

**INSTITUTO FEDERAL CATARINENSE – *CAMPUS* ARAQUARI**

**EMANUELLE DIAS, GABRIEL TOMKO, HENRIKY GUILHERME DE  
LIMA VICENTE, SARA STAHUKE DE CAMPOS, VINÍCIUS PETERS  
RUIZ**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE FERMENTAÇÃO DA  
CEPA DE KEFIR**

**ARAQUARI/SC**

**2019**

**EMANUELLE DIAS, GABRIEL TOMKO, HENRIKY GUILHERME DE  
LIMA VICENTE, SARA STAHUKE DE CAMPOS, VINÍCIUS PETERS  
RUIZ**

## **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE FERMENTAÇÃO DE DIFERENTES CEPAS DE KEFIR**

Trabalho de Qualificação do Projeto de Iniciação Científica Integrada (PIC-QUIMI) apresentado ao Instituto Federal Catarinense – Campus Araquari como parte complementar à matriz curricular do Curso Técnico em Química Integrado ao Ensino Médio.

Orientador: Cristiane Tagliari.

Colaboradores: Elder Mantovani Lopes, Paula Vergara.

## ARAQUARI/SC 2019

### RESUMO

Kefir é um leite fermentado produzido através de uma colônia de microrganismos simbióticos que possui propriedades terapêuticas diversas, como auxiliar na prevenção e proteção contra doenças crônicas não-degenerativas ou contra infecções, além de apresentar efeito probiótico, atuando como complemento alimentar por conta dos micro-organismos vivos que beneficiam a saúde do hospedeiro. A matriz do Kefir é formada por uma variedade de associações bactéria-levedura que resultam em uma bebida bastante rica nutricionalmente, na qual geralmente são encontradas bactérias ácido-láticas (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*), bactérias ácido acéticas (*Acetobacter*) e leveduras. Entretanto, a composição do Kefir varia conforme a metodologia de produção, a microbiota e a fonte a ser fermentada. A presente proposta teve como objetivo de analisar os perfis de fermentação da colônia de Kefir obtida através de doação, em Barra Velha – SC. O inóculo foi incubado em leite bovino UHT (*ultra high temperature*) e fermentado em estufa (25 °C) por períodos de 27 h (com amostras sendo coletadas a cada 3 h). Para cada amostra foram determinados os parâmetros de pH, crescimento da biomassa (gramas), acidez titulável (concentração em g/L) e teor de açúcares redutores (mg/ml). Esses parâmetros possibilitaram caracterizar e estabelecer condições adequadas para o processo fermentativo para o grão de Kefir. A partir dos resultados, foi possível observar a relação proporcional entre acidez titulável e biomassa, e inversamente proporcional ao pH e açúcares redutores, de acordo com o esperado.

Palavras-chave: Kefir, probiótico, fermentação, microrganismos.

**ABSTRACT:**

Kefir is a fermented milk produced through symbiotic microorganisms colony, that has several therapeutic properties, such as helping with the prevention and protection against chronic nondegenerative diseases or infections, besides presenting probiotic effects, acts as food supplement due to the microorganisms that benefits host's health. The Kefir basis is formed by a wide variety of yeast-bacterium associations that generate a nutritionally rich beverage, in which acid-lactic bacteria (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*), acetic acid bacteria (*Acetobacter*) and yeast are generally found. However, the Kefir composition depends on the production methodology, the microbiota and the precursor source for the fermentation. The main goal of this project was to analyze the fermentation profiles from a Kefir colony that was obtained by donation, from Barra Velha-SC. The inoculum was incubated in sterilized milk and then fermented in an oven (25°C) for periods of 27h (with samples collected and analyzed every 3h). Each sample had the following parameters analyzed: pH, biomass growth, titratable acidity and reducing sugar content. These parameters were used to characterize and establish proper conditions for fermenting Kefir. From the results, it was possible to observe the proportional relation between titratable acidity and biomass, and inversely proportional to pH and reducing sugar content, in comparison to what was expected.

Keywords: Kefir, probiotic, fermentation, microorganisms.

## SUMÁRIO

<b>1 TEMA</b> .....	<b>5</b>
<b>1.1 Delimitação do Tema</b> .....	<b>5</b>
<b>2 OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>6</b>
<b>2.1 Objetivos Específicos</b> .....	<b>6</b>
<b>3 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>7</b>
<b>4 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	<b>8</b>
<b>4.1 Kefir</b> .....	<b>8</b>
<b>4.1.1 Propriedades Físico-Químicas</b> .....	<b>8</b>
<b>4.1.2 Efeitos Probióticos</b> .....	<b>10</b>
<b>4.2 Fermentação Láctica</b> .....	<b>11</b>
<b>5 METODOLOGIA</b> .....	<b>12</b>
<b>5.1 Amostras e preparo do inóculo</b> .....	<b>12</b>
<b>5.2 Processo fermentativo</b> .....	<b>13</b>
<b>5.3 Análises</b> .....	<b>13</b>
<b>5.3.1 Açúcares redutores</b> .....	<b>13</b>
<b>5.3.2 Acidez titulável</b> .....	<b>14</b>
<b>5.3.3 Biomassa seca</b> .....	<b>14</b>
<b>5.3.4 pH</b> .....	<b>14</b>
<b>6 RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>15</b>
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	<b>22</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>23</b>

## **1. TEMA**

Avaliação de parâmetros físico-químicos durante a fermentação para a produção de Kefir.

### **1.1 Delimitação do Tema**

Avaliação do teor de açúcares redutores, da acidez titulável, da quantidade de biomassa e do pH durante o processo fermentativo para a produção de Kefir a partir da cepa obtida em Barra Velha – SC.

## **2. OBJETIVO GERAL**

Caracterizar os parâmetros físico-químicos mais relevantes durante o processo fermentativo para a produção de Kefir.

### **2.1 Objetivos Específicos**

- Estabelecer condições adequadas e realizar o processo fermentativo a partir da colônia de Kefir;
- Estudar o processo fermentativo envolvido na produção de Kefir;
- Analisar os perfis de fermentação de cada amostra por meio dos parâmetros de acidez titulável, açúcares redutores, biomassa e pH;

### 3. INTRODUÇÃO

Os micro-organismos são de fundamental importância para o corpo humano, principalmente na alimentação. Embora possam ser associados a doenças, alguns podem melhorar a qualidade de vida das pessoas. Esses são chamados de probióticos, micro-organismos que têm a capacidade de eliminar patógenos do intestino e substituir por uma microbiota que possui função simbiótica com o organismo (MADIGAN, 2016).

O Kefir, produto resultante da fermentação do leite através da associação bactéria-levedura conhecida como grãos de Kefir, possui grande potencial probiótico quando ingerido. Além de dispor de tal efeito, apresenta grande valor nutricional, contendo muitas vitaminas, principalmente do complexo B, minerais em abundância, tendo o cálcio como um importante componente, proteínas de alto valor biológico e baixo teor de açúcares, uma vez que são usados como insumos durante a fermentação (CARNEIRO, 2010). A combinação de todos estes fatores forma um produto bastante saudável e saboroso, beneficiando os sistemas digestivos, metabólico e cardiovascular do corpo humano (FORSYTHE 2013).

Os produtos resultantes da fermentação do grão de Kefir tem se tornado objeto de estudo principalmente por conta de seus efeitos benéficos à saúde. Possuem potencial antioxidante, modula positivamente a imunidade, reconstituem a microbiota intestinal e, por conta do baixo nível de lactose em sua composição, são eficazes sobre os efeitos da intolerância à lactose, entre diversos outros fatores ainda a serem explorados (WESCHENFELDER, 2016).

Comparado ao iogurte, o Kefir além de possuir uma escala maior e mais diversificada de micro-organismos viáveis em sua cultura inicial, também apresenta um nível de atividade da  $\beta$ -galactosidase mais elevado, contribuindo para um aumento significativo da digestão da lactose do leite (HERTZLER & CLANCY, 2003). Também, difere do iogurte tradicional por ser menos viscoso e por conter, além de ácido láctico, etanol e gás carbônico. O ácido láctico produzido combina-se com os minerais cálcio e ferro, facilitando a absorção destes elementos e também aumentando a digestibilidade das proteínas, principalmente nos casos em que a secreção de ácido clorídrico está dificultada (GARCIA *et al.*, 1984).

Devido aos benefícios atribuídos aos produtos de Kefir, este projeto objetiva investigar o processo fermentativo e comparar os diferentes perfis de produção obtidos a partir de diferentes inóculos.



## **4. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

### **4.1 Kefir**

Também conhecido por Kefyr, Kefer, Kiaphur, Kepi e Kippi, o Kefir é o produto fermentado resultante da fermentação do leite por uma colônia de associação bacteriana com leveduras, popularmente conhecida como grãos de Kefir. O produto, quando ingerido, possui caráter probiótico extremamente elevado regulando a flora bacteriana intestinal. Possui o sabor levemente ácido, textura bastante viscosa podendo apresentar uma espuma suave, contendo uma coloração branca (CARNEIRO, 2010).

Os grãos de Kefir são originados das montanhas do Cáucaso, no Tibet e na Mongólia, onde os nativos o armazenavam com o leite de cabra e ovelha em jarros de barro e consumiam o produto fermentado, a partir do final século XIX começou a ser proliferado pela Europa Ocidental pela medicina russa. Nos dias de hoje, são muito estudados e pouco comercializados, sendo usualmente consumidos de forma artesanal (WESCHENFELDER, 2016).

Uma associação de bactérias ácido-láticas, bactérias acéticas e leveduras constituem os grãos de Kefir, forma uma matriz gelatinosa, que pode ser de coloração branca, esbranquiçada ou amarelada, mantendo essas características, mesmo quando cultivado de forma artesanal (WESCHENFELDER, 2016).

### **4.2 Propriedades Físico-Químicas.**

O Kefir possui grande potencial nutricional em sua composição, cedendo a variações que dependem das técnicas, tecnologia, matéria-prima e microbiota utilizada. O próprio grão de Kefir sofre variações atribuídas, principalmente, à sua localização de cultivo (WESCHENFELDER, 2016).

Esse produto costuma apresentar as seguintes características: pH entre 4,2 e 4,6; aproximadamente 0,8% de ácido láctico; álcool na proporção de 0,1 a 2,0%. Cerca de 87% do Kefir é composto por água, os valores próximos de componentes orgânicos são de 15%, contendo principalmente proteínas, carboidratos, lipídios e minerais (Tabela 1). O consumo de Kefir é muito apreciado devido ao seu grande valor nutricional, possuindo cerca de 1,8 mg de vitaminas, 1,5g de aminoácidos e 4,3 g de minerais (Tabela 2).

Tabela 1: Porcentagem de componentes orgânicos no Kefir

<b>Componentes Orgânicos</b>	<b>Valores médios (%)</b>
Proteína	3,4 – 4,2
Sacarose	4,4
Gorduras	0,5 – 3,0
Minerais	0,74 – 0,8

FONTE: WESCHENFELDER (2019)

Tabela 2: Componentes nutricionais presentes no Kefir

<b>ATRIBUTOS</b>	<b>COMPONENTES</b>	<b>CONCENTRAÇÃO (mg/100g)</b>
Vitaminas	B1	<0,001
	B2	<0,0005
	B5	0,0003
Aminoácidos	Lisina	380
	Valina	220
	Isoleucina	260
	Fenilalanina	230
	Outros	710
Minerais	Potássio	165.000
	Cálcio	860
	Magnésio	145.000
	Fósforo	300
	Zinco	9,27
	Ferro	2,03
	Manganês	1,3
	Outros	0,78

Fonte: CARNEIRO, (2019)

### 4.2.1 Efeitos Probióticos

A palavra “probiótico” remete à ideia de “pró-vida”. É definido como probiótico uma cultura simples ou mista de micro-organismos vivos benéficos para a flora intestinal nativa animal. Produtos probióticos usualmente contém Lactobactérias e Bifidobactérias em sua composição, consideradas, então, seguros para o consumo humano (FORSYTHE, 2013).

Após a ingestão de micro-organismos probióticos, estes irão colonizar o intestino devido à sua capacidade de sobreviver ao baixo pH, sais biliares e enzimas digestivas presentes no trato gastrointestinal, atingindo o intestino e eliminando a microbiota prejudicial à saúde humana, fixando sua colônia composta por uma microbiota (principalmente *Lactobacillus sp.* E *Bifidobacterium sp.*) (Tabela 3) mais saudável e benéfica ao ser humano (FORSYTHE, 2013)

Tabela 3: Microrganismos comuns em produtos probióticos

GÊNERO	ESPÉCIE MICROBIANA
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. acidophilus linhagens</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. johnsonii</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. delbrueckii ssp. Bulgaricus</i> , <i>L. reuteri</i> <i>L. brevis</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. lactis</i> .
<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. adolescentis</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. animalis</i> , <i>B. thermophilum</i> .

Fonte: CARNEIRO, 2019

O consumo de probióticos não é uma ideia recente na sociedade, porém é atual a tendência da comercialização prezando seus benefícios. Muitos estudos apontam os benefícios do consumo diário de probióticos, tais como;

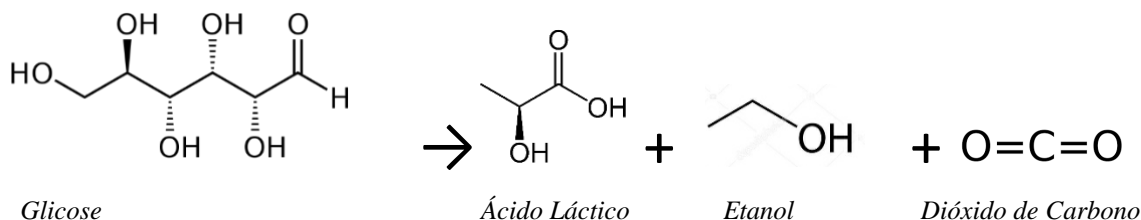
- Exclusão de agentes patógenos da microbiota intestinal;
- Aumento da imunidade;
- Alívio de sintomas da intolerância à lactose;
- Redução do colesterol ruim e pressão arterial;
- Bom funcionamento do sistema digestivo e excretor.

Em suma, os agentes probióticos trazem benefícios ao funcionamento intestinal do hospedeiro e reduzem malefícios causados pela lactose, servindo como suplemento alimentício a favor do sistema imune do organismo (FORSYTHE, 2013).

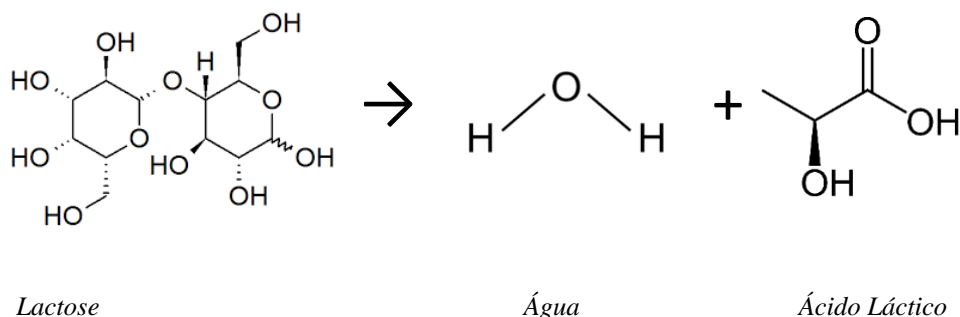
### 4.3 Fermentação Láctica

Existem vários tipos de fermentações, as quais podem ser divididas de acordo com os produtos da reação ou o substrato a ser fermentado. A fermentação láctica é definida de acordo com o produto da reação: o ácido láctico (MADIGAN, 2016). Nesse tipo de processo, pode-se obter dois padrões, hétero (I) ou homofermentativo (II), sendo que, respectivamente, um é caracterizado pela produção de principalmente etanol e CO<sub>2</sub> além do lactato, e o outro produz apenas o lactato (CARNEIRO, 2010).

I)



II)



A lactose é um dissacarídeo, ou seja, composta por dois monossacarídeos, sendo eles a glicose e galactose. O grupo de bactérias que realiza fermentação ácido-láctica hétero e homofermentativa da lactose é caracterizado como gram-positivo e que possui uma produção, cujo maior produto fermentativo desse metabolismo é o ácido-láctico (POFFOL, 2011). Muitas bactérias desse grupo estão presentes na microbiota bacteriana do Kefir, como as *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, e nos grãos originados na Rússia a *Streptococcus* (FORSYTHE, 2013).

## 5 METODOLOGIA

### 5.1 Amostras e preparo do inóculo

Foi utilizada uma amostra de grão de Kefir obtida por doação (Figura 1), proveniente da cidade de Barra Velha, em Santa Catarina. A amostra passou pelo processo de descontaminação, sendo imersa em leite bovino UHT, em ambiente esterilizado, por cerca de 8 dias, em temperatura controlada de 25 °C (Figura 2).



**Figura 1:** Grão de Kefir obtido por doação.



**Figura 2:** Cepa de Kefir inoculado em Leite bovino UHT.

Após a descontaminação, a cepa foi imersa novamente em leite bovino UHT para o processo de fermentação em estufa de cultivo, com controle de temperatura (26 °C). As análises foram realizadas sob processo de batelada, com coletas a cada três horas. Da amostra do grão

de Kefir, foi obtido vinte subamostras. Destas vinte, dez subamostras, contendo dez gramas do grão de Kefir cada, denominadas Amostras A, e postas em frascos enumerados de 0 a 9, e mais dez subamostras, contendo quinze gramas cada, chamadas de Amostras B, também postas em frascos enumerados de 0 a 9. As amostras A foram utilizadas para as análises de acidez titulável e pH, enquanto as amostras B, para biomassa seca e açúcares redutores. A divisão da amostra inicial em subamostras foi feita para facilitar a coleta, e diminuir a margem de erro dos resultados obtidos.

## 5.2 Processo fermentativo

Para o processo fermentativo, foi utilizado como substrato, o leite bovino integral UHT disposto em frascos de vidro e inoculado com o grão de Kefir na proporção de 10:1 (volume de leite: massa do grão de Kefir). O processo foi realizado em estufa de cultivo à temperatura controlada de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  em meio aeróbio por um período de 27 horas, com coletas para análises intervaladas a cada 3 horas.

## 5.3 Análises

Foram feitas as seguintes análises físico-químicas, a fim de se observar o desempenho da cepa quando submetidas ao processo fermentativo nas condições controladas de cultivo: teor de açúcares redutores, acidez titulável, quantificação da biomassa e pH. Todas as análises sempre realizadas em triplicata.

### 5.3.1 Acidez titulável

A acidez titulável se baseia na reação de neutralização da quantidade de ácido da amostra inicial (no caso, o ácido láctico) presente no leite e, posteriormente, no produto fermentado. Foi utilizado a solução de hidróxido de sódio 0,11N (também denominada Dornic\*) e um indicador do ponto de equivalência (fenolftaleína) para observar a concentração de ácido láctico no produto. Foi utilizado o padrão de 0,12-0,23 g/L de ácido láctico para o leite *in natura*, e 1,3 g/L ácido láctico para o Kefir, para a realização do procedimento. As amostras foram retiradas da estufa apenas no momento da análise a fim de evitar que a acidez modificasse

o seu valor (VENTURINI, 2007). O valor final de acidez pode ser expressado tanto em % de ácido láctico/L, assim como por graus Dornic (°D), uma vez que cada 1°D equivale a 0,01% de ácido láctico tendo sido utilizado o parâmetro de % (MAGRI, 2015).

### **5.3.2 Biomassa seca**

Uma alíquota de 10 mL do fermentado foi retirada e inativada através de congelamento até o preparo da análise. Após descongeladas as amostras, foram centrifugadas a 3000 rpm em tubos Falcon, sendo o sobrenadante armazenado em baixas temperaturas no freezer, por cerca de 28 horas. A biomassa foi levada para estufa de secagem a 60 °C até atingir massa constante.

### **5.3.3 Açúcares redutores**

A avaliação dos açúcares redutores foi realizada seguindo o método do DNS (ácido 3,5-dinitrossalicílico), segundo Miller (1959). A partir do sobrenadante obtido no processo de análise de biomassa seca, 1 mL da amostra, devidamente diluída, foram acrescentados a 1,5 mL do reagente DNS, que reagiu por 5 minutos em água a 100°C. A interrupção da reação foi feita por resfriamento dos tubos de ensaio com banho de gelo, e a absorbância lida a 540 nm em espectrofotômetro. A curva padrão foi realizada a partir de uma solução de glicose 1,0 g/L.

### **5.3.4 pH**

O potencial hidrogeniônico (pH) é um método para medir o nível de acidez de uma substância, ou seja, concentração do íon  $H^+$ . A análise de pH das amostras foram realizadas para detectar o nível de redução do pH à medida que o processo fermentativo ocorre, uma vez que se espera que ocorra um decréscimo pelo consumo da lactose e consequente produção do ácido láctico. Para o procedimento, as subamostras foram retiradas da estufa apenas no momento da análise e medidas utilizando um pHmetro previamente calibrado, da marca MS TECNOP9N modelo mPA210.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Inicialmente, a proposta do grupo seria realizar as quatro análises, pH, açúcares redutores, acidez titulável e biomassa seca, em três diferentes culturas de grão de Kefir, entretanto, houveram erros experimentais sobre o controle de temperatura e tempo de fermentação. Cinco amostras distintas de grão de Kefir foram obtidas pelo grupo, sendo apenas uma cultura realizada com sucesso.

Para realizar todas as quatro análises, seria necessário cerca de duzentas e setenta gramas (270 g) de grão de Kefir de cada amostra. As três primeiras possuíam cerca de cinquenta gramas (50 g) cada, com isso, o grupo começou a fermentar os grãos com grandes quantidades de leite bovino UHT para estimular o crescimento das cepas. O tempo estimado para que as amostras chegassem na quantidade necessária eram cerca de dois meses. Porém, o grupo observou um crescimento excessivamente lento da biomassa das amostras, menos de duas gramas ao dia, possivelmente pela submissão a grandes variações de temperatura por um longo período de tempo ou uso da fermentadora, ocasionando a morte de diversos microrganismos do grão de Kefir. Diante dessas observações, em discussão com os professores, o grupo admitiu que as três amostras estavam impróprias para a fermentação e foram devidamente descartadas.

As duas seguintes amostras foram coletadas em uma maior quantidade, cerca de cento e setenta gramas (170 g) cada e submetidas a diferentes temperaturas entre si para que o grupo pudesse melhor determinar os padrões de cultura do grão de Kefir. Enquanto uma das amostras estava em um ambiente controlado, a 26 °C, em um período de 24 h (Amostra A), a outra amostra ficou em temperatura ambiente, sem controle, com o mesmo período de 24 h (Amostra B). Observando o crescimento da massa do grão de Kefir e qualidade de fermentação das duas amostras, o grupo percebeu uma clara melhora na amostra A em relação a B. Enquanto a amostra A mostrava um crescimento em torno de quatro gramas ao dia, a amostra B apresentava crescimento de um grama, ou até decréscimos, por dia. Ao aplicar as condições de amostra A na amostra B, percebeu-se que a amostra B não estava em condições de qualidade o suficiente para realizar as análises, mas foi mantida, no intuito de tentar fazê-la voltar ao seu estado inicial. Sem sucesso, a amostra B foi devidamente descartada, restando apenas a amostra A, com cerca de trezentas e trinta gramas (330 g) de biomassa.



Devido às falhas experimentais para determinar condições padrões de cultura dos grãos de Kefir, não foi possível obter mais duas amostras com biomassa suficiente para realizar as análises propostas. Sendo assim, foi realizado as quatro análises em cima de apenas uma amostra (Amostra A).

Durante a fermentação para alcançar a quantidade necessária da cepa, observou-se variações nos valores medido de pH, apresentando teores de 2,4 a 3,8 com dados coletados de segunda a sexta-feira durante o mês de setembro, inativando a amostra nos sábados e domingos, mantido sob baixas temperaturas (aproximadamente 10°C). A amostra observada obteve um crescimento de aproximadamente 160 gramas em um período de vinte e três dias.

Em seguida iniciou-se a fermentação de 27 horas com coletas em períodos de 3 horas para as análises de pH e acidez titulável. Vinte (20) frascos foram divididos em dois subgrupos, subgrupo A e subgrupo B, para realizar o processo de fermentação pela amostra A. No subgrupo A, o produto Kefir foi utilizado para análise de pH e acidez titulável. O subgrupo B, sendo o produto Kefir inativado através do congelamento logo após a coleta, para evitar o contínuo da fermentação, foi utilizado para realizar as análises de açúcares redutores e biomassa seca (Figura 3). Os frascos de ambas as amostras foram enumerados de 0 a 9, representando os dez pontos de coletas, durante o período de 27 horas, com intervalos de 3 horas (Figura 4).



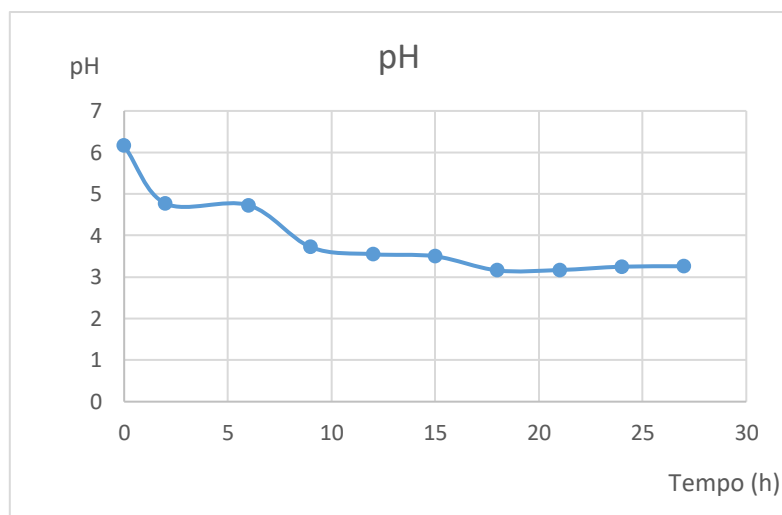
**Figura 3:** Fermentação das subamostras A e B

Subamostra A	TA0	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9
Subamostra B	TB0	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9

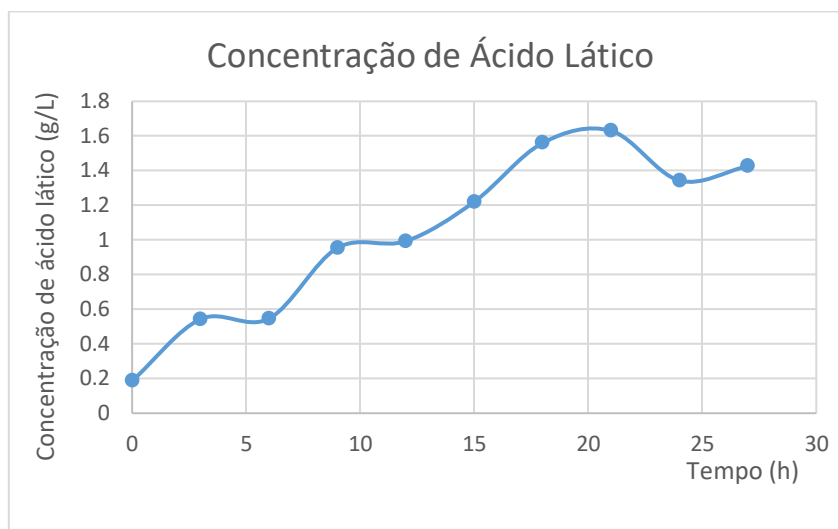
**Figura 4:** Preparo dos frascos de inóculo das cepas de Kefir.

Para o subgrupo A, foram postos em cada frasco dez gramas (10 g) do grão de Kefir, com proporção de 10:1 de leite-amostra, sendo assim, cem ml (100 ml) de leite bovino UHT para um grama do grão de Kefir. No subgrupo B, quinze (15 g) de grão de Kefir foi adicionado a cada frasco, com a mesma proporção 10:1, sendo cento e cinquenta ml (150 ml) de leite bovino UHT para um grama do grão de Kefir. Todos os frascos foram postos na estufa, com temperatura controlada de 26 °C, sendo retirado um frasco A e um frasco B, em suas seqüências, a cada três horas.

As análises realizadas inicialmente foram de pH e acidez titulável, iniciando às 9:00 h. A primeira análise foi realizada na hora zero da fermentação, ou seja, com o leite ainda não fermentado, porém, inoculado com a cepa. O pH foi medido com o pHômetro e mostrou resultado de 6,16, pouco mais ácido que o esperado, uma vez que o teor de pH padrão do leite *in natura* é de 6,4 a 6,8 (VENTURINI. 2007) (Figura 5). A acidez titulável foi realizada conforme o método Dornic, apresentando 19 °D, diferente do esperado, 14 a 18 °D (IN 62) (Figura 6). O leite no tempo zero pode ter adquirido o caráter mais ácido devido a resquícios do produto fermentado presente nos grãos de Kefir inoculados. As análises seguintes foram realizadas seguindo os mesmos padrões experimentais e os resultados obtidos foram os seguintes:



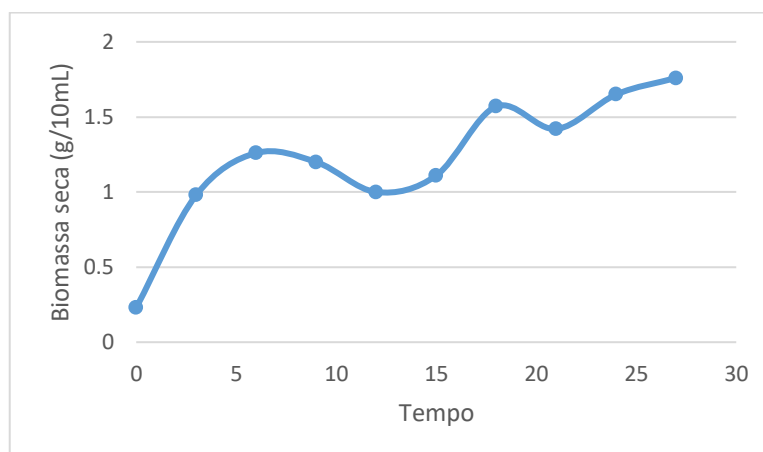
**Figura 5:** Teor de pH das amostras de Kefir.



**Figura 6:** Concentração de ácido láctico das amostras de Kefir titulado (g/L)

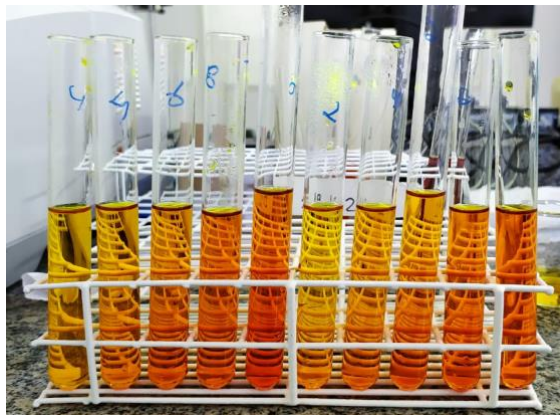
As análises de Biomassa seca e açúcares redutores começaram no dia 21 de outubro. As amostras foram descongeladas e coletadas alíquotas de 10 ml de cada ponto. A primeira análise a ser realizada foi a de biomassa seca. Em trinta tubos Falcon, três frascos para cada ponto de coleta (triplicata) e centrifugados a 3000 rpm. O sobrenadante foi armazenado em baixas temperaturas por aproximadamente 24 horas, em tubos de ensaio para serem utilizados na análise de açúcares redutores posteriormente.

Os resultados de biomassa seca apresentaram o crescimento esperado, uma vez que ocorre a multiplicação dos microrganismos ao serem alimentados com o substrato. Porém, erros devem ser considerados ao observar variações na curva, possivelmente devido as propriedades físico-químicas do Kefir, que consiste em uma alta viscosidade, com partículas sólidas do próprio grão de Kefir, causando variações na dosagem da massa nos tubos Falcon (Figura 7).

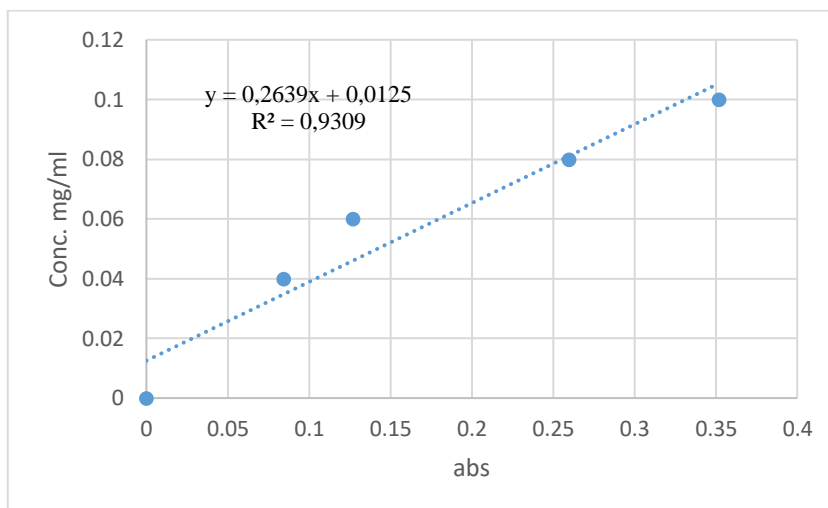


**Figura 7:** Pesagem da biomassa seca medida em g/10mL.

Para a análise de açúcares redutores, uma curva padrão foi sintetizada, a partir do método DNS, admitindo a equação  $y = 0,2639x + 0,0125$  de conversão de absorbância para concentração, e com regressão  $R^2$  de 0,9309 (Figura 8). Para o preparo dessa curva, 0,1 grama de glicose foi solubilizado em 100 ml de água, em seguida, a solução foi adicionada em dez diferentes tubos com suas devidas proporções (Figura 9). O processo foi realizado em duplicata.

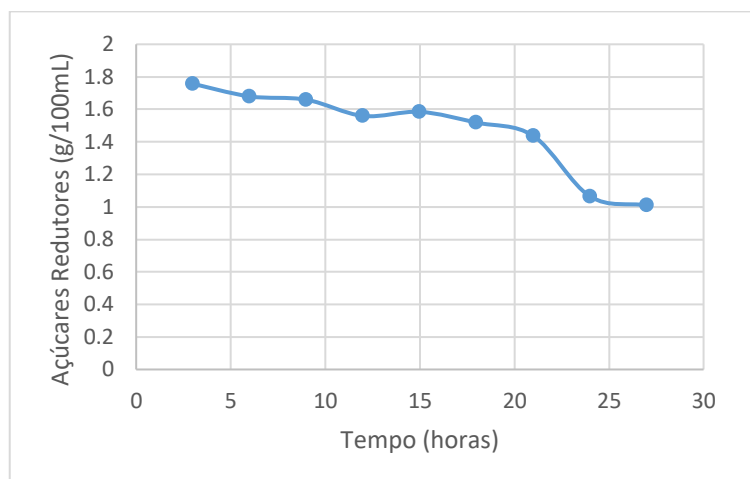


**Figura 8:** Solução de glicose com reagente DNS para síntese da curva padrão.



**Figura 9:** Curva padrão de açúcares redutores.

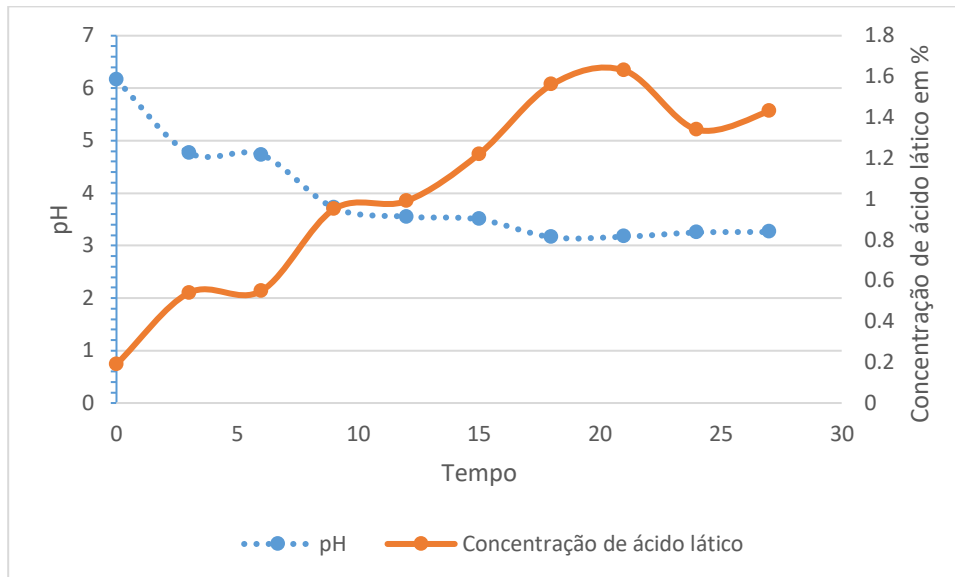
A seguir, foram realizadas as análises de açúcares redutores a partir do sobrenadante do Kefir anteriormente armazenado. Por conta da alta turbidez da amostra do Tempo zero, ou seja, o leite *in natura*, não foi possível obter a leitura do espectrofotômetro desse ponto de coleta. As demais leituras ocorreram com sucesso, apresentando leves variações causadas, possivelmente, pelas propriedades físico-químicas do Kefir (Figura 10).



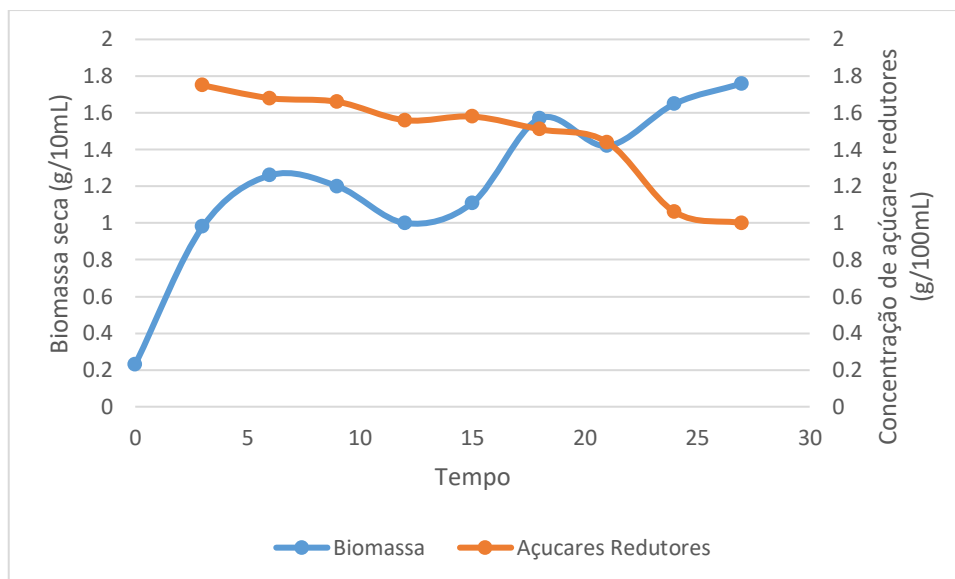
**Figura 10:** Porcentagem de açúcares redutores medido em g/100mL.

A partir da leitura do gráfico, é possível observar a diminuição do teor de açúcares redutores, o resultado esperado, uma vez que os açúcares são consumidos pelos microrganismos durante o processo de fermentação para a produção do ácido lático. Porém, novamente, é possível observar variações, possivelmente devido as propriedades físico – químicas do Kefir.

Através da relação das análises entre pH e acidez titulável (Figura 11), e Biomassa e açúcares redutores (Figura 12) do Kefir, foi possível observar, com certa margem de erro, resultados esperados. Com a análise dos resultados, é possível observar que com a diminuição do pH, ou seja, acidificação do meio, ocorre o aumento do ácido lático e diminuição dos açúcares. Em relação a biomassa, seu crescimento é devido à reprodução da microbiota presente, interferindo na concentração de ácido lático, uma vez fermentação lática do grão de Kefir faz a transformação da lactose em ácido lático.



**Figura 11:** Relação pH e concentração de ácido láctico.



**Figura 12:** Relação Biomassa seca e Concentração de açúcares redutores

## **7 CONCLUSÃO.**

O Kefir é um importante probiótico, podendo melhorar a qualidade de vida das pessoas, quando incorporado na dieta humana. É considerado uma grande fonte de vitaminas, minerais e aminoácidos. Nesse sentido, este trabalho visou analisar o perfil de fermentação por meio de alguns parâmetros, além de definir quais desses parâmetros compõem condições adequadas de fermentação para seu cultivo. No entanto, devido à baixa resistência a variação de temperatura e a quantidade de substrato necessária das colônias, houve dificuldade em mantê-las. Por conta disso, apenas uma das cinco amostras obtidas foi analisada com sucesso. A partir das análises dos resultados dessa amostra, três principais erros foram observados, sendo eles: uma leve alcalinização do meio após 21h de fermentação, certa baixa na concentração de ácido lático no mesmo período e grandes variações da biomassa seca.

## REFERÊNCIAS

- BERGMANN, R. S. O. *et al.* **MICROBIAL PROFILE OF A KEFIR SAMPLE PREPARATIONS - GRAINS IN NATURA AND LYOPHILIZED AND FERMENTED SUSPENSION**, Campinas, 18 jul. 2009.
- CARNEIRO, R.P. **DESENVOLVIMENTO DE UMA CULTURA INICIADORA PARA PRODUÇÃO DE KEFIR**. 2010. 147 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Setor de Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.
- FORSYTHE, S.J. **MICROBIOLOGIA DA SEGURANÇA DOS ALIMENTOS**. 2.ed. Nottingham: artmed, 2013
- GARCIA, S.; SOUZA, G.; VALLE, J.L. E. **QUEFIR E SUA TECNOLOGIA - ASPECTOS GERAIS. BOLETIM DO INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**, v. 21, n. 2, p. 137-155, 1984.
- HERTZLER, S.R.; CLANCY, S.M. **KEFIR IMPROVES LACTOSE DIGESTION AND TOLERANCE IN ADULTS WITH LACTOSE MALDIGESTION. JOURNAL OF THE AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION**, v. 103, p. 582-587, 2003.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **MÉTODOS QUÍMICOS E FÍSICOS PARA ANÁLISES DE ALIMENTOS**. 1 ed. digital São Paulo: IMESP, 2008.
- MADIGAN, M.T. **MICROBIOLOGIA DE BROCK**. 14 ed. Porto Alegre: artmed, 2016.
- MAGRI, L. P. **QUANTIFICAÇÃO DE ACIDEZ TITULÁVEL E pH UTILIZANDO TÉCNICA POTENCIOMÉTRICA COMO INDICADOR DE QUALIDADE DO LEITE BOVINO**. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia em Leite e Derivados). Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais. 2015.
- MILLER, G. L. **USE OF DINITROSALICYLIC ACID REAGENT FOR DETERMINATION OF REDUCING SUGAR**. *Analytical Chemistry* v.31, p.426-428, 1959
- POFFOL, F. da SILVA, M. A. C. **CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA E FISIOLÓGICA DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁCTICAS ISOLADAS DE PESCADO MARINHO. CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**, Campinas, p. 303-307. abr.-jun. 2011.
- REGULAMENTO TÉCNICO DE PRODUÇÃO, IDENTIDADE E QUALIDADE DE LEITE TIPO A. Instrução Normativa nº N° 62 Item 8.2, de 27 de novembro de 2019. Art. 4°. **Conjunto do Leite Cru Refrigerado tipo A Integral**, [S. l.], 29 dez. 2011.



VENTURINI, Katiani Silva; SARCINELLI, Miryelle Freire; LUÍS CÉSAR DA SILVA, Luís César. **Características do Leite**, Universidade Federal do Espírito Santo - UFES, ano 2007, p. 5, 26 ago. 2007. Disponível em: [http://www.agais.com/telomc/b01007\\_caracteristicas\\_leite.pdf](http://www.agais.com/telomc/b01007_caracteristicas_leite.pdf). Acesso em: 1 nov. 2019.

WESCHENFELDER, S. **CARACTERIZAÇÃO DO KEFIR TRADICIONAL QUANTO A COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, SENSORIALIDADE E ATIVIDADE ANTI-*Escherichia coli***. 2009. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Setor de Ciência de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009

WESCHENFELDER, S. **ELABORAÇÃO E AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DE PRODUTOS LÁCTEOS OBTIDOS A BASE DE KEFIR**. 2016. 114 f. Tese de doutorado (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Setor de Ciência de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.