

## Área: Tecnologia de Alimentos

# DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE BEBIDA LÁCTEA FERMENTADA COM GRÃOS DE KEFIR ARTESANAL

*Débora Piovesan de Moraes\**, *Andressa Fusieger*, *Jéssica Ecke*, *Valéria Maria Limberger*  
*Bayer*, *Ana Eucares von Laer*

*Laboratório de Microbiologia dos Alimentos, Curso de Tecnologia em Alimentos, Colégio Agrícola de Frederico Westphalen, Universidade Federal de Santa Maria, Frederico Westphalen, RS*

*\*E-mail: deborapiovesandemoraes@hotmail.com*

**RESUMO** – O objetivo do presente trabalho foi o desenvolvimento de bebida láctea fermentada a partir de grãos de kefir artesanal e posterior caracterização microbiológica do produto. Para a obtenção da bebida láctea, foram elaboradas duas formulações diferentes, com variação na concentração dos grãos de kefir: 10 e 20% em relação ao volume total de leite e soro, para os quais utilizou-se a proporção de 70%:30%. A fermentação ocorreu a 25°C até acidez de 80 a 85°D. As formulações de bebidas lácteas foram avaliadas quanto à qualidade microbiológica através das análises de contagem total de mesófilos aeróbios, contagem de bolores e leveduras e enumeração de coliformes totais e termotolerantes. A diferença no tempo de fermentação entre as amostras 1 e 2 foi de 370 minutos, sendo que a amostra 2 apresentou maior eficiência no processo fermentativo, atingindo a acidez desejada em menor tempo. Quanto a avaliação microbiológica, a amostra 1 apresentou resultados que a caracterizaram como própria para o consumo (enumeração de coliformes termotolerantes de  $3,6 \text{ NMP} \times \text{mL}^{-1}$ ), enquanto a amostra 2 com resultado de  $2,8 \times 10 \text{ NMP} \times \text{mL}^{-1}$  para coliformes termotolerantes caracteriza-se como imprópria para o consumo. Em relação ao tempo de fermentação, a fabricação da bebida láctea com maior concentração de grãos de kefir (amostra 2) seria a mais apropriada, porém as suas características microbiológicas não atendem as legislações vigentes.

**Palavras-chave:** tempo de fermentação, coliformes termotolerantes, derivados lácteos.

## 1 INTRODUÇÃO

Os grãos de kefir apresentam uma associação simbiótica de leveduras, bactérias ácido-láticas e bactérias ácido-acéticas envoltas por uma matriz de polissacarídeo referido como kefiran (PINTADO et al., 1996; HERTZLER e CLANCY, 2003) cuja composição microbiana varia conforme a região de origem, o tempo de utilização, o substrato utilizado para proliferação dos grãos e as técnicas utilizadas em sua manipulação (WITTHUHN et al., 2004).

Bebida Láctea é o produto obtido a partir de leite ou leite reconstituído e/ou derivados de leite, reconstituídos ou não, fermentado ou não, com ou sem adição de outros ingredientes, onde a base láctea

represente pelo menos 51% (m/m) do total de ingredientes do produto. Quando fermentada, a fermentação deverá ocorrer mediante a ação de cultivo de micro-organismos específicos, e/ou adição de leite fermentado e/ou outros produtos lácteos fermentados, e o produto final não poderá ser submetido a tratamento térmico após a fermentação. Sendo que, a contagem total de bactérias lácticas viáveis deve ser no mínimo de  $10^6$  UFC x g<sup>-1</sup>, no produto final, para o(s) cultivo(s) láctico(s) específico(s) empregado(s), durante todo o prazo de validade (BRASIL, 2005).

Em virtude do teor de lactose e outros nutrientes, o soro, resultante do processamento de queijos, torna-se uma matéria-prima potencial ao desenvolvimento de micro-organismos viabilizando a produção de bebidas lácteas fermentadas (MAGALHÃES et al., 2011), já que o soro *in natura* apresenta baixa aceitação sensorial pelo alto teor de sais minerais (SOARES et al., 2011).

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver bebida láctea fermentada a partir de grãos de kefir artesanal e posterior caracterização microbiológica dos produtos.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Obtenção do leite e soro

O leite foi obtido do Setor de Bovinocultura do Colégio Agrícola de Frederico Westphalen (CAFW-UFSM) e o soro obtido do processamento de queijo tipo prato na Agroindústria de Lácteos. Previamente ao processamento do queijo e da bebida láctea o leite foi submetido à pasteurização.

### 2.2 Obtenção e preparo dos grãos de kefir.

Utilizou-se populações de grãos de kefir artesanal provenientes de manipulações familiares. A reativação do kefir e adaptação do mesmo ao leite foi realizada durante 15 dias em leite UHT, incubados a 25°C durante 24h. A reativação e manutenção dos grãos ocorreram na Agroindústria de Lácteos do CAFW.

### 2.3 Elaboração da bebida láctea fermentada

O processamento das bebidas lácteas fermentadas ocorreu na Agroindústria de Lácteos do CAFW-UFSM. Foram elaboradas duas formulações diferentes, com variação na concentração dos grãos: 10 e 20% em relação ao volume total de leite e soro, para os quais utilizou-se a proporção de 70%:30%. Após a homogeneização do soro ao leite, a mistura foi dividida em duas porções, as quais foram denominadas de amostra 1 e amostra 2 e receberam as quantidades de 10% e 20% de kefir, respectivamente.

A fermentação ocorreu a 25°C durante período suficiente para atingir a acidez de 80 a 85°D. Após o processo de fermentação, as formulações foram peneiradas com auxílio de peneira de aço inoxidável, em condições assépticas, para a separação da bebida láctea fermentada e dos grãos de kefir. As amostras foram armazenadas em refrigeração até serem enviadas ao laboratório para as análises microbiológicas, as quais ocorreram ainda no mesmo dia de processamento.

## 2.4 Análises microbiológicas das formulações de bebida láctea

As duas formulações de bebidas lácteas foram avaliadas quanto à qualidade microbiológica através das análises de contagem total de mesófilos aeróbios, contagem de bolores e leveduras, enumeração de coliformes totais e termotolerantes de acordo com Silva et al. (2010) e os Métodos de Análises Microbiológicas para Alimentos do MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), segundo a normativa N° 62, de 26 de agosto de 2003 (BRASIL, 2003). As análises microbiológicas do produto final ocorreram no Laboratório de Microbiologia do CAFW.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados para o tempo de fermentação das bebidas lácteas estão expostos na tabela 1, sendo considerado a relação tempo x acidez das amostras. A diferença no tempo de fermentação entre as amostras 1 e 2 foi de 370 minutos, sendo que a amostra 2 teve maior eficiência no processo fermentativo, ou seja, atingiu a acidez desejável em menor tempo de fermentação. A amostra 1 precisou de aproximadamente 64% a mais de tempo para fermentar a bebida em relação a amostra 2.

Sendo assim, a diferença observada no tempo de fermentação demonstra que a quantidade de grãos de Kefir influencia na velocidade do processo de fermentação da bebida láctea. Um menor tempo de fermentação pode ser avaliado como mais adequado por vários aspectos, entre eles, menor probabilidade de contaminação microbiana e industrialmente pode apresentar maior rentabilidade e produtividade.

Tabela 1 – Tempo de fermentação necessário para que as bebidas lácteas atinjam acidez mínima de 80° D.

	AMOSTRA 1	AMOSTRA 2
ACIDEZ (°D)	85	88
TEMPO DE FERMENTAÇÃO (MIN.)	580	210

Segundo Thamer e Penna (2006), para a elaboração de bebida láctea utilizando culturas de *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Bifidobacterium* e *Lactobacillus acidophilus*, o tempo de fermentação variou de 185 a 216 minutos. Resultados semelhantes também foram encontrados por Dave e Shah (1997) na fabricação de iogurtes com culturas lácteas mistas compostas de *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium*, onde o tempo de fermentação variou de 210 a 360 minutos.

A tabela 2 apresenta os resultados obtidos nas análises microbiológicas de contagem total de mesófilos aeróbios, de bolores e leveduras e enumeração de coliformes totais e termotolerantes.

Tabela 2 – Caracterização microbiológica das amostras e padrões estabelecidos pela legislação vigente.

	AMOSTRA 1	AMOSTRA 2	RDC Nº 12 (BRASIL, 2001)	IN 16 (BRASIL, 2005)
<b>Mesófilos</b> (UFC x ml <sup>-1</sup> )	3,55 x 10 <sup>6</sup>	1,4 x 10 <sup>6</sup>	ND*	ND
<b>Bolores e leveduras</b> (UFC x ml <sup>-1</sup> )	3,1 x 10 <sup>5</sup>	1,85 x 10 <sup>5</sup>	ND	ND
<b>Coliformes totais</b> (NMP x mL <sup>-1</sup> )	3,6	1,5 x 10 <sup>2</sup>	ND	n=5 c=2 m=10 M=100
<b>Coliformes termotolerantes</b> (NMP x mL <sup>-1</sup> )	3,6	2,8 x 10	10	n= 5 c=2 m<3 M=10

\* ND: não determinado

Quanto a avaliação da contaminação por bolores e leveduras, a legislação não prevê nenhum limite. Ferreira (2011) avaliou a qualidade microbiológica de bebida láctea pasteurizada sem sabor no Distrito Federal, das 20 amostras analisadas, 7 estavam contaminadas com bolores e leveduras. Entretanto, para bebidas lácteas fermentadas com grãos de kefir, a contagem elevada de bolores e leveduras é esperada e justificada pela composição microbiológica dos grãos, que apresentam leveduras em simbiose com outros micro-organismos. Tanto que, no Regulamento Técnico dos Padrões de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados (BRASIL, 2007), os requisitos microbiológicos para o leite fermentado Kefir, em relação a leveduras, é uma contagem mínima de 10<sup>4</sup> UFC x g<sup>-1</sup> durante seu período de vida útil.

De acordo com a Resolução RDC nº 12 (BRASIL, 2001) que permite o máximo de 10 NMP x mL<sup>-1</sup> de coliformes a 45°C, a amostra 1 se encontra dentro do permitido com uma contagem de 3,6 NMP x mL<sup>-1</sup>. No entanto, a amostra 2 está fora dos padrões, com 2,8 x 10 NMP x mL<sup>-1</sup>.

A comparação dos resultados com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebidas Lácteas (BRASIL, 2005) torna-se mais difícil, uma vez que a legislação não prevê resultados para amostra indicativa, como é o caso da RDC nº 12 (BRASIL, 2001). Entretanto, considerando o padrão microbiológico “m” e o limite tolerável “M”, segundo um plano de amostragem de três classes, a amostra 1 apresentaria resultado para coliformes totais abaixo do padrão microbiológico (limite que separa um lote aceitável de um lote com qualidade intermediária) e para coliformes termotolerantes o resultado ficaria abaixo do limite tolerável (que separa um lote com qualidade intermediária de um lote com qualidade inaceitável), ou seja, a amostra 1 seria considerada aceitável, mas com qualidade intermediária. Enquanto a amostra 2 seria considerada inaceitável, ou seja, os resultados de coliformes totais e termotolerantes estariam acima do limite tolerável.

Dessa forma, tanto na comparação com a RDC 12 (BRASIL, 2001) como com a IN 16 (BRASIL, 2005), os resultados são interpretados da mesma forma.

Semelhante aos resultados encontrados, Cesarino et al. (2010) realizaram um estudo caracterizando a qualidade microbiológica de bebidas lácteas comercializadas em Mossoró-RN, das 20 amostras coletadas, 4 estavam em desacordo ao estabelecido pela IN nº16 (BRASIL, 2005) para enumeração de coliformes termotolerantes. Enquanto, Ribeiro (2015) em caracterização de micro-organismos isolados a partir de grãos de kefir, não encontrou nenhuma amostra com contagem de coliformes termotolerantes.

Farnworth (2005) sugere que produtos fermentados com grãos de kefir possuem propriedades antimicrobianas devido a presença de metabólitos formados durante a fermentação ou produtos de degradação.

Essas substâncias contribuem para o decréscimo do pH, que torna o meio inapropriado para o desenvolvimento da maioria dos micro-organismos. Estudos realizados por Garrote et al., 2000 atribuem atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas ao kefir. Em outro estudo, Rodrigues et al., (2005) relatam que as bactérias ácido-lácticas dos grãos de kefir produzem bacteriocinas e o próprio kefiran, que são portadores de propriedades antimicrobianas.

Aparentemente, no presente estudo a presença de grãos de kefir não apresentou efeito inibitório e/ou não influenciou na enumeração de coliformes totais e termotolerantes, quando comparados com os resultados das análises da matéria-prima empregada (dados não apresentados). Portanto sugere-se, como um novo trabalho ou continuação deste, um tratamento térmico mais adequado nas matérias-primas, visando a diminuição da contaminação, para que este produto possa ser consumido pela população. Assim como, o acréscimo de sabor e açúcar ao produto para posterior avaliação sensorial.

#### 4 CONCLUSÃO

Em relação ao tempo de fermentação, a fabricação da bebida láctea com maior concentração de grãos de kefir seria a mais apropriada, porém as suas características microbiológicas não atendem as legislações vigentes. Enquanto a amostra com fermentação mais prolongada apresentou-se microbiologicamente segura.

#### 6 REFERÊNCIAS

- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento sobre os padrões microbiológicos para alimentos e seus anexos I e II. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, Distrito Federal, n.7, 10, Jan. 2001. seção I, p.45-53
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 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 República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 18 de set. 2003. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=6078>>. Acesso em 28 de fevereiro de 2015.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 16 de 23 de agosto de 2005. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebidas Lácteas. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 24 de ago. 2005. Disponível em: <[http://www.lex.com.br/doc\\_19408\\_INSTRUCAO\\_NORMATIVA\\_N\\_16\\_DE\\_23\\_DE\\_AGOSTO\\_DE\\_2005.asp](http://www.lex.com.br/doc_19408_INSTRUCAO_NORMATIVA_N_16_DE_23_DE_AGOSTO_DE_2005.asp)>. Acesso em 28 de fevereiro de 2015.
- 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. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 24 de out. 2007. Disponível em: <[http://www.aladi.org/nsfaladi/normasTecnicas.nsf/09267198f1324b64032574960062343c/4207980b27b39cf903257a0d0045429a/\\$FILE/IN%20N%C2%BA%2046-2007.pdf](http://www.aladi.org/nsfaladi/normasTecnicas.nsf/09267198f1324b64032574960062343c/4207980b27b39cf903257a0d0045429a/$FILE/IN%20N%C2%BA%2046-2007.pdf)>. Acesso em 16 de abril de 2015.
- CESARINO, M. L do N., SOARES, K. M. de P., SILVA, J. A. Avaliação dos parâmetros de qualidade microbiológica de bebidas lácteas comercializadas na cidade de Mossoró-RN. **Pubvet**, v.4, n.6, 2010.

- DAVE, R. I., SHAH, N.P. Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. **Internacional Dairy Journal**, v. 7, n. 1, p. 31-41, 1997.
- FARNWORTH, E. R. Kefir - a complex probiotic. **Food Science & Technology Bulletin: Functional Foods**, v.2, n.1, p.1-17, 2005.
- FERREIRA, P. M. **Análise microbiológica e físico-química de bebida láctea pasteurizada, sem sabor, comercializada no Distrito Federal**. 2011. 39 f. Monografia (Graduação do Curso de Medicina Veterinária)-Universidade de Brasília, Brasília, 2011.
- GARROTE, G. L., ABRAHAM, A. G., DE ANTONI, G. L. Inhibitory Power of kefir: the role of organic acids. **Journal of Food Protection**, v. 63, n. 3, p. 299-418, 2000.
- HERTZLER, S.R., CLANCY, S.M. Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. **Journal American Diet. Association**. v.153, p.582-587, 2003.
- MAGALHÃES, K.T., et al. Comparative study of the biochemical changes and volatile compound formations during the production of novel whey-based kefir beverages and traditional milk kefir. **Food Chemistry**, v.126, p.249-253, 2011.
- PINTADO, M.E., et al. Microbiological and theological studies on Portuguese kefir grains. **International Journal of Food Science Technology**. v.31, p.15-26, 1996.
- RIBEIRO, A. S. **Caracterização de micro-organismos com potencial probiótico isolados a partir de Kefir produzidos na região noroeste do estado do Rio Grande do Sul**. 2015. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos)-Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2015.
- RODRIGUES, K. L., CARVALHO, J. C. T., SCHNEEDORF, J. M. Anti-inflammatory properties of kefir and its polysaccharide extract. **Inflammopharmacology**, v.13, n. 5-6, p. 485-492, 2005.
- SILVA, D., et al. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**. São Paulo: Varela, 2010.
- SOARES, D.S., et al. Aproveitamento de soro de queijo para produção de iogurte probiótico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.4, p.996-1002, 2011.
- THAMER, K. G., PENNA, A. L. B. Caracterização de bebidas lácteas funcionais fermentadas por probióticos e acrescidas de prebióticos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n.3, p. 589-595, 2006.
- WITTHUHN, R.C., SCHOEMAN, T., CILLIERS, A. et al. Impact of preservation and different packaging conditions on the microbial community and activity of kefir grains. **Food Microbiology**. v.22, p.337-344, 2004.