

INFLUÊNCIA DO TEMPO DE FERMENTAÇÃO NAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS DE KEFIR

Ruana Mara Rodrigues Lima ¹
Kivia Kelly Bezerra do Nascimento²
Virna Luiza de Farias ³

INTRODUÇÃO

O kefir é um leite fermentado viscoso, ligeiramente carbonatado, produzido pela ação de bactérias e leveduras contidas nos seus grãos, que tradicionalmente, têm sido usados em muitos países, especialmente nos da Europa Oriental, como uma fonte natural na produção dessa bebida láctea (MAGALHÃES et al., 2011).

O nome kefir é derivado da palavra turca “keyif”, que significa “sentir-se bem” devido ao senso geral de saúde e bem-estar quando consumido. É uma bebida popular tradicional do Oriente Médio que tem origem nas montanhas do Cáucaso na antiga União Soviética, na Ásia Central, e que foi consumida por milhares de anos. É conhecido sob uma variedade de nomes: Kephir, Kiaphur, Kefer, Knapon e Kefi. A sua difusão internacional, a partir do final do século XIX, pela Europa e para o Brasil está ligada aos movimentos migratórios dos povos caucasianos (OTLES; CAGINDI, 2003; TERRA, 2007).

Tradicionalmente, o kefir é um subproduto do leite, resultante de dupla fermentação: láctica e alcoólica. Comercialmente usa-se o leite de vaca, mas ele também pode ser preparado a partir do leite de ovelha, cabra e búfala. Os grãos são amarelos claros quando cultivados em leite e são ocres e pardos quando cultivados em açúcar mascavo (OTLES; CAGINDI, 2003; WITTHUNHN et al., 2004; WESCHENFELDER, 2011).

A busca por qualidade de vida é um dos grandes objetivos dos indivíduos que descobrem ser intolerantes à lactose, pois em geral, o leite é um dos principais componentes da alimentação diária, tornando a retirada desse produto e seus derivados da dieta um desafio para quem não pode ingeri-los. Por isso, adaptações na alimentação são conquistas importantes para a vida desses indivíduos. O kefir pode ser considerado uma descoberta da ciência da alimentação para a saúde do intolerante à lactose.

A lactose, conhecida como o açúcar do leite, é um dissacarídeo composto por uma molécula de glicose e uma de galactose. Este dissacarídeo é hidrolisado pela enzima intestinal lactase ou β -D-galactosidase, que libera seus produtos para a absorção na corrente sanguínea. Porém, com o passar dos anos há uma redução na produção da enzima lactase no intestino, o que dificulta a capacidade de digerir a lactose contida no leite (BARBOSA; ANDREAZZI, 2010).

A má digestão da lactose ocorre quando a quantidade de lactase presente nas vilosidades do intestino delgado se reduz a uma pequena fração, podendo até mesmo tornar-se ausente.

¹ Graduando do Curso de Nutrição do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará – *Campus* Limoeiro do Norte - IFCE, ruana775@gmail.com;

² Mestranda do Curso de Tecnologia de Alimentos do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará – *Campus* Limoeiro do Norte - IFCE, kiviakellynutri@gmail.com;

³ Professor orientador: Doutora Virna Luiza de Farias, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará – *Campus* Limoeiro do Norte - IFCE, virna@ifce.edu.br.

Projeto Institucional de Bolsas de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação - financiado pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará.

Quando a quantidade de lactose ingerida é maior do que a quantidade suportada pelo organismo, são evidenciados os sintomas de intolerância e o indivíduo passa a manifestar desconfortos gastrointestinais, como dor abdominal, sensação de inchaço no abdome, flatulência, diarreia (PEREIRA et al., 2012). Em 2012, a intolerância à lactose afetava 58 milhões de brasileiros, que apresentavam dificuldades em digerir a lactose pela deficiência da enzima lactase no intestino (SANTOS et al., 2012).

Tempo e temperatura são parâmetros que influenciam diretamente as características físico-químicas e a microbiota do kefir. Longos períodos de fermentação resultam em maior consumo da lactose do leite, portanto maior produção de ácido lático, podendo ocasionar rejeição sensorial do produto, enquanto temperaturas superiores a 25 °C pode facilitar a contaminação por microrganismos indesejáveis. A composição dos grãos varia dependendo da região, por isso a microbiota do kefir também é variável, repercutindo diretamente nos parâmetros físico-químicos. Por isso, a obtenção de uma bebida sensorialmente agradável com baixo teor ou sem lactose, e que atenda aos padrões microbiológicos da legislação ainda é um desafio.

Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a influência do tempo de fermentação nas características físico-químicas e microbiológicas de kefir, visando a obtenção de uma bebida que possa ser consumida por pessoas com intolerância a lactose.

O leite UHT adicionado de 2,5% (m/v) de leite em pó foi inoculado com 3,5% (m/v) de grãos de kefir, em frascos de vidro previamente sanitizados, e posteriormente tampados com panos multiuso e elástico. Os frascos foram acondicionados em incubadora B.O.D. (*Biochemical Oxygen Demand*) a 25 °C, nos tempos de 18, 24, 30 e 36 horas, para ocorrência da fermentação. Antes e após a fermentação as bebidas foram analisadas quanto a sua acidez, pH, sólidos solúveis e teor de lactose. Verificou-se ainda a diferença de peso dos grãos de kefir. Contagens de Bactérias Ácido Lácticas (BAL) e de bolores e leveduras foram realizadas para acompanhamento do crescimento desses microrganismos. As médias das análises físico-químicas foram comparadas entre si pelo teste de Tukey, utilizando o software Statistica.

Nenhuma bebida se enquadrava como de “baixo teor de lactose” segundo a legislação brasileira RDC N° 135, de 8 de fevereiro de 2017 da ANVISA, pois apresentaram mais de 1g de lactose por 100 g. A maior concentração de BAL ($5,20 \times 10^9$ UFC/g) ocorreu em 24 horas, com redução após esse tempo. Vale destacar a importância da elevada contagem de BAL, uma vez que abrangem microrganismos probióticos. O produto obtido se apresentou dentro dos padrões quanto aos parâmetros físico-químicos e à contagem de BAL, entretanto mais estudos com esses grãos são necessários para obtenção de uma bebida para o público de pessoas com lactose.

METODOLOGIA (OU MATERIAIS E MÉTODOS)

O leite UHT e o leite em pó foram adquiridos no comércio de Limoeiro do Norte – CE. Os grãos de kefir foram obtidos por doação. Todos os objetos utilizados para inocular os grãos no leite foram sanitizados com hipoclorito de sódio a 200 ppm por 15 minutos, a fim de evitar contaminação nos grãos e na bebida.

Para a fermentação, o substrato consistiu de leite adicionado de 2,5% (m/v) de leite em pó, para melhorar a atuação dos microrganismos dos grãos de kefir durante esse processo, conforme recomendado por Costa et al. (2013). Esse substrato foi caracterizado por meio de análises físico-químicas de acidez titulável (expressa em ácido lático), pH e sólidos solúveis.

Os grãos de kefir foram pesados, e 3,5% (m/v) foram inoculados no substrato, em potes de vidro sanitizados, que foram tampados com pano multiuso limpo, e acondicionados em estufa B.O.D. na temperatura desejada. A fermentação foi avaliada a 25 °C em quatro tempos diferentes: 18, 24, 30 e 36 horas, conduzidos em duplicata. As bebidas foram analisadas quanto a pH, acidez em ácido lático, sólidos solúveis (AOAC, 2016), teor de lactose IAL (2008) e diferença de massa dos grãos de kefir. Para verificação da adequação das bebidas aos padrões da legislação, as bebidas foram analisadas quanto à contagem de bactérias ácido lácticas (BAL) e bolores e leveduras, conforme metodologias de (APHA, 2001), comparando os resultados aos parâmetros estabelecidos na Instrução Normativa N° 46 de 23 de outubro de 2007 (BRASIL, 2007) e na RDC N° 12 de 02 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001), que preconizam padrões microbiológicos para leites fermentados.

Análise estatística: Os dados foram tabulados em planilha do Excel®, submetidos a Análise de Variância (ANOVA), e expressos em média \pm desvio padrão, que foram comparadas, entre si por meio de teste de Tukey a 5% de significância. O software Statistica 7.0 foi utilizado para as análises.

DESENVOLVIMENTO

Lactose

A lactose, conhecida como o açúcar do leite, é um dissacarídeo composto por uma molécula de glicose e uma de galactose. Este dissacarídeo é hidrolisado pela enzima intestinal lactase ou β -D-galactosidase, onde libera seus componentes para a absorção na corrente sanguínea. Porém, a atividade da enzima lactase existente no intestino, com o passar dos anos tem uma redução na sua produção dificultando a capacidade de digerir a lactose contida no leite (BARBOSA; ANDREAZZI, 2010).

A má digestão da lactose ocorre quando a quantidade de lactase presente nas vilosidades do intestino delgado reduz a uma pequena fração podendo até mesmo tornar-se ausente. A má digestão da lactose é evidenciada quando a quantidade de lactose ingerida não é totalmente digerida e absorvida, devido ao declínio na expressão da atividade da lactase na idade adulta (lactase não persistente ou deficiente). Quando a quantidade de lactose ingerida é maior do que a quantidade suportada pelo organismo, são evidenciados os sintomas de intolerância e o indivíduo passa a manifestar desconfortos gastrointestinais, como dor abdominal, sensação de inchaço no abdome, flatulência, diarreia (PEREIRA et al., 2012).

A lactose tem grande importância na indústria de alimentos, pois através da sua fermentação por microrganismos específicos, obtém-se o ácido lático, sendo esse processo utilizado para a produção de diversos derivados como iogurte, leite fermentado, bebida láctea, queijo, entre outros (LONGO, 2006).

Kefir

O kefir é um leite fermentado viscoso, ligeiramente carbonatado, produzido pela ação de bactérias e leveduras contidas nos seus grãos, que tradicionalmente, têm sido usados em muitos países, especialmente na Europa Oriental, como uma fonte natural na produção dessa bebida láctea (MAGALHÃES et al., 2011b).

O nome kefir é derivado da palavra turca keyif, que significa “sentir-se bem” devido ao senso geral de saúde e bem-estar quando consumido. É uma bebida popular tradicional do

Oriente Médio que tem origem nas montanhas do Cáucaso na antiga União Soviética, na Ásia Central e foi consumida por milhares de anos. Quando se pergunta sobre a origem dos grãos, os caucasianos respondem que foram presentes de Alah (Deus), o que explica ter recebido também o nome de "milho do profeta", em alusão a Maomé. o Kefir faz parte da cultura alimentar dos povos que habitam nessa região e que atribuem várias propriedades promotoras de saúde ao seu consumo. É conhecido sob uma variedade de nomes: Kephir, Kiaphur, Kefer, Knapon e Kepi. A sua difusão internacional a partir do final do século XIX pela Europa e para o Brasil está ligada aos movimentos migratórios dos povos caucasianos (OTLES; CAGINDI, 2003; TERRA, 2007).

No Brasil, a bebida é fabricada principalmente de forma artesanal, obtida pela fermentação do grão em leite ou em água contendo açúcar mascavo. O produto, bem como os possíveis benefícios da inclusão desse alimento probiótico na dieta, é desconhecido pela maior parte da população brasileira. Apesar do valor nutricional e terapêutico do produto, o método tradicional de obtenção do kefir, a partir de fermentações sucessivas com a reinoculação dos grãos, gera produtos não padronizados (LEITE, 2012).

Patentes com kefir

A legislação brasileira (BRASIL, 2007) prevê a possível adição de sucos e pedaços de frutas ao kefir após a etapa de maturação. Na pesquisa de Santos (2013) frutas como a mangaba e a siriguela foram empregadas na bebida fermentada com grãos de kefir, e resultados extremamente positivos quanto a aceitabilidade sensorial do produto foram obtidos.

Foi realizado um levantamento de dados em duas plataformas de bases de patentes: European Patent Office (ESPACENET) e Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI).

Na ESPACENET, a partir da busca pelo termo "flavored kefir", foram encontrados quatro resultados, dos quais apenas dois se assemelhavam a esse trabalho, no que diz respeito ao uso da matéria-prima para produção da bebida láctea saborizada. Na patente de Shandong Deyi Dairy Industry CO LTD (2015), além de leite, foram utilizados ingredientes como adoçante e essência, obtendo-se um produto isento de mau cheiro e com características de sabor de um produto original.

Na pesquisa de Shijiazhuang Brothers Iiong Food Ingredients & Additives CO LTD (2012), também foram acrescentados ingredientes como leite condensado, adoçante e espessante, e obtiveram um produto estável sob refrigeração (2-6°C) por até 21 dias, com propriedades funcionais e boas características sensoriais de sabor e textura.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, o leite apresentou as seguintes características: pH igual a 7,00; acidez correspondente a 0,53 g ácido láctico/100 mL, sólidos solúveis de 15,27 °Brix e 4,27 g/100 g de lactose.

A diferença de massa dos grãos de kefir apresentou tendência a se reduzir, sendo de 6,23 em 18 h, e de 4,52 em 36 h, entretanto sem diferença significativa ($p > 0,05$) em todos os tempos. Em 30 h atingiu-se acidez de 1,16 g/100 mL, sem diferença significativa ($p > 0,05$) para a maior, de 1,21 g/100 mL, em 36 horas; o menor pH (4,13); o menor teor de sólidos solúveis (7,17 °Brix); e o menor teor de lactose 2,77 g/100 g.

Ao longo do tempo de fermentação os parâmetros dos kefirs variaram de 5,30 a 4,27 de pH; de 0,77 a 1,21 g/100 mL de acidez; de 12,25 a 7,70 °Brix; e de 3,82 a 3,10 g/100 g de lactose, de 18 a 36 horas, respectivamente.

Nenhuma bebida se enquadrou como de “baixo teor de lactose” segundo a legislação brasileira RDC Nº 135, de 8 de fevereiro de 2017 da ANVISA, pois apresentaram mais de 1 g de lactose por 100 g. A maior concentração de BAL ($5,20 \times 10^9$ UFC/g) ocorreu em 24 horas, com redução após esse tempo. Vale destacar a importância da elevada contagem de BAL, uma vez que este grupo abrange os microrganismos probióticos. Além disso, segundo a Instrução Normativa Nº 46 de 23 de outubro de 2007 (BRASIL, 2007), que preconiza o padrão de identidade e qualidade de leites fermentados, a bebida kefir deve apresentar a concentração mínima de BAL de 10^8 UFC/g durante seu período de validade.

As colônias de leveduras apresentaram-se uniforme, com crescimento de $3,60 \times 10^4$ a $3,10 \times 10^5$ UFC/g ao longo dos tempos de fermentação estudados. Bolores não foram detectados em nenhuma amostra. A acidez aumentou, enquanto o teor de lactose foi reduzido, mas não foi suficiente para a obtenção de um produto sem ou com baixo teor de lactose. Devido à maior acidez e menor pH em 30 h, o que pode ser motivo de rejeição sensorial da bebida, o tempo de 24 h é o mais recomendado para a fermentação, visto que também foi o que apresentou maior contagem de BAL. Mais estudos devem ser realizados com esses grãos para obtenção de uma bebida sem lactose.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O trabalho mostrou que com o grão de kefir utilizado, a 25 °C, o tempo de 24 horas foi o mais adequado para obtenção de concentrações adequadas de bactérias lácticas e de acidez. Entretanto, para o kefir ser sem lactose ou com baixo teor de lactose, ele deve conter no máximo 1g de lactose por 100 g. No presente trabalho, isso só seria possível após 36 horas de fermentação, considerado um tempo muito longo, resultando em uma bebida muito ácida, com elevada probabilidade de rejeição sensorial. Assim, deve-se investir mais na pesquisa dos parâmetros de fermentação para equilibrar as contagens de bactérias lácticas ao teor de acidez e de lactose de forma a atender as legislações de leites fermentados e obter um produto sem lactose.

Palavras-chave: Alimento Funcional; Probióticos; Intolerância a Lactose.

REFERÊNCIAS

- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. APHA Committee on Microbiological Methods for Foods. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4.ed. Washington, 2001. 676 p.
- OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS. **AOAC 2016**: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. 1 ed. New York: Appendix F, 2016.
- BARBOSA, C. R.; ANDREAZZI, M. A. Intolerância à lactose e suas consequências no metabolismo do cálcio. **Anais da V Mostra Interna de Trabalhos de Iniciação Científica**, Maringá, 26-29 Outubro 2010.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. Instrução Normativa nº46, 23 de outubro de 2007. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de

- Leites Fermentados. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder executivo, Brasília, DF, 24 out. 2007. Seção 1, p. 5.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo Brasília, DF, 10 jan. 2001. Seção 1, p. 45.
- COSTA, A. V. S.; NICOLAU, E. S.; TORRES, M. C. L.; FERNANDES, P. R.; ROSA, S. I. R.; NASCIMENTO, R. C. Desenvolvimento e caracterização físico-química, microbiológica e sensorial de bebida láctea fermentada elaborada com diferentes estabilizantes/espessantes. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 1, p. 209-226, 2013.
- DUTCOSKY, S.D. **Análise sensorial de alimentos**. 4 ed. Curitiba: Ed. DA Champagnat, 2013. 531.p.
- IAL (INSTITUTO ADOLFO LUTZ). Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4 ed. São Paulo: IAL, 2008. 835p.
- MAGALHÃES, K. T.; DIAS, D. R.; PEREIRA, G. V. M.; OLIVEIRA, J. M.; DOMINGUES, L.; TEIXEIRA, J. A.; ALMEIDA E SILVA, J. B.; SCHWAN, R. F. Chemical composition and sensory analysis of cheese whey-based beverages using kefir grains as starter culture. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 46, n. 4, p. 871–878, 2011a.
- MAGALHÃES, K. T.; DRAGONE, G.; PEREIRA, G. V. M.; OLIVEIRA, J. M.; DOMINGUES, L.; TEIXEIRA, J. A.; ALMEIDA E SILVA, J. B.; SCHWAN, R. F. 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, n. 1, p. 249–253, 2011b.
- MATTAR, R.; MAZO, D. F. C. Intolerância à Lactose: mudança de paradigmas com a biologia molecular. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 56, n. 2, p. 230-236, 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.
- PEREIRA, M. C. S.; BRUMANO, L. P.; KAMIYAMA, C. M.; PEREIRA, J. P. F.; RODARTES, M. P.; PINTO, M. A. O. Lácteos com baixo teor de lactose: uma necessidade para portadores de má digestão da lactose e um nincho de mercado. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 67, n. 389, p. 57-65, Nov/Dez 2012.
- RODRIGUEZ, V. A.; CRAVERO, B. F.; ALONSO, A. Proceso de elaboración de yogur deslactosado de leche de cabra. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, suppl., p. 109-115, 2008.
- SANTOS, L. F.; SILVA, O. E.; BARBOSA, O. A.; SILVA, O. O. J. Kefir: uma nova fonte alimentar funcional? **Diálogos & Ciência (Online)**, v. 10, p. 1-14, 2012.
- TERRA, F. M. **Teor de lactose em leites fermentados por grãos de kefir**. Brasília-DF: UNB, 2007. 62p. Monografia (Especialização em Tecnologia de Alimentos) - Universidade de Brasília.
- WESCHENFELDER, S.; Caracterização físico-química e sensorial de kefir tradicional e derivados. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.63, n.2, p.473-480, 2011.