

## **Análises microbiológicas para avaliação de viabilidade de Kefir durante estocagem**

**Elton Carvalho Costa<sup>1</sup>; João Damasceno Lopes Martins<sup>1</sup>; Clarisse Maximo Arpini<sup>1</sup>**

1. Universidade Vila Velha – UVV  
Autor correspondente: Clarisse.arpini@uvv.br

### **Resumo**

Por ser um processo caseiro é comum escutar os relatos de consumidores sobre o quanto pode ser laboriosa a produção do Kefir, um probiótico derivado de leite. Com base nisso, o presente trabalho buscou avaliar a viabilidade do Kefir, em geladeira, após seu preparo segundo a metodologia russa que consiste em dois processos fermentativos sucessivos em um período de 36 a 48h. Para as análises foram realizadas culturas microbianas de acordo com os principais grupos encontrados nas nossas amostras (bactérias ácido-láticas, bactérias acéticas, leveduras e bactérias mesófilas não lácticas ou acéticas). Os resultados indicaram que a viabilidade, sob refrigeração, pode ser considerada de até 15 dias.

### **Introdução**

Os probióticos são alimentos compostos por organismos vivos que, após sua ingestão em quantidades adequadas, conferem benefícios para a saúde do hospedeiro. A maioria dos probióticos é encontrada em produtos lácteos fermentados. O Kefir, derivado de leite fermentado pela simbiose em bactérias e leveduras, tem sua origem ainda incerta, mas sabe-se que é proveniente das regiões do Cáucaso (Sánchez et al, 2009; Socool et al, 2010; Leite et al, 2013; Costa et al, 2016). Outras nomenclaturas encontradas para o Kefir são: Kefyr, Kephir, Kefer, Kiaphur, Knapon, Kepi e Kippi (Sarkar, 2017).

Estudos recentes apontam o valor do Kefir na melhora dos parâmetros fisiológicos e saúde após a ingestão regular, como a atuação direta sobre a microbiota intestinal, por meio de bacteriocinas, competindo com bactérias patogênicas, regulando a microbiota, melhorando a resposta imunológica e inflamatória, regulando pressão arterial dentre outros relatos (Leite et al, 2013; Frisquez et al, 2015; Costa et al, 2016).

O consumo do Kefir é muito difundido em países asiáticos, europeus, norte americanos e do norte da África (Sarkar, 2017). Em muitos países europeus, e norte-americanos, o Kefir é produzido comercialmente, porém no Brasil a cultura ainda é da produção artesanal e familiar onde, na maioria das vezes, não há a comercialização e sim a doação (Leite et al, 2013; Behera et al, 2017). Na cultura brasileira o kefir deve ser preparado diariamente, com base na metodologia russa de preparação, passando por dois processos fermentativos a cada 18 a 24h, o que gera questionamentos sobre a produção ser laboriosa (Leite et al, 2013; Barukčić et al, 2017).

## **Materiais e métodos**

Foram preparadas três amostras de Kefir de mesma origem, porém em tempos diferentes. Cada uma das amostras foi preparada com leite integral de vaca e seus filtrados finais (leite fermentado após 48h totais de processo) foram encaminhados para o laboratório de Microbiologia sob refrigeração. Para os testes foram utilizados Agar Man, Rogosa e Sharpe (MRS) para o cultivo de bactérias ácido-láticas (LAB), Agar Sabouraud Dextrose com Cloranfenicol (SAB), para cultivo de leveduras, Agar Acetobacter (AA) com Glicose acrescido de 2% de Etanol, para o cultivo de bactérias acéticas, e Agar Nutriente (NUT) para o crescimento de outras bactérias não ácido láticas (Bac not LAB).

Os filtrados do Kefir foram homogeneizados e uma alíquota de cada amostra foi retirada para a realização de diluições seriadas e cultivo por espalhamento em superfície. Após as inoculações, as placas com Agar MRS foram acondicionadas em jarras de anaerobiose com sachês redutores de oxigênio, e incubadas a 36°C por 48h a 72h. As placas com Agar NUT e as placas com Agar SAB foram incubadas a 36°C por 24h a 48h. As placas com Agar AA foram incubadas a 29°C por 96h. Os testes foram realizados em triplicata. Foi aferido o pH das amostras aliquotadas.

Os filtrados de Kefir foram acondicionados em geladeira (8°C) e o teste foi repetido após 5, 8 e 15 dias.

## **Resultados e discussões**

Apesar dos relatos populares de aumento da acidez ao paladar após mais de dois dias de estocagem em geladeira, não houve alteração em nossas medições. Nossa amostra permaneceu com o pH igual a 4,5 mesmo após 15 dias de estocagem.

A contagem microbiana apresentou um decréscimo (tabela 1), porém de acordo com o *Codex Alimentarius* (FAO, 2003) o desejado para o consumo de Kefir é que ele tenha, no mínimo,  $10^7$ CFU/g de bactérias iniciadoras e, no mínimo,  $10^4$  CFU/g de leveduras. Irigoyen et al. (2005)

também relatam nenhuma alteração de pH durante estocagem de kefir assim como um decréscimo na contagem microbiana apresentou valores muito próximos ao nosso no mesmo período.

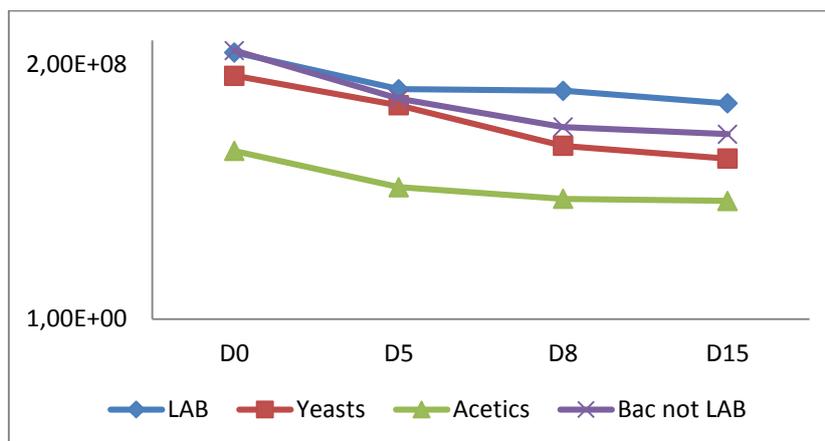
**Tabela 1:** Contagem microbiana média de Kefir após estocagem sob refrigeração (8°C a 10°C)

Tempo *	Contagem microbiana média (UFC/g)				Contagem total bacteriana
	MRS	AA	NUT	SAB	
0 dias	$4,81 \times 10^8$	$2,96 \times 10^5$	$5,52 \times 10^8$	$8,40 \times 10^7$	$1,03 \times 10^9$
5 dias	$3,06 \times 10^7$	$1,97 \times 10^4$	$1,50 \times 10^7$	$9,15 \times 10^6$	$4,56 \times 10^7$
8 dias	$2,72 \times 10^7$	$8,20 \times 10^3$	$1,80 \times 10^6$	$4,36 \times 10^5$	$2,90 \times 10^7$
15 dias	$1,06 \times 10^7$	$7,01 \times 10^3$	$1,05 \times 10^6$	$1,67 \times 10^5$	$1,16 \times 10^7$

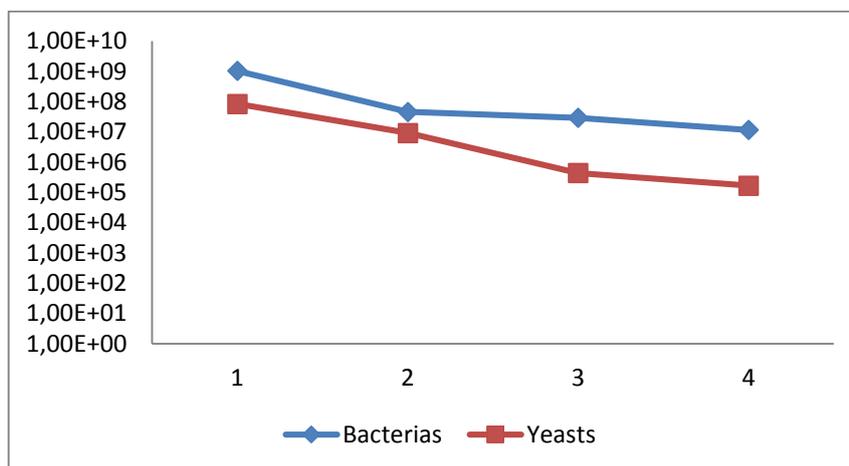
\*dias após a segunda fermentação

O armazenamento, mesmo sob refrigeração, após 15 dias refletiu na aparência e odor do Kefir, assim como nos resultados dos cultivos que se mostraram alterados na contagem e nas características microbianas.

O desempenho das culturas de Kefir pode ser melhor observado nos gráficos 1 e 2, onde é possível verificar que, apesar da queda da contagem microbiana, não houve uma perda elevada que comprometesse a nossa amostra.



**Gráfico 1** : Desempenho das culturas de kefir após acondicionamento sob refrigeração.



**Gráfico 2** : Desempenho das culturas de kefir após acondicionamento sob refrigeração de acordo com o total de bactérias e o total de leveduras.

Geralmente o número total de LAB no Kefir é maior ( $10^8$  a  $10^9$ ) que o número de bactérias acéticas ( $10^5$  a  $10^6$ ) e leveduras ( $10^5$  a  $10^6$ ), porém as condições de fermentação podem causar alterações nestes números. Quando há presença de *Candida kefir* na composição do grão, os *Lactobacillus kefir* apresentam melhor crescimento (Garrote et al. 2001; Farnworth, 2005), como é o caso do nosso (quadro 1) onde foi realizado o levantamento dos microrganismos existentes (Klippel et al, 2016; Frisquez et al, 2015).

Apesar de a maior população de microrganismos do Kefir ser composta por bactérias, as leveduras representam um importante papel tanto na manutenção da simbiose quanto nas características físico-químicas e sensoriais do Kefir, como o etanol e o  $CO_2$  (Farnworth, 2005; Cassanego et al, 2015).

**Quadro1:** Relação de microrganismos presentes no Kefir utilizado em nossos estudos (Klippel et al, 2016; Frisquez et al, 2015)

<b>Microrganismos isolados no Kefir</b>	
<i>Acetobacter aceti</i>	<i>Lactobacillus delbruecki delbruecki</i>
<i>Acetobacter / Gluconobacter oxydans</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>
<i>Acetobacter sp</i>	<i>Lactobacillus frutivorans</i>
<i>Candida famata</i>	<i>Lactobacillus kefir</i>
<i>Candida kefir</i>	<i>Lactobacillus kefiranoferiens</i>
<i>Candida krusei</i>	<i>Lactococcus lactis lactis</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides cremonis</i>
<i>Geotrichum klebahnii</i>	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>
<i>Lactococcus brevis</i>	<i>Streptococcus salivarius thermophilus</i>

As características sensoriais foram avaliadas apenas subjetivamente, portanto não foram descritas neste trabalho, porém Irigoyen et al. (2005) em seu trabalho avaliaram as características organolépticas e a aceitabilidade do Kefir estocado, encontrando uma aceitabilidade sensorial até o sétimo dia, apesar das análises bromatológicas terem apresentado constância nos valores de gorduras totais, lactose e matéria seca até o 14º dia de estocagem.

## Conclusões

Verificamos, após as análises que o Kefir possui uma viabilidade, sob refrigeração, de 15 dias, no máximo. A estocagem por tempo superior não se mostrou confiável, apresentando alterações sensoriais e culturas microbianas com alterações na contagem e nas características microbianas, porém, com base em outros, apesar dos resultados de viabilidade microbiana serem condizentes com os nossos, análises organolépticas recomendam que, para o consumo, o período máximo de estocagem é de 07 dias.

## Referências

- Barukčić, Irena ; Graci, Leo; Jambrak, Anet Režek; Božanic, Rajka. **Comparison of chemical, rheological and sensory properties of kefir.** *Mljekarstvo* 67 (3), 169-176 (2017).
- Behera SK; Panda SK, Kayitesi E, Mulaba-Bafubiandi AF. **Kefir and Koumiss – origin, health benefits and current status os knowledge.** *Fermented Food—Part II: Technological Interventions.* 2017.

- Cassanegro DB, Richards NSPS, Mazutti MA, Ramírez-Castrillón M. **Leveduras: diversidade em kefir, potencial probiótico e possível aplicação em sorvete.** *Ciência e Natura* v.37, Ed. Especial-Nano e Microencapsulação de compostos bioativos e probióticos em alimentos, 2015, p. 175– 186
- Costa EC, Ghizi AC, Maia JF, Arpini CM (2016) **Kefir and Intestinal Health.** *JSM Biotechnol Bioeng* 3(2): 1052
- Edward R. Farnworth. **Kefir – a complex probiotic.** *Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods* 2 (1) 1–17. 2005
- FAO/WHO. 2003. **CODEX Standard for Fermented Milks - 243.** Available at <[www.fao.org/input/download/standards/400/CXS\\_243e.pdf](http://www.fao.org/input/download/standards/400/CXS_243e.pdf)>
- Friques. AGF; Arpini, CM; Kalil, IC; Gava, AL; Leal, MA; Porto, ML; Nogueira, BV; Dias, AT; Andrade, TU; Pereira, TMC; Myrelles, SS; Campagnaro, BP; Vasquez, EC. **Chronic administration of the probiotic kefir improves the endothelial function in spontaneously hypertensive rats.** *J Transl Med* (2015) 13:390.
- Garrote GL, Delfederico L, Bibiloni R, Abraham AG, Perez PF, Semorile L, De Antoni GL (2004) **Lactobacilli isolated from kefir grains: evidence of the presence of Slayer proteins.** *Journal of Dairy Research* 71: 222-230.
- Irigoyen A, Arana I, Castiella M et al. **Microbiological, physicochemical and sensory characteristics of kefir during storage.** *Food. Chem.*, v.90, p.613-20, 2005
- Klippel BF, Duemke LB, Leal MA, Friques AGF, Dantas EM, Dalvi RF, Gava AL, Pereira TMC, Andrade TU, Meyrelles SS, Campagnaro BP, Vasquez EC. **Effects of Kefir on the Cardiac Autonomic Tones and Baroreflex Sensitivity in Spontaneously Hypertensive Rats.** *Frontiers in Physiology.* 2016, Volume7, 211.
- Leite, AM O; Miguel, MAL; Peixoto, RS; Rosado, AS; Silva, JT; Paschoalin, VMF. **Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage.** *Brazilian Journal of Microbiology* 44, 2, 341-349 (2013)
- Sánchez B, Reyes-Gavilán CGDL, Margolles A, Gueimonde M. **Probiotic fermented milks: Present and future.** *Int J Dairy Technol.* 2009; 62: 472-483.

Sarkar, S (2007) "**Potential of kefir as a dietetic beverage – a review**", British Food Journal, Vol. 109 Issue:4, pp.280-290

Socol CR, Vandenberghe LPS, Spier MR, Medeiros ABP, Yamaguishi CT, Lindner JDD, et al. **The Potential of Probiotics: A Review**. Food Technol Biotechnol. 2010; 48: 413-434.