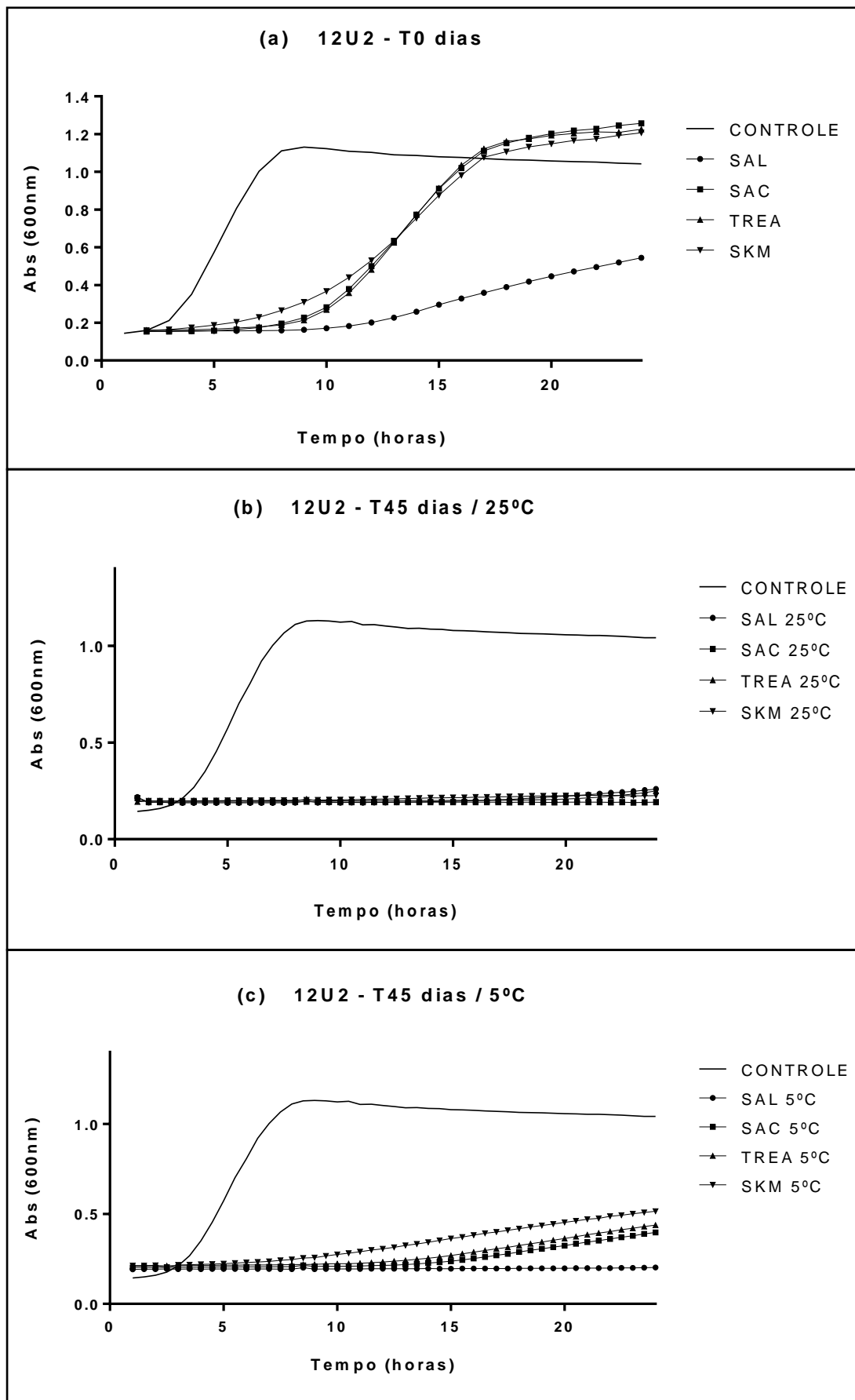


Figura 14 - Padrão de crescimento de *Leuconostoc mesenteroides* 11U2 em caldo MRS a 28 °C. A cinética de crescimento foi avaliada pela medida da absorbância a 600 nm a cada 30 minutos, durante 24 horas. O resultado é a média de três a seis leituras. As curvas representam o padrão de crescimento logo após a liofilização (a) e após o armazenamento de 45 dias a 25 ± 2 °C (b) e 5 ± 2 °C (c), e de 180 dias a 25 ± 2 °C (d) e 5 ± 2 °C (e). A linhagem foi liofilizada em solução salina 0,85% p/v (SAL) ou na presença dos seguintes crioprotetores: TREA (trealose 5% p/v); SKM (leite desnatado 10% p/v); SAC (sacarose 15% p/v). A curva de crescimento da linhagem antes da liofilização foi utilizada como controle. Os desvios-padrão das médias permaneceram entre $7,55 \times 10^{-6}$ e 0,15.



Continua ...

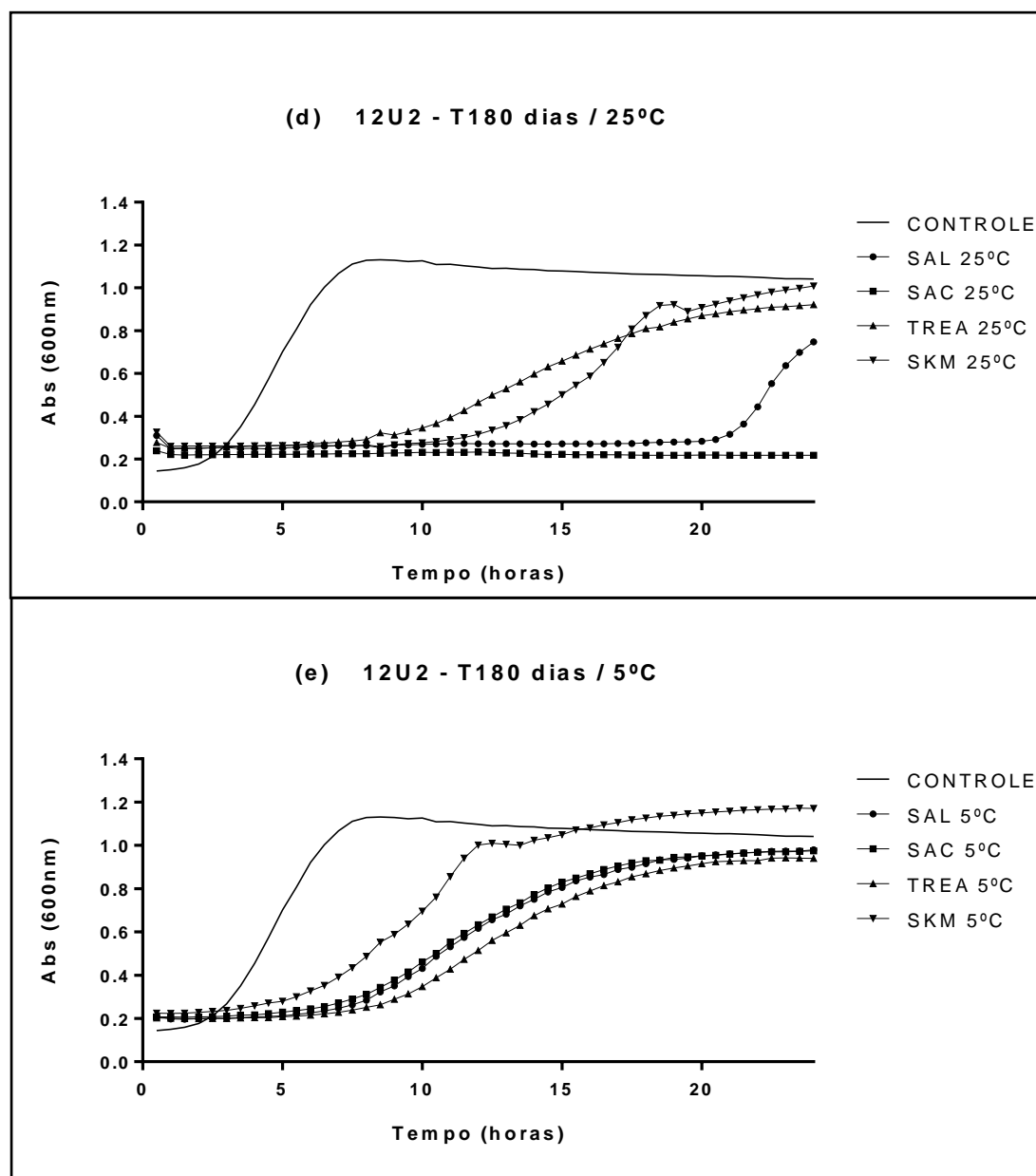
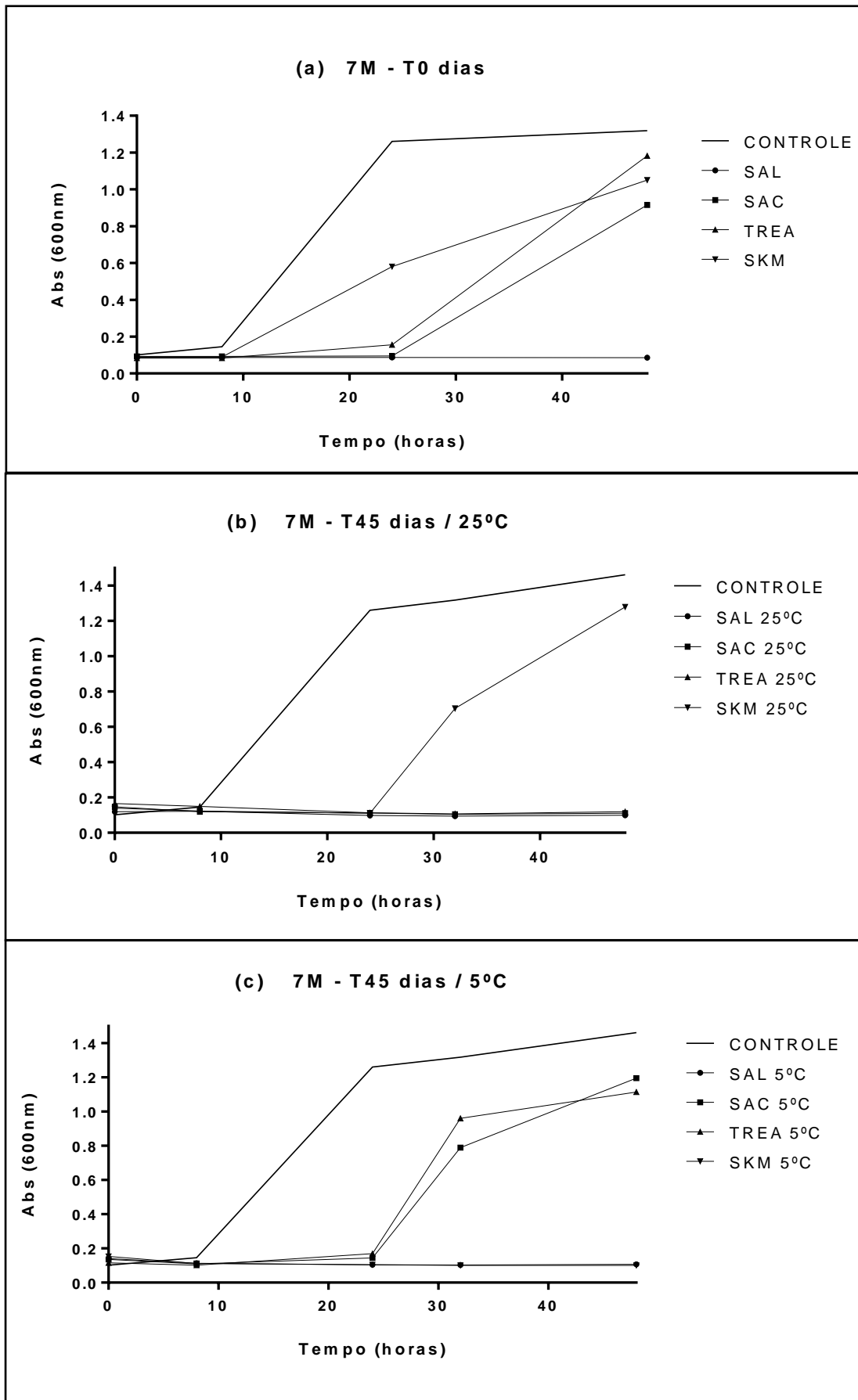


Figura 15 - Padrão de crescimento de *Leuconostoc mesenteroides* 12U2 em caldo MRS a 28 °C. A cinética de crescimento foi avaliada pela medida da absorbância a 600 nm a cada 30 minutos, durante 24 horas. O resultado é a média de três a seis leituras. As curvas representam o padrão de crescimento logo após a liofilização (a) e após o armazenamento de 45 dias a 25 ± 2 °C (b) e 5 ± 2 °C (c), e de 180 dias a 25 ± 2 °C (d) e 5 ± 2 °C (e). A linhagem foi liofilizada em solução salina 0,85% p/v (SAL) ou na presença dos seguintes crioprotetores: TREA (trealose 5% p/v); SKM (leite desnatado 10% p/v); SAC (sacarose 15% p/v). A curva de crescimento da linhagem antes da liofilização foi utilizada como controle. Os desvios-padrão das médias permaneceram entre $7,54 \times 10^{-6}$ e 0,17.

A linhagem de *S. cerevisiae* 7M (Figura 16) manteve o tempo de fase lag semelhante ao grupo controle para as amostras adicionadas de *skim milk* como agente crioprotetor, logo após a liofilização. No entanto, ao longo do período de armazenamento, houve aumento da fase lag para maior parte das amostras, para valores acima de 24 horas. *Saccharomyces cerevisiae* 6M apresentou aumento do tempo de fase lag para todas as amostras logo após a liofilização, com início da fase exponencial em 24 horas, para maior parte das amostras, como pode ser observado na Figura 17. *Saccharomyces cerevisiae* 2M (Figura 18) também apresentou extensão da fase lag logo após a liofilização para todas as amostras adicionadas ou não de crioprotetor. Após armazenamento por 180 dias, houve baixo rendimento de biomassa, exceto para as amostras adicionadas de sacarose e mantidas a 5 ± 2 °C, e aquelas adicionadas de trealose e mantidas a 25 ± 2 °C.

Para a linhagem *S. unisporus* 5M (Figura 19) pode-se observar, logo após a liofilização, em relação ao grupo controle, aumento de fase lag para todas as amostras liofilizadas com ou sem crioprotetor e menor rendimento de biomassa ao final de 48 horas de crescimento. Nos demais tempos de armazenamento, a duração da fase lag permaneceu a mesma (24 horas), para maioria das amostras, porém houve aumento da biomassa em algumas condições, dependendo do crioprotetor e da temperatura de armazenamento utilizada. E por fim, a linhagem *Lanchacea fermentati* 9S (Figura 20) logo após o processo apresentou aumento de fase lag (32 horas) em relação ao grupo controle não liofilizado (8 horas). Ao longo do armazenamento este comportamento prevaleceu, porém também houve aumento da biomassa em algumas condições, dependendo do crioprotetor e da temperatura de armazenamento utilizada.



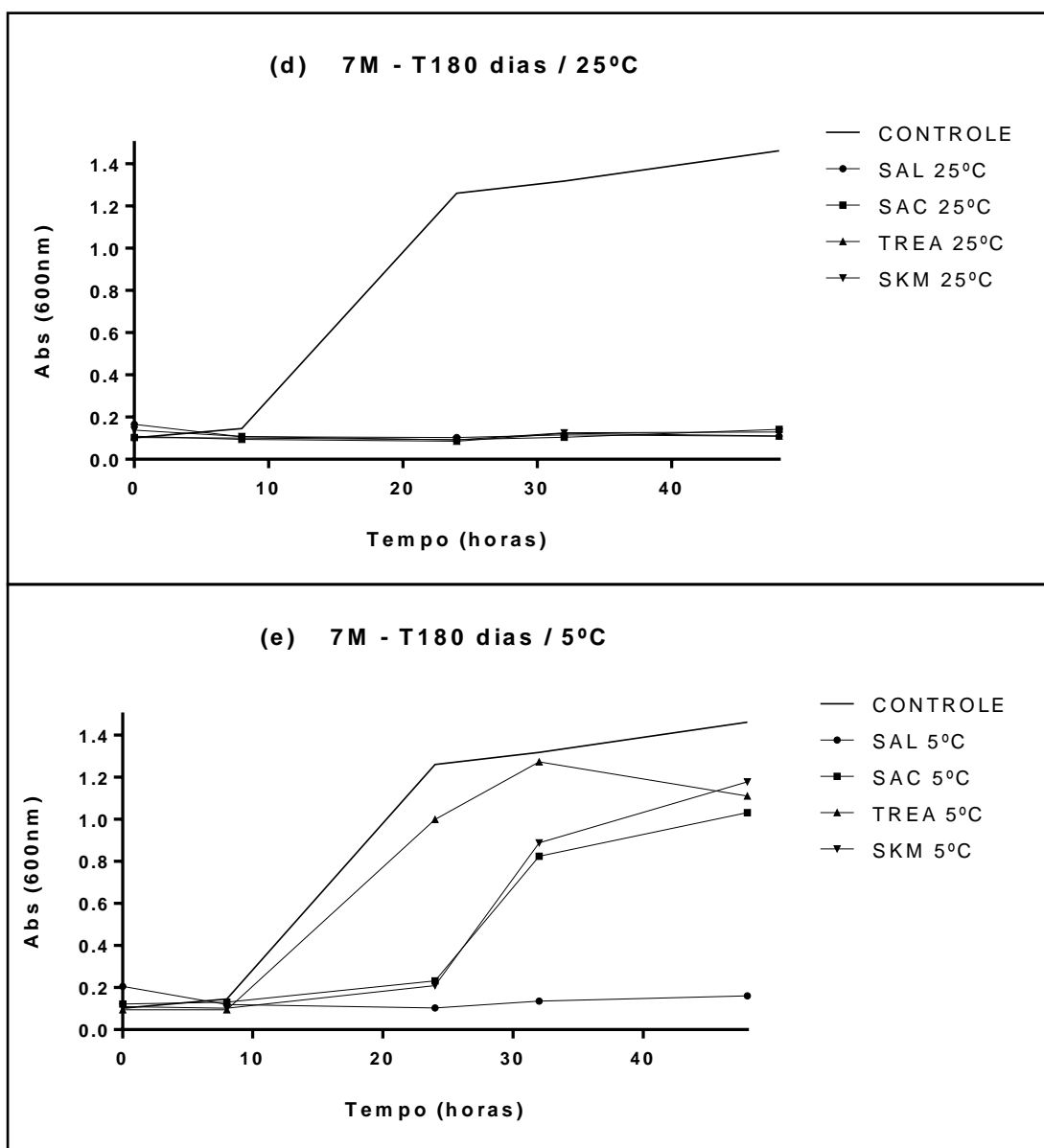
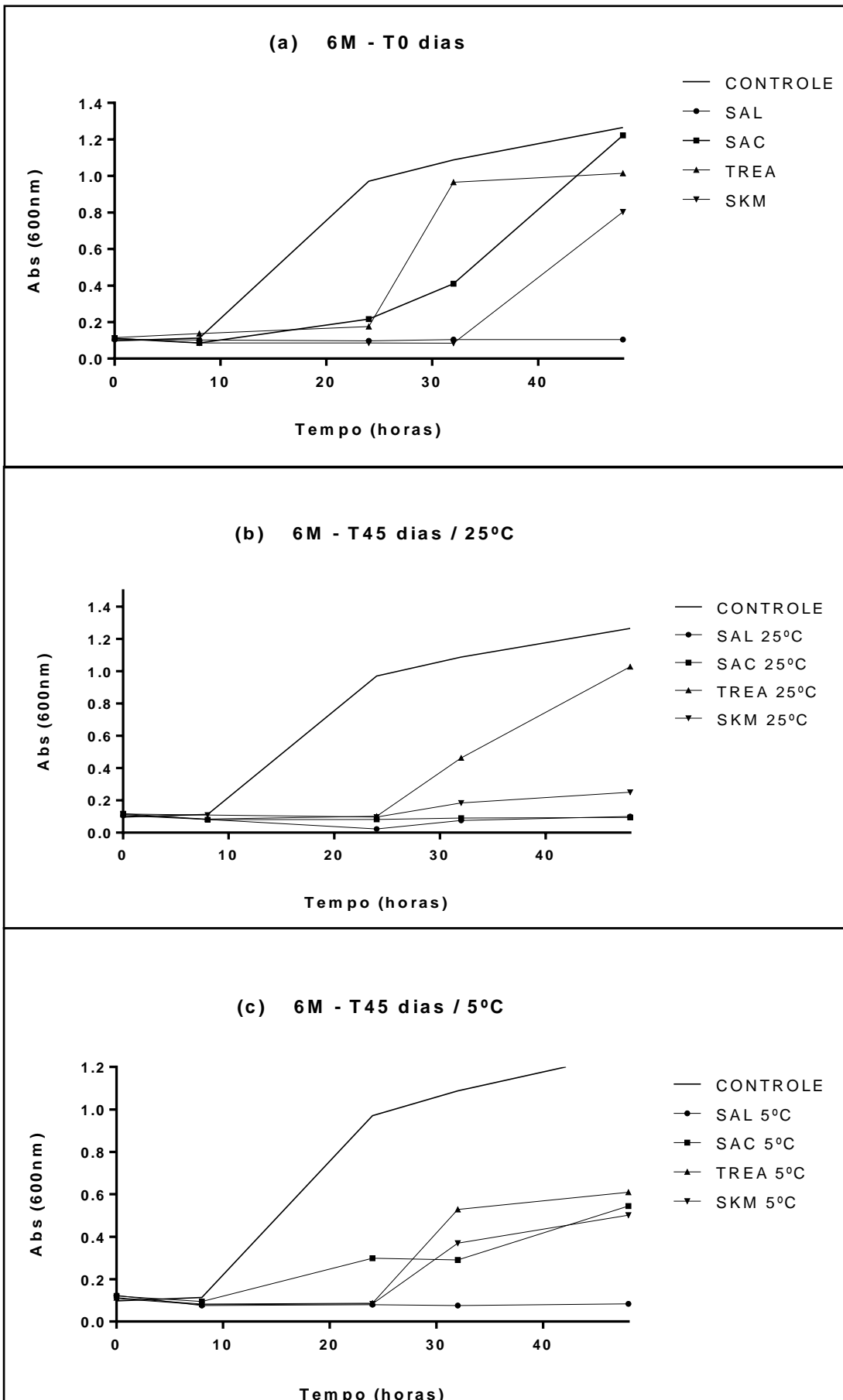


Figura 16 - Padrão de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* 7M em caldo YPG a 37 °C. A cinética de crescimento foi avaliada pela medida da absorbância a 600 nm a cada 30 minutos, durante 24 horas. O resultado é a média de três a seis leituras. As curvas representam o padrão de crescimento logo após a liofilização (a) e após o armazenamento de 45 dias a 25 ± 2 °C (b) e 5 ± 2 °C (c), e de 180 dias a 25 ± 2 °C (d) e 5 ± 2 °C (e). Os desvios-padrão das médias permaneceram entre $5,94 \times 10^{-4}$ e 0,12.



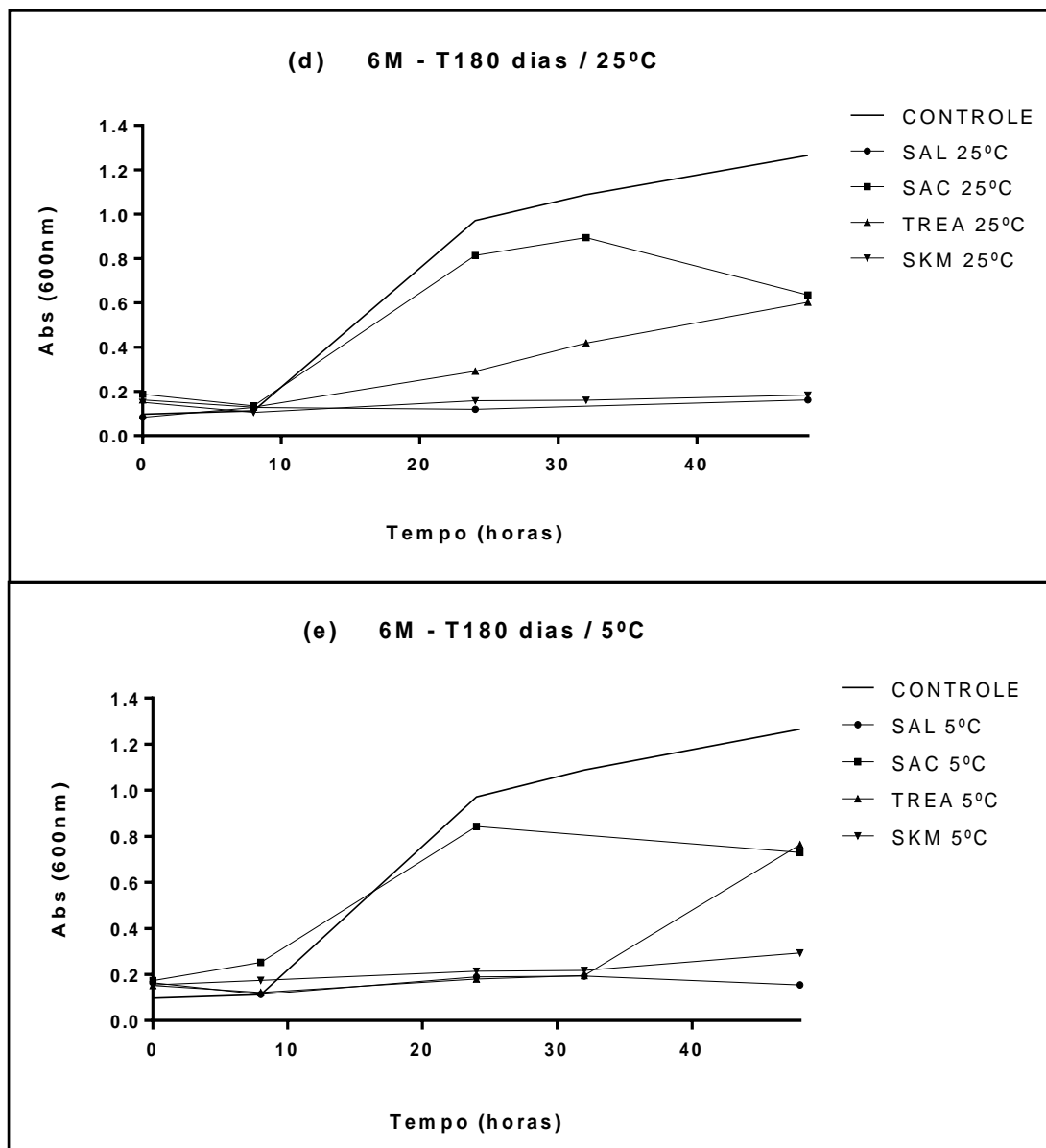
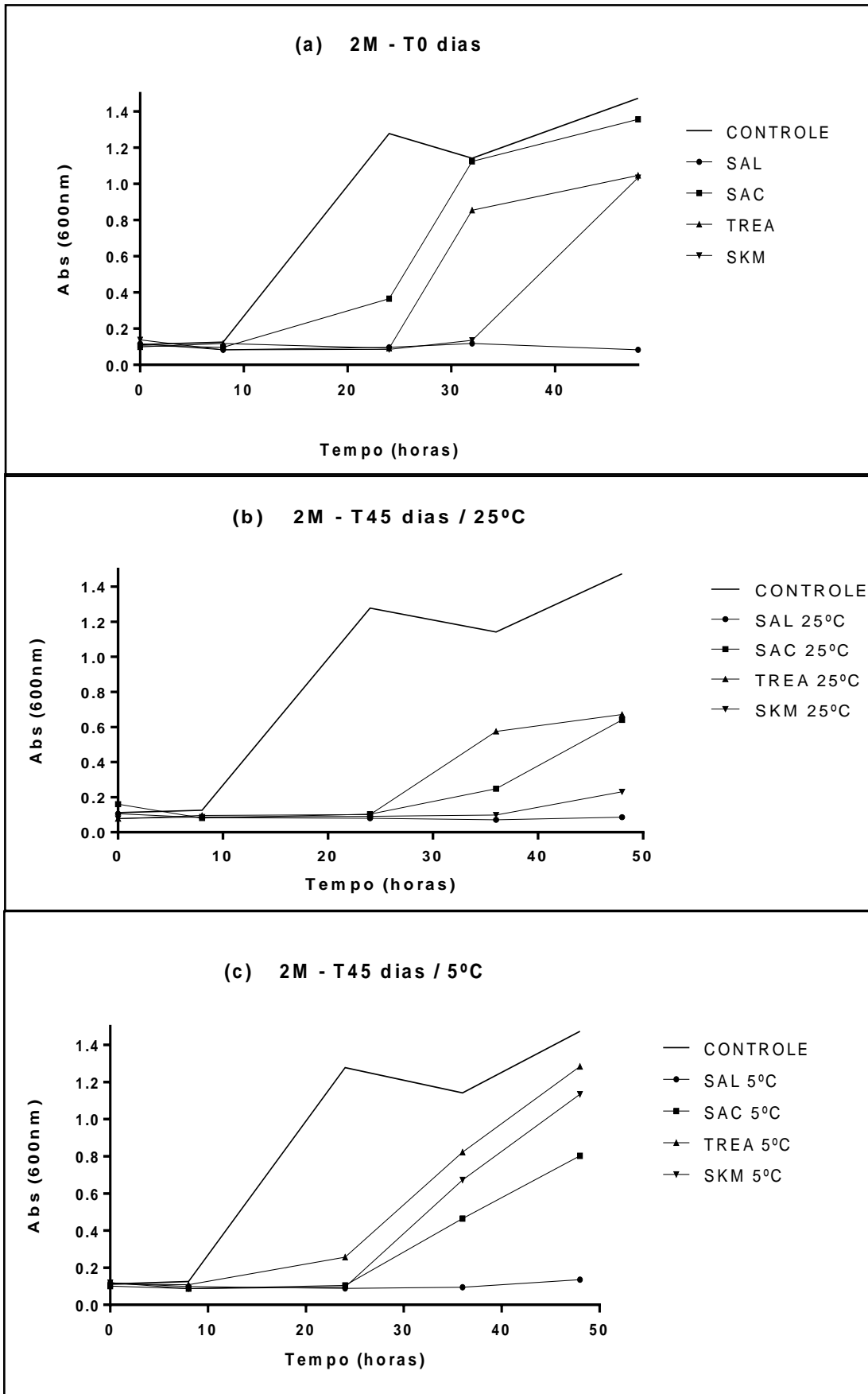


Figura 17 - Padrão de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* 6M em caldo YPG a 37 °C. A cinética de crescimento foi avaliada pela medida da absorbância a 600 nm a cada 30 minutos, durante 24 horas. O resultado é a média de três a seis leituras. As curvas representam o padrão de crescimento logo após a liofilização (a) e após o armazenamento de 45 dias a 25 ± 2 °C (b) e 5 ± 2 °C (c), e de 180 dias a 25 ± 2 °C (d) e 5 ± 2 °C (e). Os desvios-padrão das médias permaneceram entre $1,41 \times 10^{-4}$ e 0,13.



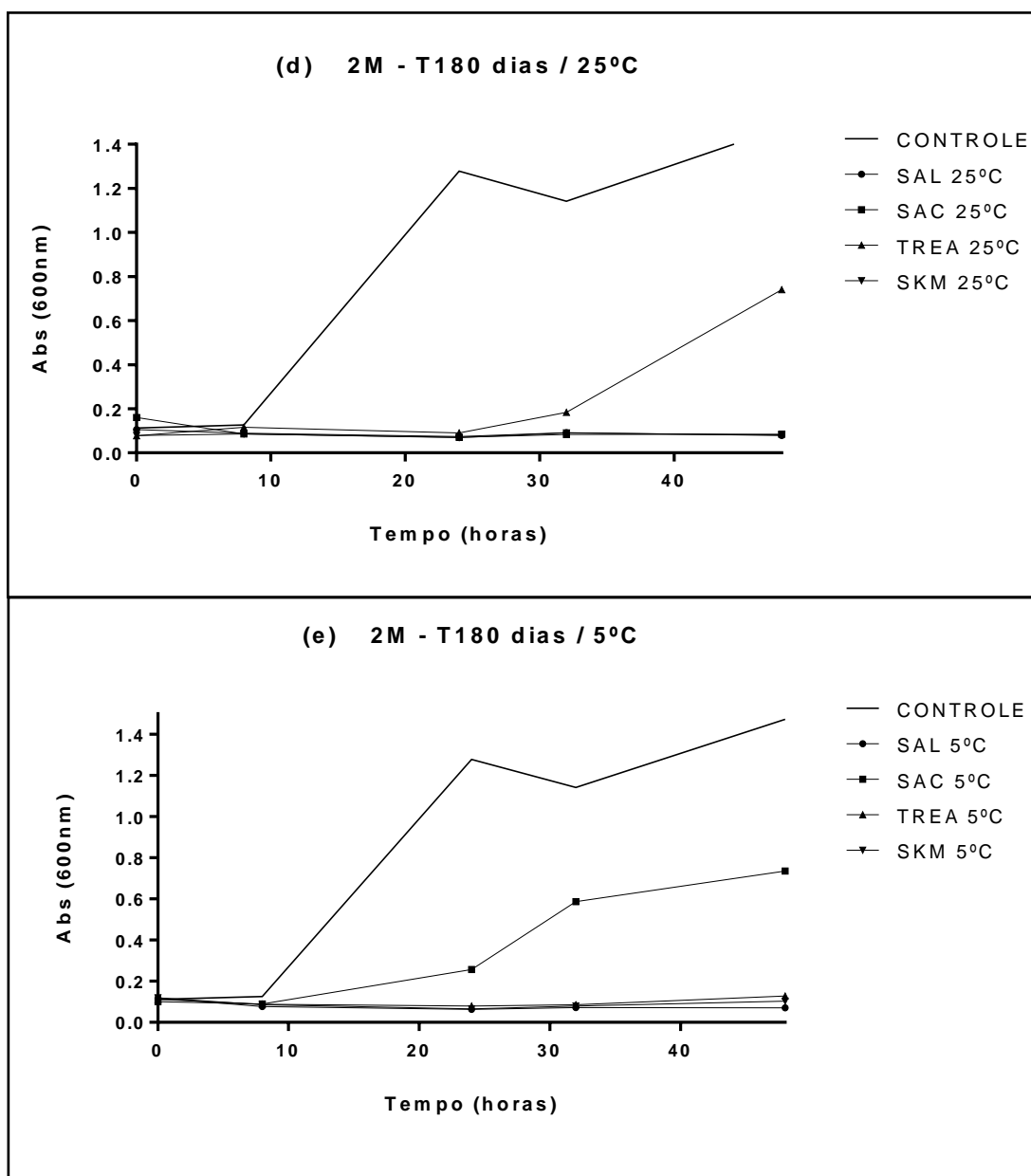
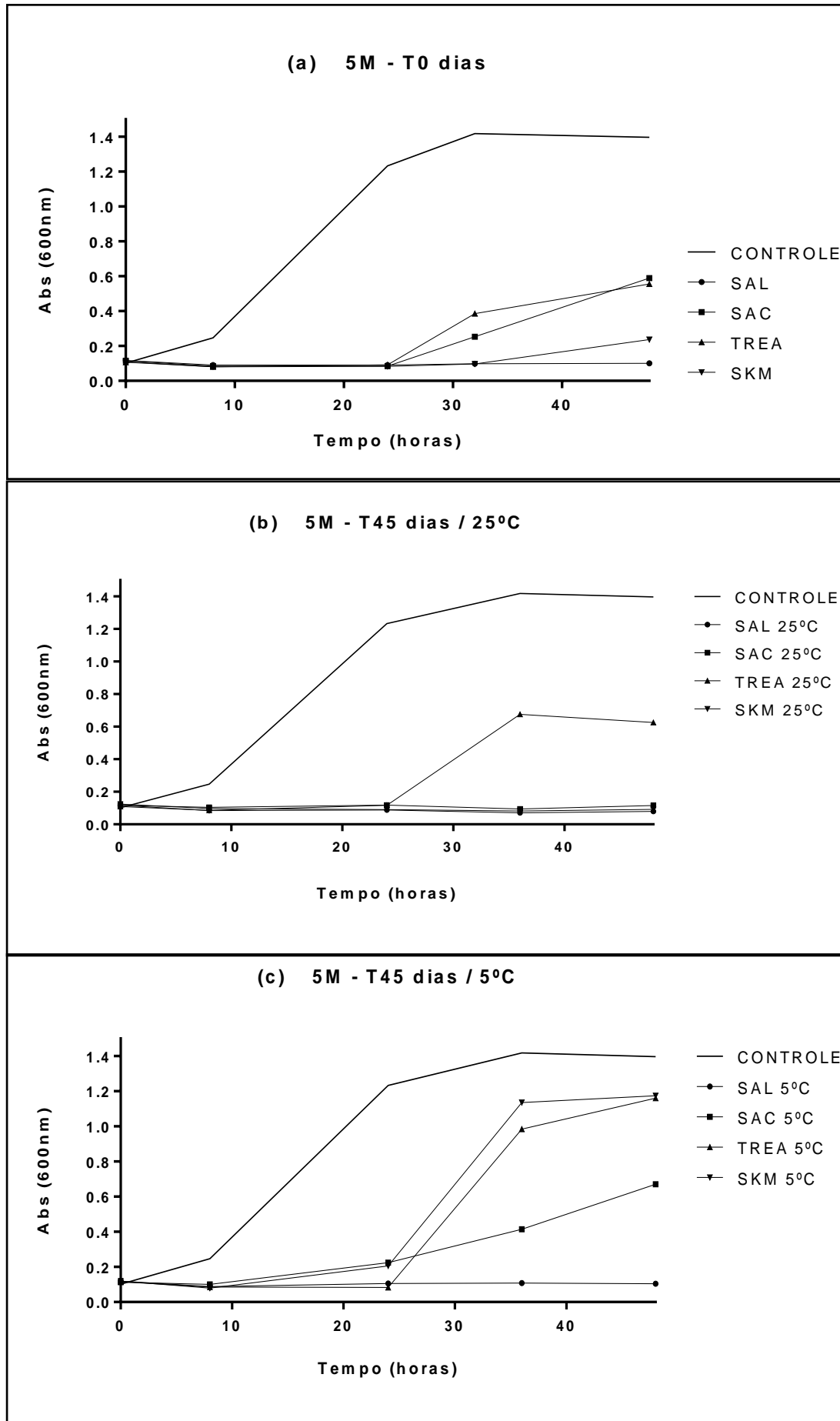


Figura 18 - Padrão de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* 2M em caldo YPG a 37 °C. A cinética de crescimento foi avaliada pela medida da absorbância a 600 nm a cada 30 minutos, durante 24 horas. O resultado é a média de três a seis leituras. As curvas representam o padrão de crescimento logo após a liofilização (a) e após o armazenamento de 45 dias a 25 ± 2 °C (b) e 5 ± 2 °C (c), e de 180 dias a 25 ± 2 °C (d) e 5 ± 2 °C (e). Os desvios-padrão das médias permaneceram entre $2,09 \times 10^{-4}$ e 0,12.



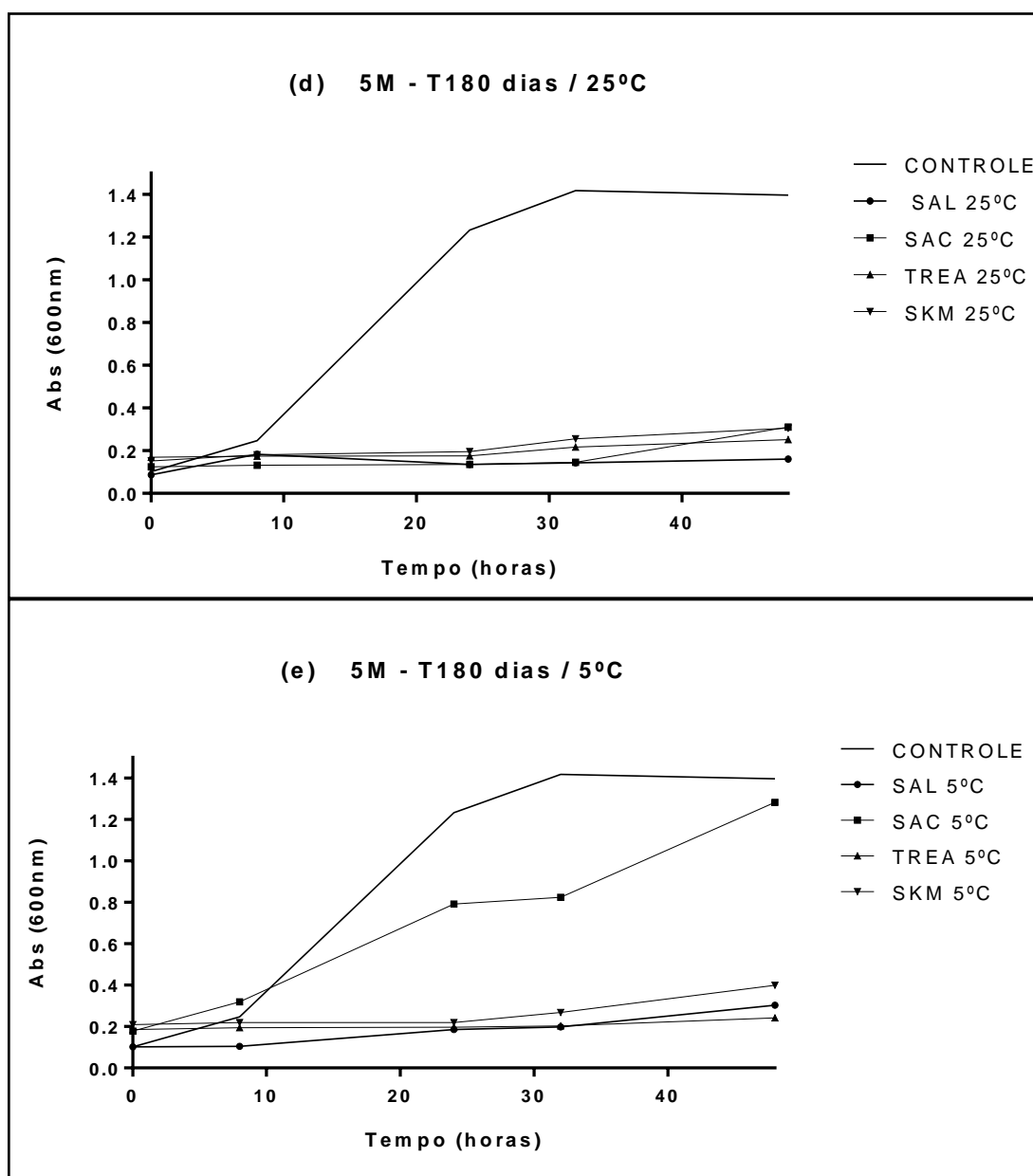
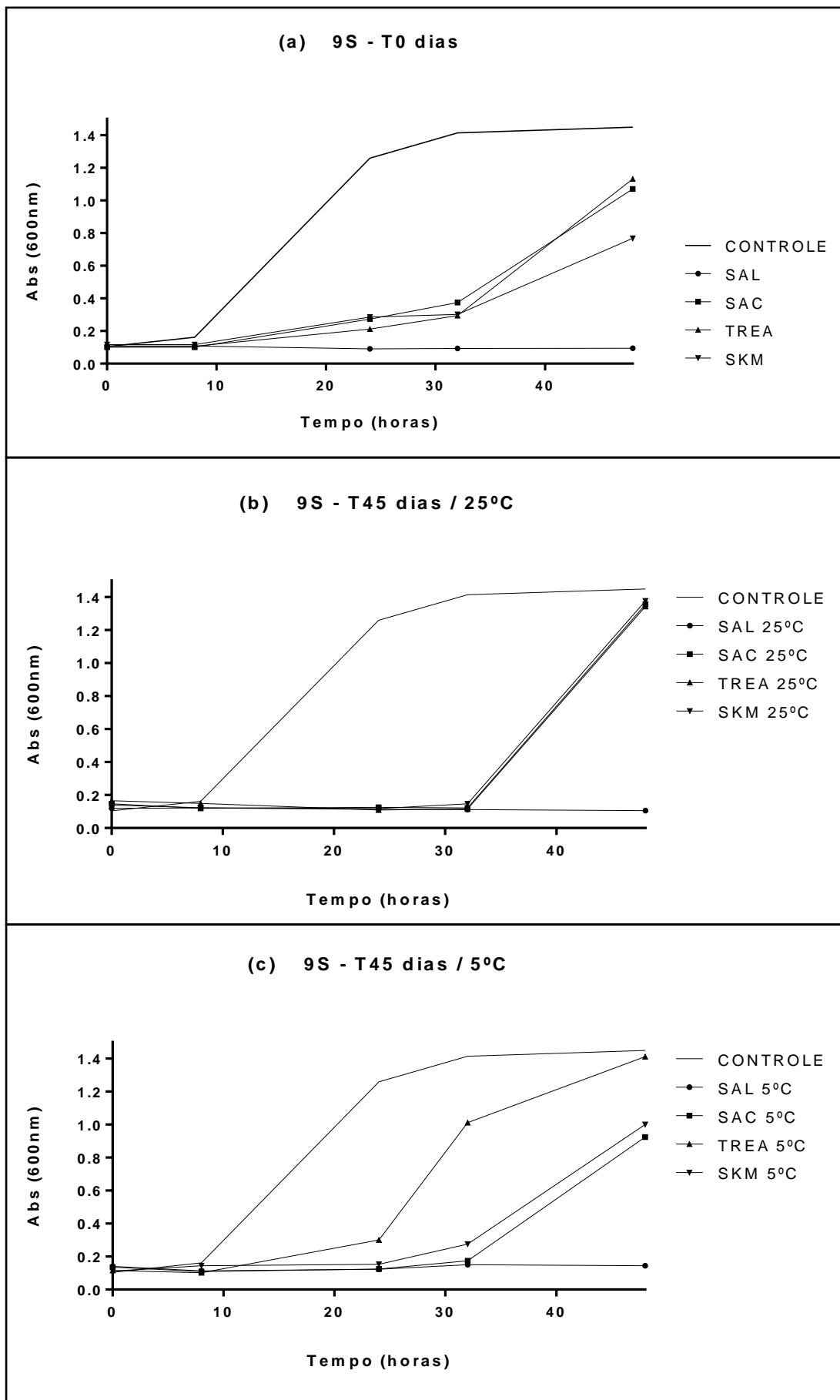


Figura 19 - Padrão de crescimento de *Saccharomyces unisporus* 5M em caldo YPG a 30 °C. A cinética de crescimento foi avaliada pela medida da absorbância a 600 nm a cada 30 minutos, durante 24 horas. O resultado é a média de três a seis leituras. As curvas representam o padrão de crescimento logo após a liofilização (a) e após o armazenamento de 45 dias a 25 ± 2 °C (b) e 5 ± 2 °C (c), e de 180 dias a 25 ± 2 °C (d) e 5 ± 2 °C (e). Os desvios-padrão das médias permaneceram entre $6,43 \times 10^{-4}$ e 0,16.



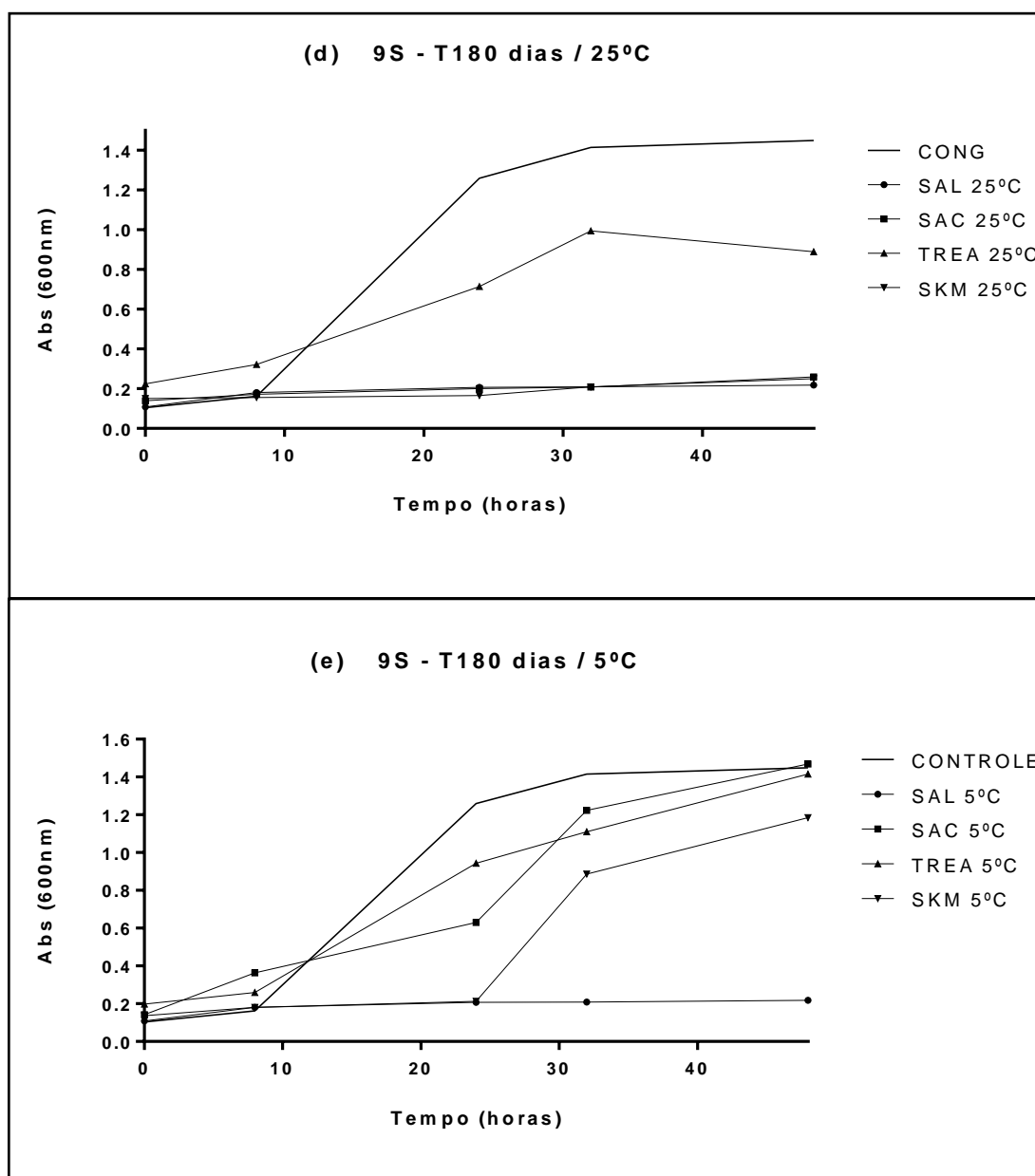


Figura 20 - Padrão de crescimento de *Lachancea fermentati* 9S em caldo YPG a 37 °C. A cinética de crescimento foi avaliada pela medida da absorbância a 600 nm a cada 30 minutos, durante 24 horas. O resultado é a média de três a seis leituras. As curvas representam o padrão de crescimento logo após a liofilização (a) e após o armazenamento de 45 dias a 25 ± 2 °C (b) e 5 ± 2 °C (c), e de 180 dias a 25 ± 2 °C (d) e 5 ± 2 °C (e). Os desvios-padrão das médias permaneceram entre $1,34 \times 10^{-4}$ e 0,19.

De modo generalizado, as leveduras apresentaram extensão da fase lag de crescimento logo após o processo e durante o armazenamento das amostras liofilizadas, sendo necessário na maioria dos casos, mais de 24 horas para iniciar a fase exponencial. A atuação do crioprotetor no padrão de crescimento também foi linhagem específica e

variou ao longo do período de armazenamento. As leveduras apresentaram menor resistência ao processo de liofilização, quando comparado às bactérias lácticas. Desta maneira, pode-se inferir que o processo de liofilização afetou drasticamente o metabolismo da maioria das amostras de leveduras liofilizadas, reflexo disso são os elevados tempos de fase lag.

É interessante observar que no 180º dia de armazenamento (maioria a 5 ± 2 °C) as leveduras apresentaram encurtamento da fase lag na presença de alguns crioprotetores: 7M com trealose; 6M com trealose; 2M com sacarose; 5M com sacarose e 9S com sacarose e trealose. Este comportamento pode ter sido consequência de uma adequação às condições de estresse durante o armazenamento. No entanto não há registros na literatura de tal comportamento para outras leveduras que tenham sido submetidas à liofilização.

Com relação às bactérias lácticas, foi identificada extensão de fase lag para a maioria das amostras adicionadas ou não de crioprotetor, demonstrando assim alterações no metabolismo destes micro-organismos em função do processo de desidratação aplicado. Assim como esperado, os tempos necessários para iniciar a fase exponencial das bactérias se manteve menor (cerca de 5-10 horas para maioria das condições) quando comparados ao requerido pelas leveduras (24 horas para maioria das amostras). Industrialmente, do ponto de vista econômico, é mais viável optar por linhagens liofilizadas que tenham menor tempo de fase lag, para que a fermentação nos tanques se inicie em um tempo menor possível. Este parâmetro foi denominado por Foerst; Santivarangkna (2017) como vitalidade e está relacionado à atividade metabólica dos micro-organismos, que após a liofilização devem ser mantidas elevadas, com produção de ácidos orgânicos (ácido láctico, principalmente), taxa de acidificação elevada (queda acentuada do pH nas primeiras horas de produção) e fase lag curta para certificar uma fermentação segura, evitando assim possíveis contaminações com fagos e micro-organismos deteriorantes nos tanques de fermentação.

Considerando os resultados alcançados e levando em consideração a possibilidade futura de aplicação industrial destas linhagens liofilizadas, optou-se pela escolha dos agentes crioprotetores sacarose e *skim milk* pelo seu valor de mercado inferior em relação à trealose. Sendo assim, as linhagens escolhidas para as formulações de culturas iniciadoras das bebidas à base de leite e de água açucarada foram liofilizadas em *skim milk* e sacarose, respectivamente.

6.3. Perfil de acidificação de bebidas fermentadas a partir de culturas iniciadoras liofilizadas durante a produção e estocagem

O kefir no Brasil era um produto basicamente produzido no ambiente doméstico, a partir da inoculação dos grãos de kefir em substratos como leite e água adicionada de açúcar mascavo (LEITE *et al.*, 2013; ZANIRATI *et al.*, 2015). Atualmente está presente no mercado uma bebida fermentada láctea vendida como kefir, que utiliza duas culturas iniciadoras: um *blend* de bactérias do fermento lácteo *Dairyland* KM1 e a levedura *Saccharomyces pastorianus* da *Diamond Lallemend* (CASTRO, 2019). No entanto, não são especificadas quais linhagens de bactérias ácidos lácticas estão presentes no produto e a levedura empregada não faz parte das linhagens preconizadas pela legislação. Além disso, não é mencionada a concentração de micro-organismos presentes na bebida fermentada. Estas são características fundamentais importantes, pois definem o que conhecemos como kefir (BRASIL, 2007). A utilização de micro-organismos isolados dos grãos de kefir para compor possíveis culturas iniciadoras podem ser facilitadas devido a tendência e relação simbiótica já estabelecidas entre eles (WITTHUHN *et al.*, 2005; CARNEIRO, 2010).

Alguns trabalhos foram realizados com objetivo de produção de kefir (BESHKOVA *et al.*, 2002; SIMOVA *et al.*, 2002; PAPAVALIOU *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2009; CARNEIRO, 2010; BOLLA *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2016). Entretanto, este é o primeiro trabalho que buscou desenvolver formulações de culturas iniciadoras liofilizadas utilizando micro-organismos previamente isolados de grãos de kefir circulantes no Brasil (ZANIRATI *et al.*, 2015), na tentativa de produção de bebida fermentada com características semelhantes ao produto tradicional. A utilização de cultura iniciadora de kefir objetiva simplificar o processo e padronizar o produto, uma vez que a diversidade de micro-organismos presentes no grão é elevada (BESHKOVA *et al.*, 2002), o que dificulta a obtenção de bateladas uniformes.

A partir das linhagens escolhidas foram elaboradas seis formulações de culturas *starter* na tentativa de produção de bebidas fermentadas à base de leite ou de água. Cada uma destas combinações foi adicionada na proporção de 4% p/v (1% de cada gênero) em três tipos de substratos: água adicionada de açúcar mascavo, leite e leite adicionado de sacarose. O uso do substrato leite adicionado de sacarose teve como objetivo observar se haveria estímulo ao crescimento das leveduras em relação ao leite sem adição do

açúcar, uma vez que o açúcar predominante no leite é a lactose e as leveduras da cultura não são fermentadoras deste carboidrato. O cálculo da quantidade de açúcar adicionado seguiu protocolo de Carneiro (2010) e segue apresentado no Apêndice B.

As formulações foram enumeradas de 1 a 6 e denominadas KL (kefir de leite), KLA (kefir de leite acrescido de sacarose) e KA (kefir de água). As combinações testadas estão apresentadas na Tabela 11 abaixo. Os mesmos substratos foram utilizados para a elaboração das bebidas fermentadas utilizando-se grãos de kefir como inóculo: KLCU (leite), KLCUsac (leite adoçado) e KACU (água):

Tabela 11 - Formulações de cultura iniciadora para produção das bebidas fermentadas.

Formulações	Linhagens selecionadas
KL1/KLA1/KA1	<i>L.casei</i> (17U), <i>Lc. lactis</i> (4U), <i>Ln. mesenteroides</i> (11U), <i>S.cerevisiae</i> (6M)
KL2/KLA2/KA2	<i>L.casei</i> (17U), <i>Lc. lactis</i> (4U), <i>Ln. mesenteroides</i> (11U), <i>S.cerevisiae</i> (7M)
KL3/KLA3/KA3	<i>L.satsumensis</i> (18P), <i>Lc. lactis</i> (4U), <i>Ln. mesenteroides</i> (11U), <i>S.cerevisiae</i> (6M)
KL4/KLA4/KA4	<i>L.satsumensis</i> (18P), <i>Lc. lactis</i> (4U), <i>Ln. mesenteroides</i> (11U), <i>S.cerevisiae</i> (7M)
KL5/KLA5/KA5	<i>L.mali</i> (21U2), <i>Lc. lactis</i> (4U), <i>Ln. mesenteroides</i> (11U), <i>S.cerevisiae</i> (6M)
KL6/KLA6/KA6	<i>L.mali</i> (21U2), <i>Lc. lactis</i> (4U), <i>Ln. mesenteroides</i> (11U), <i>S.cerevisiae</i> (7M)

O perfil de acidificação das culturas iniciadoras inoculadas em leite integral reconstituído pode ser observado na figura 21. Como controle foi utilizado grão de kefir de leite de Curitiba/Paraná. De modo geral, todas as bebidas fermentadas à base de leite apresentaram comportamento semelhante sob incubação a 28 °C/24h, sendo capazes de abaixar o pH do leite (pH 6,74) já nas primeiras 24 horas, mostrado pela redução do pH das amostras para valores que variaram entre 4,62 e 5,08. Este perfil também foi descrito por Fontan *et al.* (2006) e Sarlak *et al.* (2017) utilizando culturas comerciais.

Os valores de pH finais das bebidas KL4, KL5 e KL6 apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle (KLCU pH = 4,29), com valores de pH maiores após 24 horas de produção (4,80; 5,08 e 4,82 respectivamente). Isso demonstra que a acidificação das bebidas fermentadas por cultura iniciadora (KL) nas primeiras 24 horas foi mais lenta em comparação à fermentada pelos grãos. Resultados semelhantes foram descritos por Gul *et al.* (2015), que relataram acidificação maior nas primeiras 24 horas de fermentação para amostras de bebida produzidas com os grãos de kefir inoculados em leite de vaca (4,55) e búfala (4,26), em relação as preparações com

culturas iniciadoras comerciais (4,62) e (4,64), respectivamente. Isto pode ser explicado pela diversidade de micro-organismos presentes nos grãos, e sobretudo à presença de leveduras fermentadoras de lactose, ausentes nas culturas iniciadoras em estudo. Os valores de pH encontrados neste trabalho estão acima daqueles encontrados em laticínios, onde o kefir atinge valores de pH entre 4,3 - 4,4 (GLIBOWSKI; KOWALSKA, 2012).

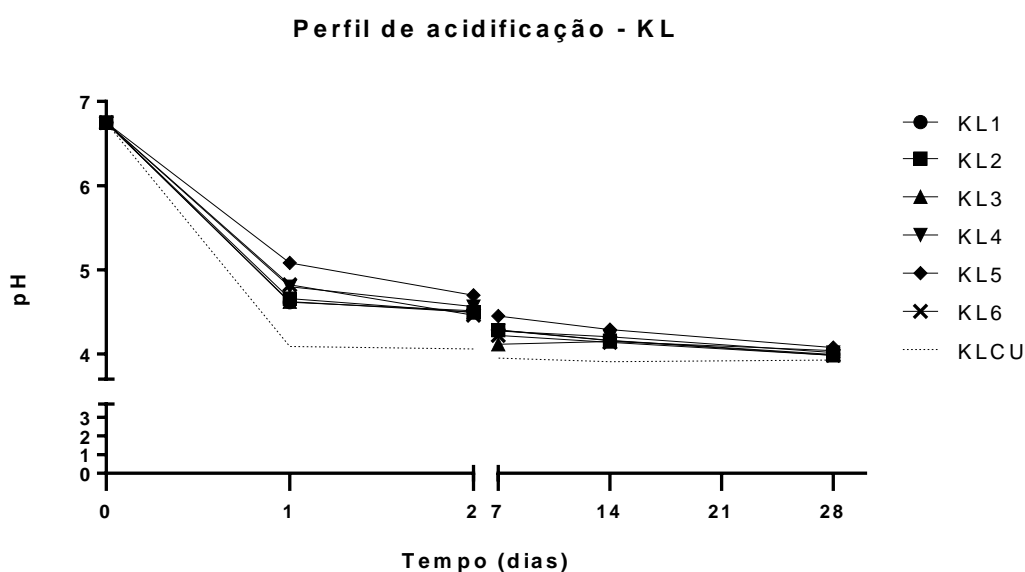


Figura 21 - Valores de pH das bebidas fermentadas à base de leite, obtidas por inoculação de culturas iniciadoras ou dos grãos de kefir (controle), durante o processo de produção e armazenamento refrigerado a 5 °C por 28 dias.

Nambou *et al.* (2014) acompanhando a evolução do pH durante 48 horas de fermentação do leite desnatado inoculado com culturas frescas isoladas de grãos kefir também observaram diminuição progressiva dos valores de pH, com variação entre 4,06 - 4,32 nas primeiras 24 horas, e 3,86 - 4,12 ao final da fermentação. Os valores de pH após 48 horas obtidos neste estudo foram acima dos relatados por esse autor (4,46 - 4,70), chegando ao 28º dia de armazenamento com valores entre 3,98 e 4,08.

Durante os 28 dias de manutenção das bebidas sob refrigeração (5 ± 2 °C), houve apenas um pequeno decaimento dos valores de pH para valores não menores que 3,98. No entanto, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as amostras experimentais e o controle (grãos de kefir) ao final de 28 dias de estocagem. Estes resultados corroboram os dados de Beshkova *et al.* (2002), Irigoyen *et al.* (2003); Carneiro (2010)

e Sarlak *et al.* (2017), que também não verificaram variação no pH durante armazenamento. Irigoyen *et al.* (2003) afirmaram que o pH não varia muito com a estocagem da bebida em função da presença das leveduras. Bactérias ácido lácticas produzem ácido láctico e acético mais lentamente, quando em presença de leveduras (COLLAR, 1996). Leite *et al.* (2013) analisando amostras de bebida fermentada a partir de grãos de kefir determinaram ao final da fermentação pH 4,85, com queda para 4,31 ao final do período de armazenamento.

Todas as bebidas à base de leite, durante a produção e ao longo do armazenamento apresentaram pH dentro dos valores já reportados na literatura (GUZEL-SEYDIM *et al.*, 2000a; IRIGOYEN *et al.*, 2003; ONER *et al.*, 2010; GRØNNEVIK *et al.*, 2011; MAGALHÃES *et al.*, 2011; LEITE *et al.*, 2012; SARLAK *et al.*, 2017).

O perfil semelhante de acidificação das bebidas produzidas com inóculo de culturas iniciadoras em leite integral reconstituído adicionado de açúcar também mostra a capacidade de redução inicial do pH (primeiras 24 horas de fermentação do substrato) para todas amostras (Figura 22). A redução do pH do leite (6,74) foi para valores entre 4,25 (KLA3) e 4,79 (KLA5). Em 48 horas também houve diminuição discreta dos valores, compreendidos entre 4,11 (KLA4) e 4,46 (KLA5). Com relação a adição de açúcar ao substrato, houve diferença significativa apenas para as amostras KL4 e KLA4 ($p < 0,05$), atingindo valores de pH menores quando sacarose foi adicionada às bebidas. Todas as bebidas ao final do 28º dia sob refrigeração mostraram pH com variação entre 3,80 (KL4) e 3,90 (KL5) e não foi verificada diferença estatística entre as amostras ao final do tempo de experimentação ($p > 0,05$).

A queda pronunciada do pH durante as primeiras 24 horas de fermentação é fundamental do ponto de vista da biopreservação e produção de aroma e sabor em bebidas fermentadas (GÜZEL-SEYDIM *et al.*, 2000a; HANSEN, 2002). As bactérias ácido lácticas presentes no kefir são os micro-organismos responsáveis inicialmente pela conversão da lactose em ácido láctico, levando à queda do pH (RATTRAY; O'CONNEL, 2011). Este fenômeno permite a conservação do leite, impedindo o desenvolvimento de micro-organismos indesejáveis que podem gerar alterações na qualidade e propriedades sensoriais do produto (HANSEN, 2002).

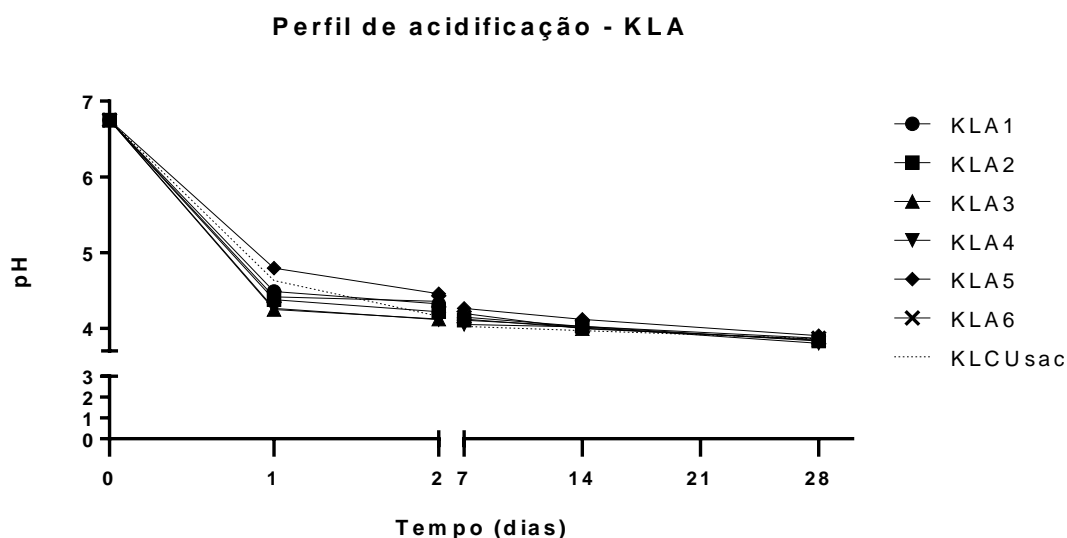


Figura 22 - Valores de pH das bebidas fermentadas à base de leite adicionado de sacarose, obtidas por inoculação de culturas iniciadoras ou dos grãos de kefir (controle), durante o processo de produção e armazenamento refrigerado a 5 °C por 28 dias.

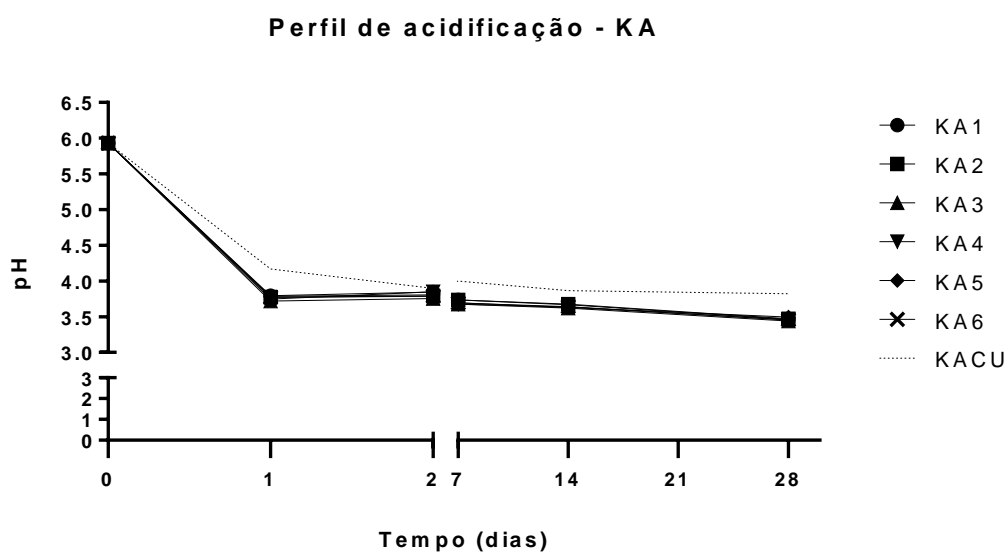


Figura 23 - Valores de pH das bebidas fermentadas à base de água adicionada de açúcar mascavo, obtidas por inoculação de culturas iniciadoras ou dos grãos de kefir (controle), durante o processo de produção e armazenamento refrigerado a 5 °C por 28 dias.

As bebidas fermentadas com culturas iniciadoras em água adicionada de açúcar mascavo (Figura 23) mostraram comportamento similar entre si durante produção e armazenamento. Foi verificado redução do pH do substrato (5,93) com adição dos inóculos e incubação a 28°C/24 horas. Houve diferença significativa entre as amostras

experimentais e o controle nas primeiras 24 horas de produção e após 28 dias de armazenamento ($p < 0,05$), com identificação de maiores valores de pH para as bebidas experimentais. Com 24 horas de produção, o pH das bebidas produzidas com cultura iniciadora variou entre 3,71 (KA4) e 3,82 (KA5). Ao longo do armazenamento houve queda nos valores, que ficaram entre 3,46 (KA1) e 3,58 (KA5).

Laureys; Vuyst (2014), estudando kefir de água produzido com grãos, observaram variação no pH das amostras após 72 horas de fermentação para o valor de 3,45 e queda para 3,34 ao final de 192 horas de fermentação. Magalhães *et al.* (2010) também verificaram para amostras de kefir de água fermentado durante 24 horas por grãos pH igual a 4,1. Este valor é próximo ao encontrado neste estudo para KACU (4,17).

6.4. Caracterização microbiológica de bebidas fermentadas a partir de culturas iniciadoras liofilizadas durante a produção e estocagem

A quantidade de bactérias ácido-láticas (BAL) e leveduras (LEV) totais viáveis de cada formulação testada foi determinada durante a produção e todo período de armazenamento refrigerado das bebidas (1, 2, 7, 14 e 28 dias). Nas figuras 24 e 25 estão representados os resultados (log UFC/mL) referentes às bebidas de leite.

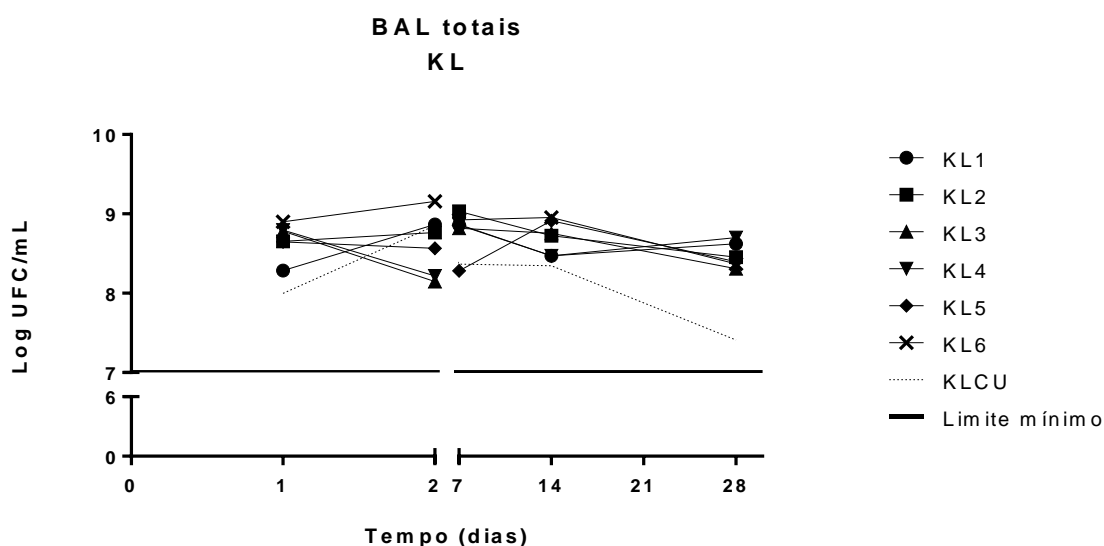


Figura 24 - Densidade populacional de BAL (log UFC/mL) das bebidas fermentadas à base de leite, obtidas por inoculação de culturas iniciadoras ou dos grãos de kefir (controle), durante o processo de produção e armazenamento refrigerado a 5 °C por 28 dias.

Na determinação de bactérias lácticas totais, pode-se observar na Figura 24 que todas as formulações à base de leite atingiram contagens satisfatórias, ou seja, acima do limite estabelecido pela legislação (6,0 log UFC/mL) (BRASIL, 2007; CODEX ALIMENTARIUS, 2018), e mantiveram-se dentro dos parâmetros esperados ao longo de todo tempo de estocagem da bebida sob refrigeração. Durante as primeiras 24 horas, o número de células viáveis ficou entre 8,29 e 8,90 log UFC/mL para as amostras KL1 e KL6, respectivamente. Ao final de 28 dias de armazenamento refrigerado a 5 °C, estes valores diminuiram discretamente para 8,31 (KL3) e 8,70 (KL4). Estes resultados foram cerca de 0,90 - 1,29 log UFC/mL acima do encontrado para a bebida preparada com os grãos (7,41). De modo geral, as contagens permaneceram estáveis após 24 horas de fermentação e ao longo de 28 dias de armazenamento refrigerado e não houve diferença significativa entre as bebidas ($p < 0,05$). Os resultados de Leite *et al.* (2013) foram similares aos encontrados neste estudo. Examinando BAL (*Lactobacillus e Lactococcus*) presentes em bebidas de kefir de leite fermentado com grãos foi verificado que as contagens permaneceram constantes (10 log UFC/mL) após 18 horas de fermentação e durante armazenamento de 28 dias. Para amostra controle, foi observada queda de 1,44 ciclos log entre o 14° e 28° dia, mas mesmo assim os valores se mantiveram dentro dos padrões exigidos por lei.

Estudos realizados por Nambou *et al.* (2014) produziram bebidas kefir adicionando cultura iniciadora com micro-organismos isolados de diferentes fontes como inóculo. Quatro entre as sete bebidas atenderam as exigências de número de células viáveis de bactérias ácido lácticas totais e leveduras, estabelecido pelo *Codex Alimentarius*. Desta forma, foi concluído que as formulações de culturas iniciadoras empregadas no estudo eram convenientes para produção de bebidas do tipo kefir. Em outro estudo, constatou-se presença de 9,9 log UFC/mL de bactérias ácido lácticas totais nas bebidas fermentadas com cultura iniciadora líquida (CARNEIRO, 2010). Irigoyen *et al.* (2003) afirmaram que as populações de bactérias ácido lácticas diminuem com o tempo de armazenamento e que em função disso, o pH não se torna mais ácido.

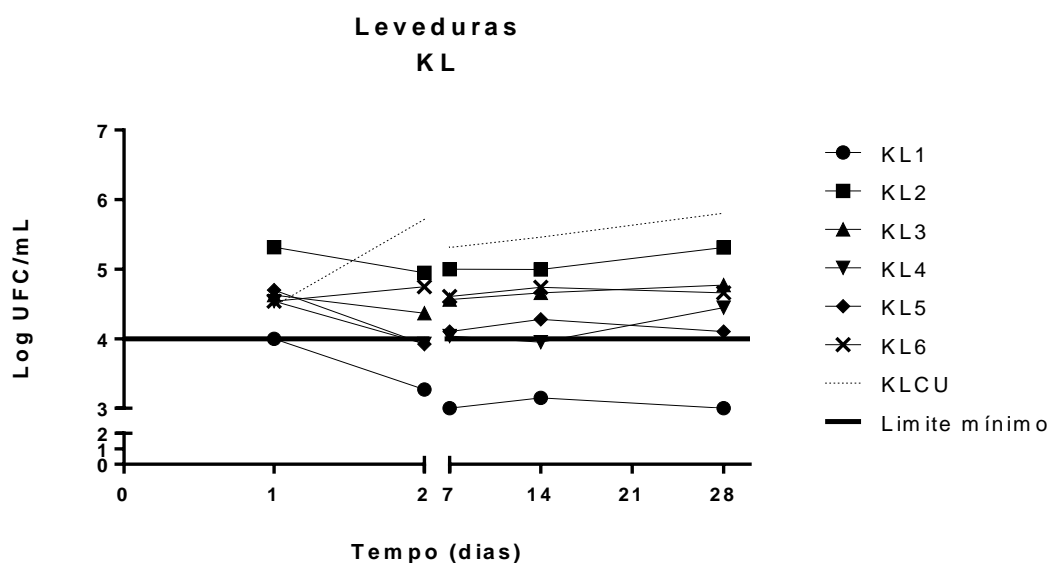


Figura 25 - Densidade populacional de LEV (log UFC/mL) das bebidas fermentadas à base de leite, obtidas por inoculação de culturas iniciadoras ou dos grãos de kefir (controle), durante o processo de produção e armazenamento refrigerado a 5 °C por 28 dias.

Para as leveduras, foi possível notar que apenas a bebida KL1 não manteve as contagens dentro do padrão estabelecido pela legislação (4,0 log UFC/mL) durante todo tempo de experimentação (Figura 25). Todas as outras atendem a este requisito e variaram os valores durante o início da produção (24 horas) entre 4,54 e 5,32 log UFC/mL. Além disso, a bebida produzida pelos grãos de kefir (controle) após 48 horas de fermentação apresentou contagens de leveduras de pelo menos um ciclo log superior à KL1, KL3, KL4, KL5 e KL6. Isto pode estar relacionado a maior diversidade de leveduras presentes no grão, inclusive espécies fermentadoras de lactose. Ao final do armazenamento, o número de leveduras presentes nas amostras ficou entre 3,0 (KL1) e 5,31 (KL2) log UFC/mL. A bebida KLCU apresentou as maiores contagens de leveduras após 48 horas de produção e durante o estoque, com valores finais de contagens equivalentes a 5,80 log UFC/mL.

Estudos detectaram aumento significativo nas contagens de leveduras no kefir produzido a partir de cultura comercial, após 3 semanas de armazenamento (GRØNNEVIK *et al.*, 2011). Resultados diferentes foram alcançados por Leite *et al.* (2013) que observaram contagens de leveduras constantes após 12 horas de fermentação e durante o armazenamento de 28 dias da bebida. Gul *et al.* (2015) verificaram diminuição da contagem de leveduras como dependente do aumento da contagem de *Lactobacillus*, após 14º dia de armazenamento de bebida fermentada a partir da adição

de cultura iniciadora. Segundo Simova *et al.* (2002), as contagens de leveduras nas amostras de kefir podem ter sido alteradas por alguns ácidos produzidos por bactérias lácticas.

Assim como observado para as culturas iniciadoras no substrato leite, quando estas foram inoculadas em leite adicionado de sacarose, também foram capazes de manter contagens totais de BAL acima do preconizado pela legislação brasileira (Figura 26). Curiosamente, a fermentação do substrato pelos grãos também gerou ao final do 28º dia de armazenamento, contagens totais de BAL numericamente inferiores às demais bebidas fermentadas por culturas iniciadoras liofilizadas (diferença de 0,66-1,98 log UFC/mL). Desta forma, pode-se inferir para ambas as bebidas de leite, que a utilização de culturas iniciadoras promoveu maior estabilidade nas contagens totais de bactérias ácido lácticas ao final do armazenamento refrigerado quando comparado ao emprego de grãos de kefir (controles). As contagens com 24 horas de produção foram entre 7,91 (KLA2) e 8,67 (KLA3). Os valores evoluíram após 48 horas para 8,01 (KLA6) e 9,22 (KLA4). Todas as bebidas ao final do armazenamento apresentaram contagens de BAL viáveis não inferiores a 8 log UFC/mL, variando entre 8,03 (KLA1) e 8,58 (KLA2).

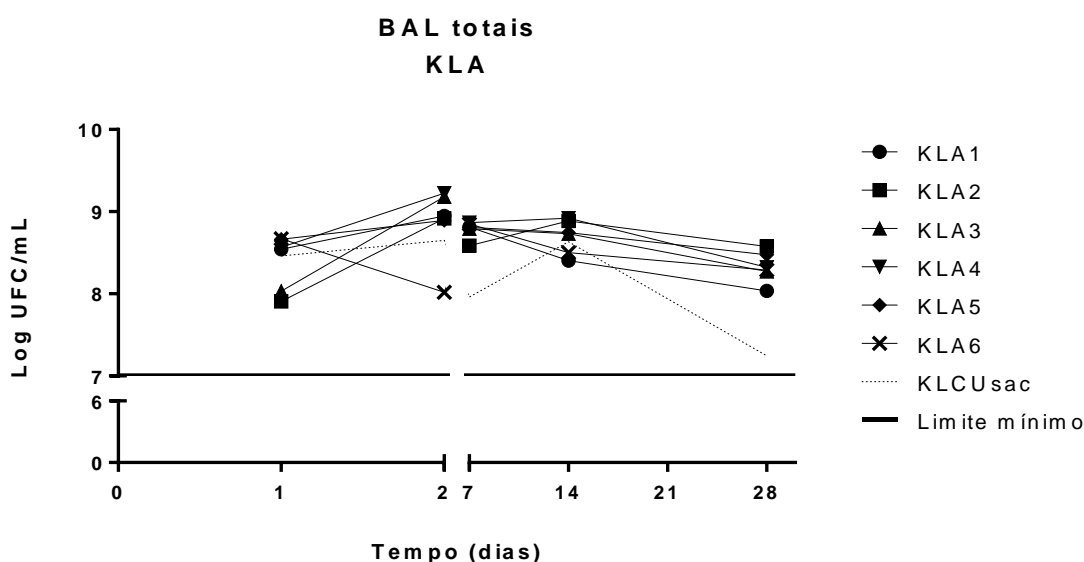


Figura 26 - Densidade populacional de BAL (log UFC/mL) das bebidas fermentadas à base de leite adicionado de sacarose, obtidas por inoculação de culturas iniciadoras ou dos grãos de kefir (controle), durante o processo de produção e armazenamento refrigerado a 5 °C por 28 dias.

De modo geral, todas as formulações à base de leite adicionado de sacarose apresentaram contagens satisfatórias de leveduras viáveis no produto final, ao longo dos 28 dias de armazenamento (Figura 27). Todas as bebidas atenderam ao limite mínimo de 4,0 log UFC/mL durante produção e armazenamento refrigerado de 28 dias. Nas primeiras 24 horas de produção das bebidas, notou-se que o número de células viáveis variou entre 4,24 (KLA3) e 5,58 (KLA2). Após 48 horas, esta variação foi entre 4,0 (KLA5) e 5,29 (KLA2). Ao longo dos 28 dias de armazenamento as contagens não ficaram abaixo de 4 e nem excederam o valor de 6 log UFC/mL para nenhuma das bebidas. A contagem ao final de 28º dia para KLCUsac foi superior às demais amostras de bebidas produzidas com cultura iniciadora (5,96).

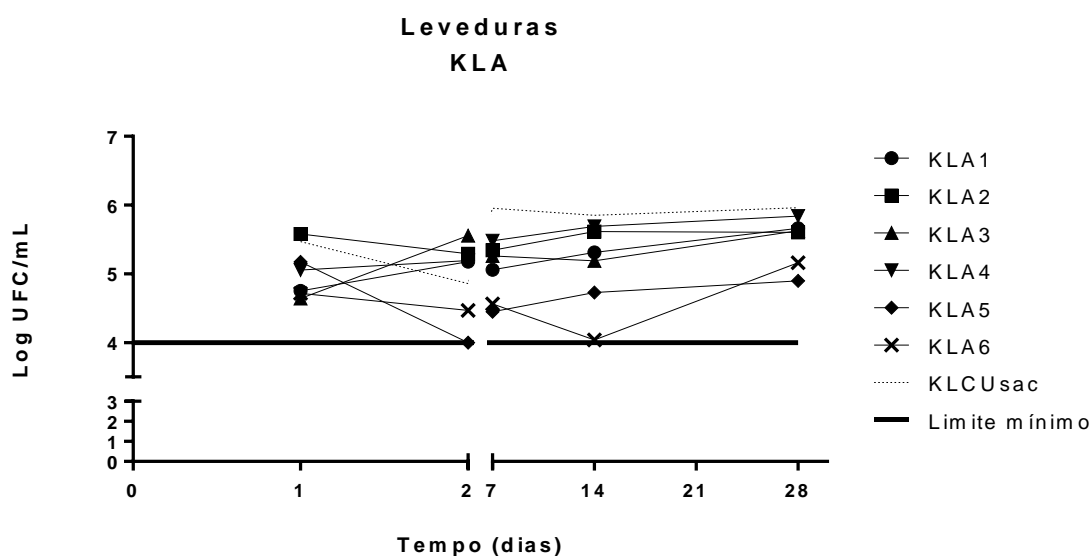


Figura 27 - Densidade populacional de LEV (log UFC/mL) das bebidas fermentadas à base de leite adicionado de sacarose, obtidas por inoculação de culturas iniciadoras ou dos grãos de kefir (controle), durante o processo de produção e armazenamento refrigerado a 5 °C por 28 dias.

É importante salientar o perfil semelhante de viabilidade das leveduras na bebida fermentada pelos grãos à base de leite e leite adoçado. A adição de sacarose só representou alteração significativa ($p < 0,05$) para a cultura iniciadora 1 (KL1; KLA1) e ao final de 28º dias de armazenamento, permitindo que a amostra apresentasse contagens de leveduras de acordo com o preconizado na legislação. Isto pode estar relacionado a particularidades na interação, ainda não elucidadas, entre *Lactobacillus casei* 17U e *Saccharomyces cerevisiae* 6M, em que a adição de sacarose favorece o

crescimento de *S. cerevisiae*. Para as demais culturas iniciadoras não houve diferença significativa ($p > 0,05$) mediante adição de sacarose. Talvez exista algum mecanismo simbiótico entre essas linhagens semelhante ao que já foi descrito para algumas espécies de leveduras e bactérias lácticas. Já foi determinado, por exemplo, que as taxas de crescimento e produção do kefirano de *L. kefiranofaciens* aumentaram significativamente quando cultivado com *S. cerevisiae* (CHEIRSILP *et al.*, 2007). Xu *et al.* (2018) estudando a relação existente entre *L. hordei* e a levedura *S. cerevisiae* isolados de grãos de kefir de água, observaram que o dextrano produzido por *L. hordei* estimulou a agregação de *S. cerevisiae* em superfícies hidrofílicas, sendo este, segundo os autores, o mecanismo inicial responsável pelo crescimento gradual dos grãos de kefir de água. Ponomarova *et al.* (2017) mostraram que em ambientes ricos em nitrogênio, *S. cerevisiae* secreta diversos metabólitos (principalmente aminoácidos) que permite a sobrevivência de *L. plantarum* em suco de uva. Neste mesmo estudo, também foi investigado o co-cultivo de *Lc. lactis* (isolados de kefir) e a levedura (*S. cerevisiae*) e determinou-se a dependência metabólica bidirecional destas duas espécies quando cultivadas em meio de cultura adicionado de lactose. *Lc. lactis* depende da levedura como fonte de nitrogênio e a levedura, por sua vez, depende do carbono resultante do metabolismo de *Lc. lactis*, devido sua incapacidade de metabolizar a lactose.

A preocupação em adicionar sacarose ao leite utilizado para a produção de bebidas fermentadas para promover o crescimento de leveduras não é um fato novo. No entanto, aparentemente, essa adição não parece ter efeito significativo sobre o crescimento de leveduras não fermentadoras de lactose. Beshkova *et al.* (2002) adicionaram sacarose (0,45%) durante a produção de kefir pelo método de fermentação simultânea e obtiveram contagem de células viáveis igual a $7,5 \times 10^6$ UFC/mL. Empregando a fermentação sucessiva (adição inicial das bactérias ácido lácticas e posterior inóculo de *S. cerevisiae* + 0,45% de sacarose) o valor encontrado foi de $8,5 \times 10^6$ UFC/mL. Carneiro (2010) adicionou sacarose durante a fermentação das bebidas e obteve, como resultado, contagens de $6,39 \log$ UFC/mL após 28 dias de estocagem. O trabalho não apresentou bebidas produzidas sem adição de sacarose.

O efeito da adição de sacarose também não promoveu maiores contagens de leveduras nas bebidas inoculadas com grãos e isto pode ser decorrente da diversidade de espécies encontradas nestas estruturas, que incluem linhagens não-fermentadoras e aquelas capazes de fermentar o principal açúcar presente no leite, a lactose.

As figuras 28 e 29 referem-se aos resultados obtidos para as bebidas fermentadas de água adicionada com açúcar mascavo.

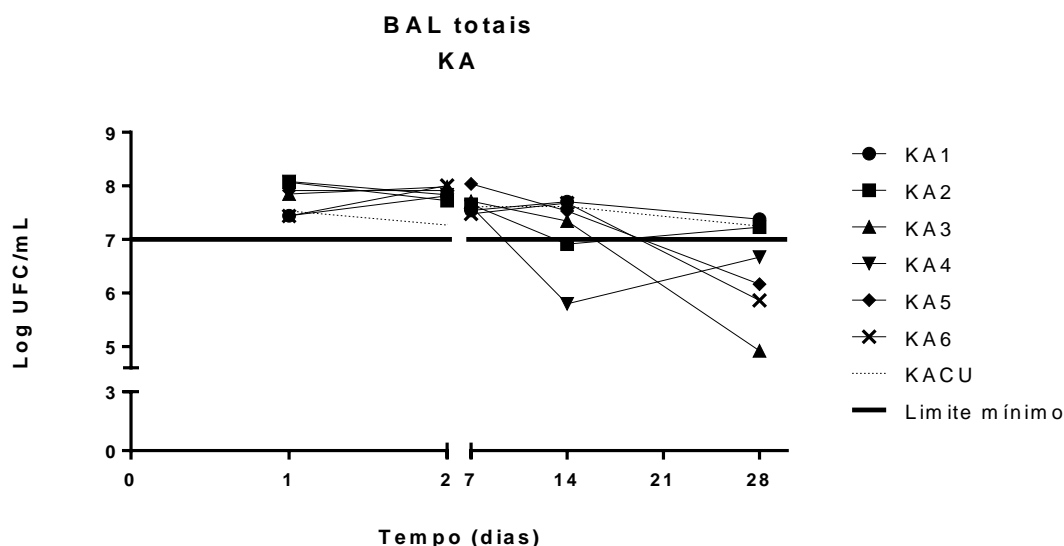


Figura 28 - Densidade populacional de BAL (log UFC/mL) das bebidas fermentadas à base de água adicionada de açúcar mascavo, obtidas por inoculação de culturas iniciadoras ou dos grãos de kefir (controle), durante o processo de produção e armazenamento refrigerado a 5 °C por 28 dias.

Como ainda não existe uma legislação para o kefir de água, os valores encontrados neste estudo foram comparados aos parâmetros existentes para o kefir de leite. Desta maneira, foi possível verificar que as bebidas à base de água que atenderam aos limites mínimos para contagem de BAL durante todo tempo de estoque refrigerado foram KA1 e KA2 (Figura 28). A enumeração de KA2 no 14º dia foi ligeiramente inferior ao limite mínimo, entretanto a redução não perpetuou nos demais tempos de estocagem. As contagens de bactérias lácticas viáveis na bebida de água após 24 horas de produção variaram entre 7,43 (KA6) e 8,08 (KA4), permanecendo estáveis após 48 horas. Após o 14º dia de modo geral, foi possível verificar redução nestes valores para as formulações de cultura iniciadora e o controle (grãos). No entanto, após 28 dias de armazenamento, observa-se diminuição das contagens cerca de 3 e 2 ciclos log, respectivamente para KA3 e KA6. Já para KACU, o número de células durante todo armazenamento foi > 7,0 log UFC/mL, um ciclo log acima dos parâmetros comparados para as bebidas de leite.

Quando comparado as bebidas à base de leite, as formulações de kefir de água açucarada apresentaram quantidades numericamente inferiores de células viáveis de BAL variando entre 4,92 e 8,08 log UFC/mL. Ainda são poucos os estudos na literatura sobre kefir de água se comparado às informações que já se tem a respeito do kefir de leite. A maioria dos estudos se limitam a identificação de espécies presentes nestes grãos (GULITZ *et al.*, 2011; LAUREYS; VUYST, 2014; MAGALHÃES *et al.*, 2010).

Villanoeva (2016) avaliou a qualidade microbiológica e físico-química de bebidas produzidas por grãos de kefir de água de origem brasileira, entre eles os grãos utilizados para produzir a bebida controle neste trabalho. As contagens de BAL atingiram populações iniciais de 6 log UFC/mL, aumentando um ciclo log em 48 horas e durante o período de armazenamento reduziram novamente para 6 log UFC/mL. Estes valores são inferiores aos encontrados no nosso estudo.

Magalhães *et al.* (2010) analisaram a bebida fermentada por grãos de kefir através da aplicação de métodos dependentes e independentes de cultivo. *Lactobacillus* foi a linhagem mais frequentemente encontrada nas bebidas, com uma população de micro-organismos inicial de 6,82 log UFC/mL, evoluindo para 8,32 log UFC/mL após 24 horas de fermentação. Estes resultados estão em consonância com os valores apresentados neste trabalho. Após 24 horas de produção das bebidas, as contagens de células de BAL viáveis variaram entre 7,43 e 8,08 UFC/mL. Por sua vez, Laureys; Vuyst (2014) verificaram contagens constantes de BAL durante a fermentação e o número de células viáveis equivalente a 6,9 log UFC/mL. Em 2018, estes autores analisaram o cultivo dos grãos em diferentes fontes e concentrações de nutrientes e oxigênio e percebeu que estes parâmetros influenciaram no crescimento, diversidade de espécies microbianas, consumo de substratos e produção de metabólitos durante a fermentação de kefir de água.

No que diz respeito às leveduras (Figura 29), todas as bebidas fermentadas à base de água açucarada apresentaram número de células viáveis entre 5 e 6 log UFC/mL durante todo o período de experimentação, pelo menos 1 ciclo log superior ao encontrado para as bebidas à base de leite e também superior ao padrão estabelecido pela legislação brasileira para kefir de leite. Ao final de 24 horas, o número de células viáveis foi entre 5,86 e 5,11. Estes valores estão 1-2 ciclos log abaixo do encontrado por Laureys; Vuyst (2014) (6,3 log UFC/mL) e Magalhães *et al.* (2010) (7,31 log UFC/mL) após fermentação de 24 horas. Isto pode ser justificado pela maior variabilidade dos

grãos frente a cultura iniciadora testada com presença apenas da espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Além disso, as linhagens de *S. cerevisiae* (6M e 9M) presentes nas culturas iniciadoras deste estudo foram submetidas inicialmente ao *stress* do processo de liofilização, apresentando crescimento prejudicado, identificado pelo aumento da fase lag.

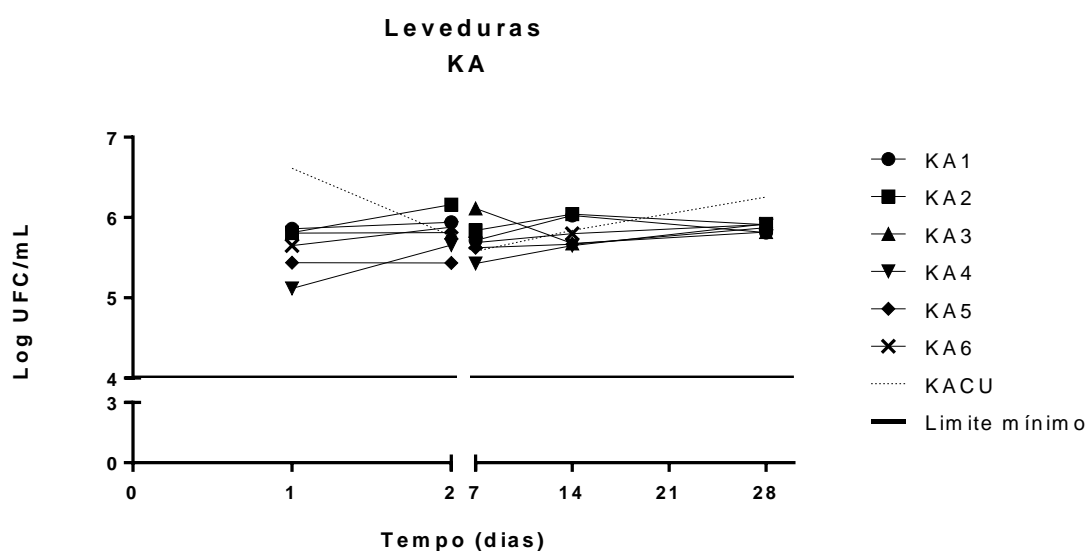


Figura 29 - Densidade populacional de LEV (log UFC/mL) das bebidas fermentadas à base de água adicionada de açúcar mascavo, obtidas por inoculação de culturas iniciadoras ou dos grãos de kefir (controle), durante o processo de produção e armazenamento refrigerado a 5 °C por 28 dias.

6.5. Concentração de etanol, ácido lático e ácido acético nas bebidas fermentadas a partir de culturas iniciadoras liofilizadas durante a produção e estocagem

A quantificação de etanol através do método HPLC foi realizada nas amostras de bebidas produzidas com culturas iniciadoras e com os grãos de kefir de leite e água. Os dados apresentados na tabela 12 correspondem às concentrações durante a produção (24 e 48 horas) e armazenamento (7, 14 e 28 dias) sob refrigeração ($5 \pm 2^\circ\text{C}$).

Tabela 12 - Concentrações de etanol nas formulações fermentadas por culturas iniciadoras (% v/v de bebida fermentada) ao longo de 28 dias sob refrigeração (5 ± 2 °C).

Amostra	24 horas	48 horas	7 dias	14 dias	28 dias
KLCU	0,283	0,303	0,294	0,320	0,326
KL1	0,000	0,317	0,371	0,427	0,472
KL2	0,000	0,000	0,371	0,404	0,462
KL3	0,312	0,289	1,230	0,468	0,519
KL4	0,000	0,289	0,321	0,416	0,440
KL5	0,000	0,299	0,324	0,442	0,442
KL6	0,000	0,312	0,327	0,399	0,449
KLCUsac	0,338	0,214	0,618	0,654	0,631
KLA1	0,000	0,000	0,000	0,264	0,291
KLA2	0,000	0,000	0,231	0,283	0,317
KLA3	0,000	0,000	0,252	0,287	0,338
KLA4	0,000	0,000	0,244	0,312	0,324
KLA5	0,000	0,000	0,000	0,220	0,225
KLA6	0,000	0,000	0,000	0,266	0,307
KACU	0,820	1,024	1,019	0,695	0,306
KA1	0,000	0,000	0,000	0,250	0,229
KA2	0,000	0,000	0,000	0,216	0,252
KA3	0,000	0,000	0,000	0,267	0,300
KA4	0,000	0,000	0,000	0,237	0,238
KA5	0,000	0,000	0,253	0,230	0,231
KA6	0,000	0,279	0,232	0,214	0,253

Para as bebidas à base de leite (KL), apenas KL3 apresentou concentração de etanol após 24 horas de produção (0,312%), sendo mais semelhante à produzida com grãos de kefir (0,283%). De modo geral, as concentrações aumentaram ao longo do período de armazenamento e foi ligeiramente superior para as amostras experimentais em comparação com o controle (KLCU). Estes resultados são similares aos achados de Carneiro (2010); Nambou *et al.* (2014); Leite *et al.* (2013); Sarlak *et al.* (2017).

Para as bebidas KLA não foi verificada concentração de etanol durante a produção (24/48 horas) e todas as bebidas apresentaram concentrações abaixo da amostra controle (KLCUsac). Os valores de etanol encontrados em KL foram, em sua maioria, próximos aos valores definidos pela legislação brasileira (BRASIL, 2007) que estabelece o teor de etanol entre 0,5 – 1,5% v/v. No entanto, apenas a amostra KL3 apresentou valor acima de 0,5% (0,519). Entretanto, a FAO/WHO (2018) não determina o teor ideal de etanol que deve estar presente no kefir.

As maiores concentrações nas amostras controle (KLCU e KLCUsac) podem ser em decorrência da maior diversidade de micro-organismos presentes nestes grãos (GUL *et al.*, 2015; GUZEL-SEYDIM *et al.*, 2000b). O metabolismo de *S. cerevisiae* é o maior

responsável pela produção de etanol (MAGALHÃES *et al.*, 2011; LEITE *et al.*, 2013). No entanto, outros pesquisadores relataram a produção de etanol também pelas espécies de leveduras *Kluyveromyces*, *Candida* e *Torulaspora* (MAGALHÃES *et al.*, 2010; NAMBOU *et al.*, 2014). Além disso, espécies de bactérias heterofermentadoras também são capazes de produzir etanol, como as presentes no kefir, mencionadas em alguns estudos: *Lactobacillus kefir* e *Leuconostoc* spp., pois apresentam atividade da enzima álcool desidrogenase, responsável pela conversão de acetaldeído em etanol (GÜZEL-SEYDIM *et al.*, 2000a; LEITE *et al.*, 2013; MAGALHÃES *et al.*, 2011). A adição de sacarose apenas gerou concentrações superiores para bebidas controle (KLCUsac).

Os teores de etanol encontrados para kefir na literatura variam bastante, uma vez que as bebidas produzidas com culturas iniciadoras ou grãos de kefir possuem microbiotas distintas. Mothagi *et al.* (1997) verificaram concentrações de etanol entre 0,10-0,20 % v/v para bebidas fermentadas com grãos de kefir durante a fermentação. Assadi *et al.* (2000) encontraram concentrações de etanol nas bebidas produzidas com culturas iniciadoras de 0,33 - 0,55% v/v, próximos aos resultados deste estudo para as bebidas de leite. Magalhães *et al.* (2010) observaram produção limitada de etanol na bebida produzida com grãos de kefir de água, com teor ao final da fermentação de 1,24 mg/mL. Por sua vez, Laureys; Vuyst (2014) identificaram 2,54 % v/v (20,3 mg/mL) de etanol após 72 horas de produção, superior aos valores encontrados neste estudo.

As amostras de bebida à base de água adicionada de açúcar mascavo, produzidas com as culturas iniciadoras, exibiram produção de etanol tardia em relação às demais bebidas de leite, sendo identificadas a partir do 14º dia de armazenamento para a maioria das amostras e para KA5 e KA6 a identificação foi após 7 dias de armazenamento e 48 horas de fermentação, respectivamente. Todas as amostras apresentaram concentrações abaixo do encontrado para o grupo controle (KACU), cuja concentração de etanol já era alta desde as primeiras 24 horas. Vale ressaltar ainda que no controle, a concentração aumentou (até 48 horas) e seguiu com queda ao longo dos 28 dias de armazenamento. Tanto os grãos de kefir de leite, como os de água apresentam microbiota diversa, incluindo também a presença de bactérias acéticas. Segundo Magalhães *et al.* (2010) o etanol pode ser convertido em ácido acético por bactérias acéticas heterofermentativas do gênero *Acetobacter*. Este micro-organismo apresenta atividade enzimática álcool desidrogenase, responsável pela conversão de etanol em acetaldeído (BESHKOVA *et al.*, 2003). O gênero *Gluconobacter* também possui capacidade oxidativa de álcool

(ZILIOLI, 2011). Este comportamento pode explicar a diminuição da concentração de etanol ao longo do armazenamento da bebida controle deste trabalho, produzida com grãos de kefir de água.

O atraso observado na produção de etanol para as bebidas produzidas com culturas iniciadoras pode estar relacionado a extensão da fase lag, uma vez que estas culturas sofreram estresses durante processo de liofilização, o que pode ter prejudicado o metabolismo. A presença de etanol é responsável pelo sabor exótico e aroma refrescante característico do kefir (GUL *et al.*, 2015).

Os resultados da concentração de ácido láctico nas amostras de bebidas produzidas com as culturas iniciadoras em estudo são apresentados na Tabela 13. Os valores de concentração de ácido láctico foram superiores para as bebidas à base de leite em relação às de água açucarada. Todas as bebidas de leite produzidas com as culturas iniciadoras, apresentaram valores bem próximos aos identificados nas bebidas preparadas com grãos de kefir (controles) Para as bebidas à base de água açucarada preparada com as culturas iniciadoras apresentaram concentrações de ácido láctico cerca de 3 vezes superior à bebida controle (KACU). Gul *et al.* (2015) que identificaram presença de 7,90 e 5,96 microgramas de ácido láctico na bebida produzida com grãos de kefir e cultura iniciadora comercial, respectivamente.

Tabela 13 - Concentração de ácido láctico nas formulações fermentadas por culturas iniciadoras (g/100g de bebida fermentada) ao longo de 28 dias sob refrigeração (5 ± 2 °C).

Amostra	24 horas	48 horas	7 dias	14 dias	28 dias
KLCU	0,377	0,384	0,444	0,460	0,425
KL1	0,356	0,348	0,442	0,453	0,479
KL2	0,398	0,366	0,433	0,437	0,488
KL3	0,370	0,425	0,406	0,418	0,439
KL4	0,465	0,299	0,432	0,451	0,468
KL5	0,214	0,301	0,398	0,420	0,435
KL6	0,320	0,375	0,456	0,413	0,474
KLCUsac	0,286	0,334	0,406	0,474	0,424
KLA1	0,412	0,475	0,341	0,460	0,503
KLA2	0,328	0,387	0,434	0,429	0,475
KLA3	0,402	0,449	0,422	0,432	0,472
KLA4	0,275	0,489	0,431	0,536	0,490
KLA5	0,252	0,350	0,394	0,434	0,432
KLA6	0,328	0,351	0,392	0,434	0,454
KACU	0,021	0,023	0,025	0,027	0,025
KA1	0,095	0,081	0,099	0,097	0,100
KA2	0,070	0,104	0,093	0,105	0,123
KA3	0,101	0,107	0,099	0,108	0,102
KA4	0,075	0,089	0,110	0,100	0,112
KA5	0,105	0,136	0,092	0,094	0,103
KA6	0,105	0,120	0,093	0,104	0,094

Segundo a legislação brasileira, pela Instrução Normativa N° 46, ficou estabelecido no Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos que a acidez em gramas de ácido láctico para cada 100 g do produto kefir não deve exceder 0,6 – 2,0 % m/m (BRASIL, 2007). Como pode ser observado, todas as amostras quantificadas apresentaram concentrações de ácido láctico que atendem a este critério, durante todo período experimental. Magalhães *et al.* (2011) identificaram ao final de 24 horas de produção do kefir, teor de ácido láctico equivalente a 1,44% m/m (17,4 mg/mL), que excede ao limite estabelecido pela legislação.

A concentração de ácido láctico aumentou ao longo dos 28 dias de armazenamento refrigerado para maioria das amostras. Resultados semelhantes já foram reportados na literatura (BESHKOVA *et al.*, 2002; GRØNNEVIK *et al.*, 2011; LEITE *et al.*, 2013; SIMOVA *et al.*, 2002). Beshkova *et al.* (2002) observaram o mesmo aumento, após 7 dias de armazenamento tanto para as bebidas adicionadas de cultura iniciadora, como de grãos de kefir.

O conteúdo de ácido láctico encontrado nas bebidas experimentais à base de água foi superior ao apresentado no controle. De modo geral, ácido láctico foi identificado após 24 horas de produção em todas as amostras e as concentrações não sofreram variações consideráveis ao longo do armazenamento. Magalhães *et al.* (2010) verificaram decréscimo da concentração de ácido láctico durante 24 horas de produção de bebida de água produzida com grãos de kefir de água. Por sua vez, Laureys; Vuyst (2014) identificaram aumento de 0,7 para 4,99 g/L no teor de ácido láctico nas bebidas fermentadas com grãos de kefir de água. Este produto metabólico principal de espécies de bactérias ácido lácticas seria o responsável pelo sabor azedo e refrescante que caracteriza o kefir de água, segundo estes autores.

Na Tabela 14 são apresentados os dados referentes ao conteúdo de ácido acético. Nem a legislação brasileira, nem a FAO/WHO estabelecem as concentrações de ácido acético que devem estar presentes no kefir. Os parâmetros encontrados no estudo foram então comparados com valores já relatados na literatura por outros pesquisadores, para kefir de leite e de água.

Tabela 14 - Concentrações de ácido acético nas formulações fermentadas por culturas iniciadoras (mg/mL de bebida fermentada) ao longo de 28 dias sob refrigeração (5 ± 2 °C).

Amostra	24 horas	48 horas	7 dias	14 dias	28 dias
KLCU	0,702	1,332	1,033	0,896	1,406
KL1	1,311	1,528	1,273	1,497	1,185
KL2	1,424	1,067	1,425	1,322	1,313
KL3	1,498	1,490	1,378	1,294	1,082
KL4	1,767	0,874	1,304	1,951	1,318
KL5	1,110	1,051	1,641	1,900	1,279
KL6	1,147	1,197	1,340	2,218	1,317
KLCUsac	0,749	1,232	1,042	1,191	1,573
KLA1	1,862	2,156	1,500	2,762	2,331
KLA2	1,407	1,894	2,077	1,746	2,299
KLA3	2,091	2,373	2,088	2,305	2,385
KLA4	1,342	2,527	2,002	3,110	2,437
KLA5	1,234	1,837	1,800	2,584	1,939
KLA6	1,654	1,810	1,974	2,807	2,408
KACU	0,000	0,010	0,077	0,184	0,177
KA1	0,153	0,044	0,146	0,288	0,446
KA2	0,030	0,008	0,086	0,150	0,426
KA3	0,000	0,000	0,000	0,140	0,336
KA4	0,000	0,000	0,055	0,135	0,120
KA5	0,058	0,178	0,216	0,252	0,045
KA6	0,056	0,143	0,158	0,094	0,305

De modo geral, as concentrações de ácido acético foram bem próximas aos valores determinados nas amostras controle. Para as bebidas KL, notou-se diminuição nas concentrações ao final do 28º dia de armazenamento, para as bebidas produzidas com as culturas iniciadoras. O controle, por sua vez apresentou aumento na concentração. Para maioria das bebidas KLA observou-se concentrações superiores (mínimo o dobro) aos valores verificados no controle (KLCUsac). Em relação às bebidas à base de leite, aquelas de água apresentaram teores inferiores de ácido acético, com produção máxima de 0,446 mg/mL no 28º dia.

Após 24 horas de produção identificou-se concentração de 2,73 mg/mL de ácido acético em amostras de bebida de leite fermentado por grãos de kefir por Magalhães *et al.* (2011). Leite *et al.* (2013) identificaram 0,93 mg/mL de ácido acético após 24 horas de produção e, ao final do armazenamento refrigerado de 28 dias, os teores aumentaram para 1,16 mg/L, próximo ao encontrado neste trabalho. A produção de ácido acético é 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).

Uma vez que não foram adicionadas às culturas iniciadoras utilizadas em nosso estudo nenhuma bactéria acética, o ácido acético presente nas bebidas produzidas com culturas iniciadoras provavelmente foi resultado do metabolismo heterolático da linhagem *Leuconostoc mesenteroides* (11U). Este micro-organismo foi isolado de grãos de kefir de leite de Viçosa/MG. No substrato água adicionada de açúcar mascavo, o micro-organismo pode não ter crescido e desempenhado sua atividade metabólica tão bem quanto no leite, por isso as concentrações de ácido acético foram inferiores.

Magalhães *et al.* (2010) verificaram após 24 horas de fermentação aumento da concentração de ácido acético de 0,08 para 1,12 mg/mL em kefir de água produzido com grãos de kefir. Laureys; Vuyst (2014) após 72 horas de fermentação verificaram aumento nas concentrações das bebidas fermentadas com grãos de kefir de 0,1 para 1,0 g/L. Estes valores foram superiores aos encontrados neste estudo, inclusive para a bebida controle (fermentada pelos grãos), na qual era esperado encontrar teores mais altos devido à presença de bactérias acéticas.

De modo geral, o acúmulo de ácidos orgânicos é importante, pois torna a bebida mais ácida e, portanto, inibe o desenvolvimento de microrganismos patogênicos. Além

do papel de biopreservação, esses ácidos influenciam também na produção de aroma e sabor que caracterizam o kefir (GÜZEL-SEYDIM *et al.*, 2000a; MAGALHÃES *et al.*, 2010; LEITE *et al.*, 2013). As diferenças nas concentrações de ácidos orgânicos e etanol está diretamente relacionado à produção, armazenamento, proporção de inóculos e tipos de microrganismos envolvidos (GRØNNEVIK *et al.*, 2011; GÜZEL-SEYDIM *et al.*, 2000; LEITE *et al.*, 2013; MAGALHÃES *et al.*, 2010).

7. CONCLUSÃO

Este trabalho demonstrou que a conservação de bactérias lácticas e leveduras isoladas de grãos de kefir por liofilização é promissora. A manutenção da viabilidade e da capacidade de crescimento foi dependente da linhagem e do agente crioprotetor utilizado no processo. A temperatura de armazenamento de 5 ± 2 °C foi mais eficiente na manutenção dos micro-organismos viáveis durante o período de 180 dias de estocagem.

Foi possível chegar a diferentes combinações dos micro-organismos mais resistentes ao processo de liofilização, compondo culturas iniciadoras que produziram bebidas fermentadas à base de leite com características similares ao kefir produzido com grãos de kefir de leite, baseado nos parâmetros microbiológicos (contagem de micro-organismos viáveis) e análises físico-químicas (pH, concentração de ácido láctico, acético e etanol). Estas bebidas atenderam aos padrões estabelecidos pela legislação brasileira que define o produto kefir de leite, durante a produção e armazenamento refrigerado de 28 dias. A adição de açúcar alterou os parâmetros físico-químicos e microbiológicos das bebidas à base de leite, correspondendo a um gasto desnecessário do ponto de vista industrial.

Para as bebidas à base de água açucarada produzidas com as culturas iniciadoras, notou-se diferenças dos parâmetros físico-químicos em relação aos valores apresentados para a bebida produzida com os grãos de kefir de água.

8. PERSPECTIVAS

Ainda é preciso aprimorar ou investigar novas possibilidades de se alcançar melhores resultados para preservação dos isolados dos grãos de kefir, seja por liofilização ou outros métodos de desidratação (*spray-drying*, por exemplo), ou através da microencapsulação dos micro-organismos com materiais que protejam as células do estresse resultante destes processos. Muitos parâmetros podem ser verificados como: outras formas de congelamento dos micro-organismos antes da liofilização, meios de crescimento enriquecidos com crioprotetores, meios de reidratação após processo de secagem, e uso combinado de agentes crioprotetores. Além disso, pode-se tentar a aplicação do método para as linhagens destinadas à formulação de culturas iniciadoras em conjunto.

Necessita-se realizar análise sensorial para averiguar a aceitação das bebidas à base de leite produzidas com as culturas iniciadoras e comparar os principais atributos com o kefir tradicionalmente produzidos com os grãos de kefir de leite (sabor, aroma).

Com relação às bebidas fermentadas à base de água com açúcar mascavo, é necessário buscar novas alternativas, por exemplo tentar novas combinações de culturas com outros microrganismos, com intuito de se produzir uma bebida similar àquela elaborada com os grãos. Segundo dados preliminares da análise transcriptômica de kefir produzido com grãos de kefir de Curitiba/PR (Diego Lisboa Rios, doutorando em Genética/ICB/UFMG, comunicação pessoal), a participação de *Oenococcus oeni* parece ser fundamental para a produção da bebida à base de água com açúcar mascavo. Desta maneira, novas formulações podem ser realizadas com adição deste microrganismo nas culturas iniciadoras.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABADIAS, M., TEIXIDO, N., USALL, J., BENABARRE, A., VIÑAS, I. **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.** 2014. 103 f. Dissertação (mestrado em Microbiologia). Universidade Federal de Minas Gerais, 2014.

AHMED, Z., WANG, Y., AHMAD, A., KHAN, ST., NISA, M., AHMAD, H., AFREEN, A. **Kefir and Health: A Contemporary Perspective.** *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 53, n. 5, p. 422–434, 2013.

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 Sci*, v. 76, p. 138–146, 2007.

ARYANA, K. J., OLSON, D. W. **A 100-Year Review: Yogurt and other cultured dairy products.** *Journal of Dairy Science*, v. 100, n. 12, p. 9987–10013, 2017. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030217310524>>.

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.

BENGOA, A. A., IRAPORDA, C., GARROTE, G.L., ABRAHAM, A.G. **Kefir microorganisms: their role in grain assembly and health properties of fermented milk.** *Journal of Applied Microbiology*, p. 0–2, 2018.

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

BESHKOVA, D. M., SIMOVA, E.D., SIMOV, Z.I., FRENGOVA, G.I., SPASOV, Z. N. **Pure cultures for making kefir.** *Food Microbiol*, v. 19, p. 537–544, 2002.

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

BOLLA, P. A., SERRADELL, M. A., URRAZA, P.J., ANTONI, G.L. **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, p. 15–22, 2010.

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.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, 18 de setembro de 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa Nº 46 de 23 de outubro de 2007.** *Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados*. Disponível em:
http://www.cidasc.sc.gov.br/html/servico_animal/Inspecao%20Animal/ORIENTA%207%D5ES%20SOBRE%20ROTULAGEM/LEITE%20E%20DERIVADOS/IN%2046_07_RTIQ%20leites%20fermentados.pdf. Acesso em: 30/11/2018.

BRIGITTE, R. **A Whole New Generation of Milk Kefir Grains Formed From Freeze-dried Starter Cultures A Fascinating Insight Into a Hidden World.** [Research Report] independent researcher, 2016.

BROADBENT, J. R.; LIN, C. **Effect of heat shock or cold shock treatment on the resistance of *Lactococcus lactis* to freezing and lyophilization.** *Cryobiology*, v. 39, n. 1, p. 88–102, 1999.

BUITINK, J., VAN DEN DRIES, I.J., HOEKSTRA, F.A., ALBERDA, M., HEMMINGA, M.A. **High critical temperature above T_g may contribute to the stability of biological systems.** *Biophys J*, v. 79, p. 1119–1128, 2000.

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., SILVA, J., HO, P., TEIXEIRA, P., MALCATA, F. X., GIBBS, P. **Effect of various growth media upon survival during storage of freeze-dried *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus durans*.** *Journal of Applied Microbiology*, 94, p. 947–952, 2003.

CARVALHO, A.S., SILVA, J., HO, P., TEIXEIRA, P., MALCATA, F.X., GIBBS, P. **Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria.** *International Dairy Journal*. 14, 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, L. **A Laiteria lança o 1º kefir no Brasil com apoio da GlobalFood.** Disponível: <http://grupomaisfood.com.br/mais_leite/a-leiteria-lanca-1o-kefir-no-brasil-com-apoio-da-globalfood/>. Acesso em: 18/01/2019.

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 Animal Sciences*, v. 19, n. 1, p. 126–130, 2006.

CHEN, T., WANG, S.Y., CHEN K.N., LIU, J.R. **Microbiological and chemical properties of kefir manufactured by entrapped microorganisms isolated from kefir grains.** *Journal of Dairy Science*, v. 92, n. 7, p. 3002–3013, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2008-1669>>. Acesso em: 15/12/2018.

CHEIRSILP, B., SHIMIZU, H., SHIOYA, S. **Kinetic modeling of kefir production in mixed culture of *Lactobacillus kefirifaciens* and *Saccharomyces cerevisiae*.** *Process Biochemistry*, v. 42, n. 4, p. 570-579, 2007.

CHIFIRIUC, M. C., CIOACA, A. B., LAZAR, V. **In vitro assay of the antimicrobial activity of kefir against bacterial and fungal strains.** *Anaerobe*, v. 17, n. 6, p. 433-435, 2011.

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

COLLAR, C. **Review: Biochemical and technological assessment of the metabolism of pure and mixed cultures of yeast and lactic acid bacteria in breadmaking applications.** *Food Science and Technology International*, v. 2, p. 349-367, 1996.

COSTA, E., USALL, J., TEIXIDO, N., GARCIA, N., VINAS, I. **Effect of protective agents, rehydration media and initial cell concentration on viability of *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 subjected to freeze drying.** *Journal of Applied Microbiology*, v. 89, p. 793–800, 2000.

COSTA, E, USALL, J., TEIXIDÓ, N., TORRES, R., VIÑAS, I. **Effect of package and storage conditions on viability and efficacy of the freeze-dried biocontrol agent *Pantoea agglomerans* strain CPA-2.** *Journal of Applied Microbiology*, v. 92, n. 5, p. 873–878, 2002.

COULIBALY, I., AMENAN, A., LOGNAY, G., FAUCONNIER, M., THONART, P. **Survival of freeze-dried *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum* related to their cellular fatty acids composition during storage.** *Applied Biochemistry Biotechnology*, v. 157, n. 1, p. 70–84, 2009.

D'ANGELO, L. CICOTELLO, J., ZAGO, M., GUGLIELMOTTI, D., QUIBERONI, A., SUAREZ, V. ***Leuconostoc* strains isolated from dairy products: Response against food stress conditions.** *Food Microbiology*, v. 66, p. 28–39, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2017.04.001>>. Acesso em: 05/01/2019.

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.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. WHO - World Health Organization. **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic and bacteria.** Cordoba, 2018.

FARNWORTH, E. R.; MAINVILLE, I. **Kefir: a fermented milk product.** In: **Farnworth ER (ed) Handbook of fermented functional foods.** CRC Press, Boca Raton, p. 78–111, 2003.

FARNWORTH, E. R. **Health benefits of oligosaccharides.** *Journal of Nutraceuticals, Functional and Medical Foods*, v. 1, p. 43–55, 1999.

FARNWORTH, E. R. **Kefir—A Complex Probiotic.** *Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods*, v. 2, p. 1-17, 2005.

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

FERNÁNDEZ-GARCÍA, E., MCGREGOR, J.U. **Determination of organic acids during the fermentation and cold storage of plain yogurt.** *Journal Dairy Science*, v. 77, p. 2934–2939, 1994.

FIORDA, F. A., PEREIRA, G. V. M., THOMAZ-SOCCOL, V., RAKSHIT, S. K., PAGNONCELLI, M. G. B., VANDENBERGHE, L. P. S., SOCCOL, C. R. **Microbiological, biochemical, and functional aspects of sugary kefir fermentation - A review.** *Food Microbiology*, v. 66, p. 86-95, 2017.

FOERST, P.; SANTIVARANGKNA, C. **Advances in starter culture technology: focus on drying processes.** In: **Advances in fermented foods and beverages.** Woodhead Publishing, 2017. p. 249-270.

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

GAO, X.; LI, B. **Chemical and microbiological characteristics of kefir grains and their fermented dairy products: a review.** *Cogent Food & Agriculture*, v. 2, n. 1, p. 1–10, 2016. Disponível em: <<https://www.cogentoa.com/article/10.1080/23311932.2016.1272152>>. Acesso em: 11/01/2019.

GAROFALO, C. OSIMANI, A., MILANOVIĆ, V., AQUILANTI, L., DE FILIPPIS, F., STELLATO, G., DI MAURO, S., TURCHETTI, B., BUZZINI, P., ERCOLINI, D., CLEMENTI, F. **Bacteria and yeast microbiota in milk kefir grains from different Italian regions.** *Food Microbiology*, v. 49, p. 123–133, 2015.

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.

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

GONG, P., ZHANG, L., HAN, X., SHIGWEDHA, N., SONG, W., YI, H., DU, M., CAO, C. **Injury mechanisms of lactic acid bacteria starter cultures during spray drying: A review.** *Drying Technology*, v. 32, n. 7, p. 793-800, 2014.

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. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.01.001>>. Acesso em: 18/01/2019.

GUL, O., MORTAS, M., ATALAR, I., DERVISOGLU, M., KAHYAOGU, T. **Manufacture and characterization of kefir made from cow and buffalo milk, using kefir grain and starter culture.** *Journal of dairy science*, v. 98, n. 3, p. 1517-1525, 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030215000120>>. Acesso em: 18/01/2019.

GULITZ, A., STADIE, J., WENNING, M., EHRMANN, M.A., VOGEL, R.F. **The microbial diversity of water kefir.** *International Journal of Food Microbiology*, v. 151, p. 284–288, 2011.

GUZEL-SEYDIM, Z. B., SEYDIM, A. C., GREENE, A. K. **Organic Acids and Volatile Flavor Components Evolved During Refrigerated Storage of Kefir.** *Journal of Dairy Science*, v. 83, n. 2, p. 275–277, 2000a. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030200748740>>. Acesso em: 11/01/2019.

GÜZEL-SEYDIM, Z. B., SEYDIM, A.C., GREENE, A.K., BODINEA, A.B. **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, 2000b.

GUZEL-SEYDIM, Z. B., KOK-TAS, T., GREENE, A.K., SEYDIM, A.C. **Review: Functional properties of kefir.** *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 51, n. 3, p. 261–268, 2011.

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

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.

HERTZLER, S. R., CLANCY, S. M. SHANNON M. **Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion.** *Journal of the American Dietetic Association*, v. 103, n. 5, p. 582-587, 2003.

HUANG, S., VIGNOLLES, M. L., CHEN, X. D., LE LOIR, Y., JAN, G., SCHUCK, P., JEANTET, R. **Spray drying of probiotics and other food-grade bacteria: A review.** *Trends in Food Science & Technology*, v. 63, p. 1-17, 2017.

HUANG, Y., WU, F., WANG, X., SUI, Y., YANG, L., WANG, J. **Characterization of *Lactobacillus plantarum* Lp27 isolated from Tibetan kefir grains: a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects.** *Journal of Dairy Science*, v. 96, n. 5, p. 2816-2825, 2013.

HUBALEK, Z. **Protectants used in the cryopreservation of microorganisms.** *Cryobiology*, v. 46, p. 205-229, 2003.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos Químicos e Físicos para análise de Alimentos.** 4 Ed.[S.l: s.n.], 2005.

IRIGOYEN, A. ORTIGOSA M., TORRE P., IBANEZ F.C. **Influence of different technological parameters in the evolution of pH during fermentation of kefir.** *Milchwissenschaft*, v. 58, n. 11-12, p. 631-633, 2003.

JOHN, S. M., DEESEENTHUM, S. **Properties and benefits of kefir- A review.** *Songklanakarin Journal of Science & Technology*, v. 37, n. 3. p. 275-282, 2015.

KAKISU, E., IRIGOYEN, A., TORRE, P., ANTONI, G. L., ABRAHAM, A. G. **Physicochemical, microbiological and sensory profiles of fermented milk containing probiotic strains isolated from kefir.** *Journal of Dairy Research*, v. 78, n. 4, p. 456-463, 2011.

KIM, D. H., JEONG, D., KWANG-YOUNG, S., KUN-HO, S. **Comparison of traditional and backslopping methods for kefir fermentation based on physicochemical and microbiological characteristics.** *Short Communication LWT - Food Science and Technology*, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.07.023>>. Acesso em: 12/01/2019.

KÖK TAŞ, T. **Effect of storage parameters on freeze-dried kefir grains.** *International Journal of Dairy Technology*, v. 68, n. 3, p. 434-440. 2015.

KOLAKOWSKI P, OZIMKIEWICZ M. **Restoration of kefir grains subjected to different treatments.** *International Journal Dairy Technology*, v. 65, n. 1, p. 140-145, 2012.

KOURKOUTAS, Y.; SIPSAS, V.; PAPAVALIIOU, G.; KOUTINAS, A. A. **An economic evaluation of freeze-dried kefir starter culture production using whey.** *Journal of Dairy Science*, v. 90, n. 5, p. 2175-2180, 2007.

LAUREYS, D.; VUYST, L. DE. **Kinetics of Water Kefir Fermentation.** *Applied and Environmental Microbiology*, v. 80, n. 8, p. 2564-2572, 2014.

LEBLANC, A. D. M., MATAR, C., FARNWORTH, E., PERDIGON, G. **Study of immune cells involved in the antitumor effect of kefir in a murine breast cancer model.** *Journal of dairy science*, v. 90, n. 4, p. 1920-1928, 2007.

LEITE, A. M. O., LEITE, D. C., DEL AGUILA, E. M., ALVARES, T. T., PEIXOTO, R. S., MIGUEL, M. A., SILVA, J. T., PASCHOALIN, V. M. **Microbiological and chemical characteristics of Brazilian kefir during fermentation and storage processes.** *Journal of Dairy Science*, v. 96, n. 7, p. 4149–4159, 2013. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002203021300307X>>. Acesso em: 11/01/2019.

LEITE, A. M. O., MAYO, B., RACHID, C. T. C. C., PEIXOTO, R. S., SILVA, J. T., PASCHOALIN, V. M. F., DELGADO, S. **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.

LESLIE, S. B., ISRAELI, E., LIGHTHART, B., CROWE, J. H., CROWE, L. M. **Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying.** *Applied and Environmental Microbiology*, v. 61, n. 10, p. 3592–3597, 1995.

LI, B., TIAN, F., LIU, X., ZHAO, J., ZHANG, H., CHEN, W. **Effects of cryoprotectants on viability of *Lactobacillus reuteri* CICC 6226.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 92, p. 609-616. 2011.

LI, B., TIAN, S. P. **Effect of intracellular trehalose in *Cryptococcus laurentii* and exogenous lyoprotectants on its viability and biocontrol efficacy on *Penicillium expansum* in apple fruit.** *Letter in Applied Microbiology*, v. 44, p. 437–442, 2007.

LIAN, W. C., HSIAO, H. C., CHOU, C. C. **Survival of bifidobacteria after spray-drying.** *International Journal of Food Microbiology*, v. 74, n. 1-2, p. 79–86, 2002.

MAGALHÃES, K. T., PEREIRA, G. V. M., DIAS, D. R., SCHWAN, R. F. **Microbial communities and chemical changes during fermentation of sugary Brazilian kefir.** *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 26, n. 7, p. 1241–1250, 2010.

MAGALHÃES, K. T., PEREIRA, G. V. M., CAMPOS, R., DRAGONE, G., SHWAN, R. F. **Brazilian kefir: structure, microbial communities and chemical composition.** *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 42, n. 2, p. 693–702, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822011000200034&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 12/01/2019.

MARSH, A. J., O'SULLIVAN, O., HILL, C., ROSS, R. P., COTTER P. D. **Sequence-based analysis of the microbial composition of water kefir from multiple sources.** *FEMS Microbiology Letter*, v. 348, p. 79–85, 2013.

MARTINS, F. S., BARBOSA, F. H. F., CARA, D. C., ROSA, C. A., PENNA, F. J., NEVES, M. J., NICOLI, J. R. **Efeito do método de conservação na viabilidade, reativação, colonização intestinal e efeito imunomodulador de dois produtos probióticos contendo *Saccharomyces boulardii* ou *Saccharomyces cerevisiae*.** *Higiene Alimentar*, v. 21, p. 460-461, 2007.

MENG, X. C., STANTON, G. F., DALY, C. ROSS, R. P. **Anhydrobiotics: The challenges of drying probiotic cultures.** *Food Chemistry*, v. 106, n. 4, p. 1406-1416, 2008.

MERYMAN, H. T. **Freezing injury and its prevention in living cells,** *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*, v. 3, p. 341-363, 1974.

MIYAMOTO-SHINOHARA, Y., IMAIZUMI, T., SUKENOBE, J., MURAKAMI, Y., KAWAMURA, S., KOMATS, Y. **Survival rate of microbes after freeze-drying and long-term storage.** *Cryobiology*, v. 41, n. 3, p. 251–255, 2000.

MIYAMOTO-SHINOHARA, Y., SUKENOBE, J., IMAIZUMI, T., NAKAHARA, T. **Survival curves for microbial species stored by freeze-drying.** *Cryobiology*, v. 52, n. 1, p. 27–32, 2006.

MIYAMOTO-SHINOHARA Y, SUKENOBE J, IMAIZUMI T, NAKAHARA T. **Survival of freeze-dried bacteria.** *The Journal of General and Applied Microbiology*, v. 54, p. 9–24, 2008.

MIYAMOTO-SHINOHARA, Y., NOZAWA, F., SUKENOBE, J., IMAIZUMI, T. **Survival of yeasts stored after freeze-drying or liquid-drying.** *The Journal of General and Applied Microbiology*, v. 56, n. 2, p. 107–119, 2010. Disponível em: <<http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/jgam/56.107?from=CrossRef>>. Acesso em: 20/01/2019.

MORGAN, C. A., HERMAN, N., WHITE, P. A., VERSEY, G. **Preservation of microorganisms by drying; A review.** *Journal of Microbiological Methods*, v. 66, n. 2, p. 183–193, 2006.

MOTAGHI, M., MAZAHARI, M., MOAZAMI, N., FARKHONDEH, A., FOOLADI, M., AND GOLTAPPEH, E. **Kefir production in Iran.** *World Journal Microbiology Biotechnology*, v. 13, p. 579–581, 1997.

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.

NAGHILI, H., TAJIK, H., RAZAVI-ROUHANI, S. M., EHSANI, A., ZARE, P. **Validation of drop plate technique for bacterial enumeration by parametric and nonparametric tests.** *Veterinary Research Forum*, v. 4, n. 3, p. 179–183, 2013.

NAMBOU, K., GAO, C., ZHOU, F., GUO, B., AI, L., ZHENG-JUN, W. **A novel approach of direct formulation of defined starter cultures for different kefir-like beverage production.** *International Dairy Journal*, v. 34, n. 2, p. 237–246, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.03.012>>. Acesso em: 18/01/2019.

NAMI, Y., HAGHSHENAS, B., BAKHSAYESH, R. V., MOHAMMADZADEH, J., LOTFI, H., ESLAMI, S., HEJAZI, M. A. **Novel autochthonous lactobacilli with probiotic aptitudes as a main starter culture for probiotic fermented milk.** *Lwt*, v.

98, p. 85–93, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.08.035>>. Acesso em: 18/01/2019.

NIELSEN, B.; GÜRAKAN, G. C.; ÜNLÜ, G. **Kefir: A Multifaceted Fermented Dairy Product**. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, v. 6, n. 3–4, p. 123–135, 2014.

NYANGA, L. K., NOUT, M. J. R., SMID, E. J., BOEKHOUT, T., ZWIETERING, M. H. **Yeasts preservation: Alternatives for lyophilisation**. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 28, n. 11, p. 3239–3244, 2012.

ONER, Z., KARAHAN, A. G., ÇAKMAKÇI, M. L. **Effects of different milk types and starter cultures on kefir**. *Gıda*, v. 35, n. 3, p. 177–182, 2010.

OTLES, S., CAGINDI, O. **Kefir: A Probiotic Dairy-Composition, Nutritional and Therapeutic Aspects**. *Pakistan Journal of Nutrition*, v. 2, n. 2, p. 54–59, 2003. Disponível em: <<http://www.scialert.net/abstract/?doi=pjn.2003.54.59>>. Acesso: 10/01/2019.

PALMFELDT, J., HAHN-HÄGERDAL, B. **Influence of culture pH on survival of *Lactobacillus reuteri* subjected to freeze-drying**. *International Journal of Food Microbiology*, v. 55, n. 1-3, p. 235–238, 2000.

PAPAVASILIOU, G., KOURKOUTAS, Y., RAPTI, A., SIPSAS, V., SOUPIONI, M., KOUTINAS, A. A. **Production of freeze-dried kefir culture using whey**. *International Dairy Journal*, v. 18, n. 3, p. 247–254, 2008.

POLO, L., MAÑES-LÁZARO, R., OLMEDA, I., CRUZ-PIO, L., MEDINA, A., FERRER S., PARDO, I. **Influence of freezing temperatures prior to freeze-drying on viability of yeasts and lactic acid bacteria isolated from wine**. *Journal Applied Microbiology*, v. 122, p. 1603–1614, 2017.

PONOMAROVA, O., GABRIELLI, N., SÉVIN, D. C., MULLEDER, M. **Yeast creates a niche for symbiotic lactic acid bacteria through nitrogen overflow**. *Cell systems*, v. 5, n. 4, p. 345–357, 2017.

PRADO, M. R., BLANDÓN, L. M., VANDENBERGHE, L. P., RODRIGUES, C., CASTRO, G. R., THOMAZ-SOCCOL, V., SOCCOL, C. R. **Milk kefir: Composition, microbial cultures, biological activities, and related products**. *Frontiers in Microbiology*, v. 6, n. OCT, p. 1–10, 2015.

RAPOPORT, A., GOLOVINA, E. A., GERVAIS, P., DUPONT, S., BENEY, L. **Anhydrobiosis: Inside yeast cells**. *Biotechnology Advances*, v. 37, n.1, September 2018, p. 51–67, 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975018301794>>. Acesso em: 17/01/2019.

RATTRAY, F. P.; O'CONNEL, M.G. **Microbial Aspects of Kefir Grains and Kefir**. *Elsevier*, p. 518–524, 2011.

ROSA, D. D., DIAS, M. M. S., GRZESKOWIAK, L. M., REIS, S. A., CONCEIÇÃO, L. L., PELUZIO, M. D. C. G. **Milk kefir: Nutritional, microbiological and health benefits.** *Nutrition Research Reviews*, v. 30, n. 1, p. 82–96, 2017.

RUDOLPH, A.S; CROWE, J.H. **Membrane stabilization during freezing: the role of two natural cryoprotectants, trehalose and proline.** *Cryobiology*, v. 22, n. 4, p. 367–377, 1985.

SALOTRA, P., SINGH, D. K., SEAL, K. P., JAFFE, H., BHATNAGAR, R. **Expression of DnaK and GroEL homologs in *Leuconostoc esenteroides* in response to heat shock, cold shock or chemical stress.** *FEMS Microbiology Letters*, v. 131, n. 1, p. 57–62, 1995.

SANDERS, J. W., VENEMA, G., KOK, J. **Environmental stress responses in *Lactococcus lactis*.** *FEMS Microbiology Reviews*, v. 23, n. 4, p. 483-501, 1991.

SANTOS, A., SAN MAURO, M., SANCHEZ, A., TORRES, J. M., MARQUINA, D. **The antimicrobial properties of different strains of *Lactobacillus* spp. isolated from kefir.** *Systematic and Applied Microbiology*, v. 26, n. 3, p. 434-437, 2003.

SARLAK, T., MOSLEHISHAD, M., AKBARI-ADERGANI, B., SALAMI, M. **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.

SILVA, N., JUNQUEIRA, V. C. A., SILVEIRA, N. F. A., TANIWAKI, M. H., GOMES, R. A. R., OKAZAKI, M. M. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos.** Valéria Christina Amstalden - São Paulo: Livraria Varela, 1997.

SIMOVA, E., BESHKOVA, D., ANGELOV, A., HRISTOZOVA, TS., FRENGOVA, G., SPASOV, Z. **Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them.** *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 28, n.1, p. 1–6, 2002.

SMITH, D. **Culture collections.** In: *Advances in applied microbiology*. Academic Press, p. 73-118, 2012.

SPADARO, D., CIAVORELLA, A. A., LOPEZ-ROYES, J. G., GARIBALDI, A., GULLINO, M. L. **Effect of culture age, protectants, and initial cell concentration on viability of freeze-dried cells of *Metschnikowia pulcherrima*.** *Canadian Journal of Microbiology*, v. 56, n. 10, p. 809–815, 2010. Disponível em: <<http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/W10-068>>.

STEFANELLO, R. F., MACHADO, A. A. R., PASQUALIN CAVALHEIRO, C., BARTHOLOMEI SANTOS, M. L., NABESHIMA, E. H., COPETTI, M. V., FRIES, L. L. M. **Trehalose as a cryoprotectant in freeze-dried wheat sourdough production.** *LWT - Food Science and Technolgy*, v. 89, p. 510–517, 2018.

STRASSER, S., NEUREITER, M., GEPPL, M., BRAUN, R., DANNER, H. **Influence of lyophilization, fluidized bed drying, addition of protectants, and storage on the**

viability of lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, v. 107, n.1, p.167-177, 2008.

STREETER, J.G. Effect of trehalose on survival of *Bradyrhizobium japonicum* during desiccation. *Journal of Applied Microbiology* v. 95, p. 484–491, 2003.

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

TAMIME, A. Y. Fermented milks: a historical food with modern applications — a review. *European Journal of Clinical Nutrition*, v.56, p. 2–15, 2002.

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

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. 135f. Tese (Doutorado em Microbiologia), Universidade Federal de Minas Gerais, 2016.

VINDEROLA, G., PERDIGON, G., DUARTE, J., THANGAVEL, D., FARNWORTH, E., MATAR, C. Effects of kefir fractions on innate immunity. *Immunobiology*, v. 211, n. 3, p. 149-156, 2006.

WANG S. Y., CHEN K. N., LO Y. M., CHIANG M. L., CHEN H. C., LIU J. R., CHEN, M. J. Investigation of microorganisms involved in biosynthesis of the kefir grain. *Food Microbiology*. v.32, n. 2, p. 274–285, 2012.

WANG, L., ZHONG, H., LIU, K., GUO, A., QI, X., CAI, M. The evaluation of kefir pure culture starter: Liquid-core capsule entrapping microorganisms isolated from kefir grains. *Food Science and Technology International*, v. 22, n. 7, p. 598–608, 2016.

WITTHUHN, R. C.; CILLIERS, A.; BRITZ, T. J. Evaluation of different preservation techniques on the storage potential of Kefir grains. *Journal of Dairy Research*, v. 72, n. 1, p. 125–128, 2005.

XU, D., FELLS, L., WEFERS, D., BEHR, J., JAKOB, F. *Lactobacillus hordei* dextrans induce *Saccharomyces cerevisiae* aggregation and network formation on hydrophilic surfaces. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 115, p. 236-242, 2018.

ZANIRATI, D. F., ABATEMARCO, M. JR., SANDES, S. H. C., NICOLI, J. R., NEUMANN, E. Selection of lactic acid bacteria from Brazilian kefir grains for potential use as starter or probiotic cultures. *Anaerobe*, v. 32, n. December, p. 70–76, 2015.

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.

ZIADI, M., TOUHAMI, Y., ACHOUR, M., THONART, P., HAMDI, M. **The effect of heat stress on freeze-drying and conservation of *Lactococcus***. *Biochemical Engineering Journal*, **24**, p. 141–145, 2005.

ZILIOLI, E. **Composição química e propriedades funcionais no processamento de vinagres**. 2011. 98f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, 2011.

10. APÊNDICES

Apêndice A – Resultados de viabilidade (log UFC/mL) dos micro-organismos isolados de grãos de kefir antes e após a liofilização e durante armazenamento.

Tabela 15 - Viabilidade (log UFC/mL) de *Lactococcus lactis* (4U) liofilizado em diferentes crioprotetores durante armazenamento (25 ± 2 °C e 5 ± 2 °C). Média de dois experimentos realizados em tempos diferentes.

4U	SAL	SAC	TREA	SKM
T15 25°C	3,89	4,14	5,28	3,70
T45 25°C	4,07	3,33	3,15	3,77
T90 25°C	3,00	3,25	3,15	3,42
T180 25°C	2,00	2,00	2,00	2,05
T15 5°C	6,01	7,84	7,36	6,19
T45 5°C	3,96	6,25	4,21	5,65
T90 5°C	3,15	4,41	3,45	4,07
T180 5°C	2,80	4,81	4,34	3,88

Tabela 16 - Viabilidade (log UFC/mL) de *Leuconostoc mesenteroides* (11U) liofilizado em diferentes crioprotetores durante armazenamento (25 ± 2 °C e 5 ± 2 °C). Média de dois experimentos realizados em tempos diferentes.

11U	SAL	SAC	TREA	SKM
T15 25°C	4,34	6,76	8,53	8,49
T45 25°C	4,07	7,13	8,78	9,00
T90 25°C	3,00	3,86	7,84	8,50
T180 25°C	2,60	2,69	4,54	4,99
T15 5°C	5,81	7,57	9,09	8,91
T45 5°C	4,88	7,87	9,09	9,12
T90 5°C	3,00	7,36	8,21	7,48
T180 5°C	2,83	6,30	7,05	5,54

Tabela 17 - Viabilidade (log UFC/mL) de *Leuconostoc mesenteroides* (11U2) liofilizado em diferentes crioprotetores durante armazenamento (25 ± 2 °C e 5 ± 2 °C). Média de dois experimentos realizados em tempos diferentes.

11U2*	SAL	SAC	TREA	SKM
T15 25°C	5,64	5,08	8,96	9,36
T45 25°C	5,82	4,94	7,73	9,16
T90 25°C	4,42	3,88	8,06	7,91
T180 25°C	3,00	4,99	7,97	8,24
T15 5°C	8,26	8,64	9,40	8,92
T45 5°C	7,07	8,87	8,50	8,43
T90 5°C	5,73	7,17	6,12	8,07
T180 5°C	4,12	7,33	7,12	7,96

Tabela 18 - Viabilidade (log UFC/mL) de *Leuconostoc mesenteroides* (12U2) liofilizado em diferentes crioprotetores durante armazenamento (25 ± 2 °C e 5 ± 2 °C). Média de dois experimentos realizados em tempos diferentes.

12U2*	SAL	SAC	TREA	SKM
T15 25°C	5,89	6,25	7,91	9,00
T45 25°C	5,50	4,22	4,14	8,32
T90 25°C	4,04	5,44	7,38	8,72
T180 25°C	3,11	3,54	7,48	7,40
T15 5°C	7,65	8,17	8,65	8,29
T45 5°C	6,45	7,26	8,61	8,69
T90 5°C	6,83	6,95	8,16	8,37
T180 5°C	5,78	5,32	6,92	7,20

Tabela 19 - Viabilidade (log UFC/mL) de *Saccharomyces cerevisiae* (7M) liofilizado em diferentes crioprotetores durante armazenamento (25 ± 2 °C e 5 ± 2 °C). Média de dois experimentos realizados em tempos diferentes.

7M	SAL	SAC	TREA	SKM
T15 25°C	3,50	3,50	5,27	3,50
T45 25°C	2,94	2,50	4,69	3,06
T90 25°C	2,50	3,38	4,80	2,65
T180 25°C	2,33	2,50	3,37	2,77
T15 5°C	3,95	4,64	6,41	5,73
T45 5°C	2,65	4,38	6,47	4,32
T90 5°C	2,50	4,37	5,91	4,17
T180 5°C	2,15	4,51	6,19	3,99

Tabela 20 - Viabilidade (log UFC/mL) de *Saccharomyces cerevisiae* (6M) liofilizado em diferentes crioprotetores durante armazenamento (25 ± 2 °C e 5 ± 2 °C). Média de dois experimentos realizados em tempos diferentes.

6M	SAL	SAC	TREA	SKM
T15 25°C	4,39	5,10	5,76	4,24
T45 25°C	3,15	3,61	4,40	4,18
T90 25°C	2,74	2,74	5,72	3,00
T180 25°C	2,92	2,00	4,50	2,00
T15 5°C	5,11	6,36	6,91	5,50
T45 5°C	3,32	5,95	5,73	5,81
T90 5°C	3,41	5,57	5,19	5,12
T180 5°C	2,24	5,76	4,61	4,75

Tabela 21 - Viabilidade (log UFC/mL) de *Saccharomyces cerevisiae* (2M) liofilizado em diferentes crioprotetores durante armazenamento (25 ± 2 °C e 5 ± 2 °C). Resultados de um único experimento.

2M	SAL	SAC	TREA	SKM
T15 25°C	3,24	5,99	5,26	4,00
T45 25°C	2,00	3,00	4,77	4,24
T90 25°C	2,00	2,00	5,86	3,00
T180 25°C	2,00	2,00	3,58	2,00
T15 5°C	4,70	3,98	3,65	4,30
T45 5°C	3,04	4,77	5,29	5,51
T90 5°C	2,90	4,69	4,18	3,30
T180 5°C	3,00	5,21	3,00	2,30

Tabela 22 - Viabilidade (log UFC/mL) de *Saccharomyces unisporus* (5M) liofilizado em diferentes crioprotetores durante armazenamento (25 ± 2 °C e 5 ± 2 °C). Média de dois experimentos realizados em tempos diferentes.

5M	SAL	SAC	TREA	SKM
T15 25°C	4,00	4,37	4,30	4,74
T45 25°C	2,50	2,50	4,83	2,50
T90 25°C	2,50	2,50	4,07	3,09
T180 25°C	2,00	2,15	2,50	2,00
T15 5°C	4,09	4,24	5,87	5,45
T45 5°C	4,23	5,70	4,74	5,79
T90 5°C	3,38	5,30	3,88	4,95
T180 5°C	2,80	4,70	4,28	2,54

Tabela 23 - Viabilidade (log UFC/mL) de *Lachancea fermentati* (9S) liofilizado em diferentes crioprotetores durante armazenamento (25 ± 2 °C e 5 ± 2 °C). Média de dois experimentos realizados em tempos diferentes.

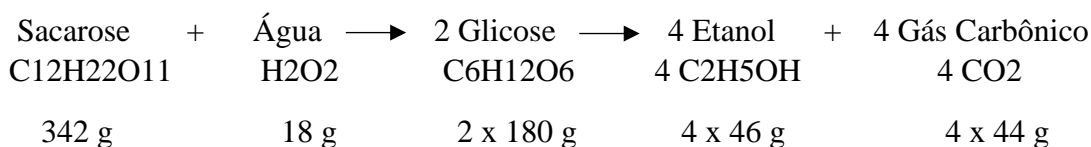
9S	SAL	SAC	TREA	SKM
T15 25°C	3,50	4,42	5,61	3,65
T45 25°C	3,05	3,31	3,95	3,60
T90 25°C	2,65	3,20	4,01	3,09
T180 25°C	2,00	2,00	3,10	2,50
T15 5°C	3,50	4,50	6,11	5,60
T45 5°C	2,65	3,73	5,69	4,70
T90 5°C	2,50	3,54	5,26	4,35
T180 5°C	2,10	4,10	5,86	3,88

Apêndice B – Cálculo da quantidade de sacarose utilizada na produção das bebidas

(CARNEIRO, 2010)

A fim de assegurar uma produção de etanol nas amostras e verificar capacidade de estímulo do crescimento de leveduras, uma quantidade específica de sacarose foi adicionada ao leite durante a produção das bebidas fermentadas. A sacarose foi escolhida por ser um açúcar metabolizado pela maioria das leveduras. A proporção de sacarose adicionada foi calculada com base na estequiometria de reação de fermentação alcoólica, visando a obtenção de um teor de etanol em torno de 1,5% (v/m), considerando diretrizes estabelecidas pela IN 46 (BRASIL, 2007).

Reação global da fermentação alcoólica (Reação de Gay-Lussac):



Então: 342 g de sacarose ----- 184 g de etanol

x ----- 15 g de etanol

x = 27,88 g de sacarose para 1,0 L de kefir

No entanto, este é o rendimento teórico de etanol que não é real, já que parte deste açúcar metabolizado é utilizado na produção de outros compostos durante a fermentação crescimento da levedura. Todavia, Pasteur considera o valor teórico de 90%, que foi adotado para estes cálculos.

Sendo assim,

$$x = 31,0 \text{ g/L}$$

A sacarose foi adicionada durante preparo do leite integral reconstituído 10% m/v e a mistura foi autoclavada, 121 °C / 15 minutos.