

DESENVOLVIMENTO DE PRODUTO DESIDRATADADO A BASE DE KEFIR FERMENTADO EM SORO DE LEITE UTILIZANDO GOMA ACÁCIA E PECTINA COMO MICROENCAPSULANTES

Gustavo Périco Patriani (IC) e Isabela Rosier Olimpio Pereira (Orientador)

Apoio: PIBITI CNPq

RESUMO

O Kefir é um leite fermentado obtido a partir da fermentação dos grãos de Kefir, composto por diferentes cepas de microrganismos. A microencapsulação por spray-drying possui como vantagens a produção de grande quantidade de material, alta viabilidade econômica e alta capacidade de maleabilidade da técnica para a estabilidade dos microrganismos. O objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de produto lácteo fermentado a partir de grãos de Kefir e soro de leite desnatado e subsequente desidratação por spray dryer utilizando goma acácia e pectina como microencapsulantes. Para isso, foi realizada inicialmente uma triagem para avaliar as melhores condições de fermentação em diferentes tipos de soro de leite (desnatado e desmineralizado, a 8, 10 e 12% de sólidos) com análises de pH, crescimento dos grãos e análise microbiológica. Após a escolha do soro de leite desnatado a 8 e 10%, a secagem foi realizada em um mini-spraydryer (LabMiq do Brasil MSD1.0) utilizando soro líquido puro e com adição de microencapsulantes (goma acácia e pectina). O controle microbiológico foi feito imediatamente antes e após o processo de secagem para avaliação da sobrevivência de microrganismos. Após a fermentação, o crescimento dos grãos e o pH foram muito próximos em todas as concentrações, e quando comparados os dois tipos de soro, a variação entre eles também não é significativa. Em relação a análise microbiológica, após fermentação, o soro de leite encontra-se dentro dos padrões exigidos. Já o soro de leite desmineralizado não forneceu a contagem de bactérias lácticas exigidas pela legislação. Após o processo de secagem observou-se que a contagem de microrganismos na forma líquida foi estatisticamente maior quando comparados com as micropartículas resultantes da secagem por atomização ($p < 0,05$). Porém a desidratação por spray dryer com a utilização de goma acácia e pectina como microencapsulantes no soro fermentado não se mostrou eficiente, devido à maior redução de bactérias lácticas, lactobacilos e leveduras no processo de secagem.

Palavras-chave: kefir, soro de leite, spray-dryer

ABSTRACT

Kefir is a fermented milk obtained from the fermentation of Kefir grains, composed of different strains of microorganisms. The advantages of micro-encapsulation by spray-drying are the production of a large amount of material, high economic viability and high malleability capacity of the technique for the stability of microorganisms. The objective of this work is the development of a fermented dairy product from kefir grains and skimmed whey and subsequent spray dryer dehydration using acacia gum and pectin as microencapsulants. For this purpose, a screening was initially carried out to evaluate the best fermentation conditions in different types of whey (skimmed and demineralized, at 8, 10 and 12% solids) with pH analysis, grain growth and microbiological analysis. After choosing 8 and 10% skimmed whey, drying was performed in a mini-spraydryer (LabMaq do Brasil MSD1.0) using pure liquid whey and with the addition of microencapsulants (acacia gum and pectin). The microbiological control was done immediately before and after the drying process to evaluate the survival of microorganisms. After fermentation, grain growth and pH were very close at all concentrations, and when comparing the two types of whey, the variation between them is also not significant. Regarding microbiological analysis, after fermentation, the whey is within the required standards. Demineralized whey, on the other hand, did not provide the count of lactic acid bacteria required by law. After the drying process, it was observed that the count of microorganisms in liquid form was statistically higher when compared to the microparticles resulting from spray drying ($p < 0.05$). However, spray dryer dehydration with the use of acacia gum and pectin as microencapsulants in the fermented serum was not efficient, due to the greater reduction of lactic bacteria, lactobacilli and yeasts in the drying process.

Keywords: kefir, whey, spray-dryer

1. INTRODUÇÃO

1.1 PROBLEMA DE PESQUISA

O termo probiótico deriva do grego e significa “pró-vida” (COPPOLA; TURNES, 2004). Segundo a Organização Mundial de Gastroenterologia (2011), probióticos são “microorganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro”. O Kefir é um leite fermentado obtido a partir da fermentação dos grãos de Kefir, composto por diferentes cepas de microrganismos que incluem leveduras, bactérias ácido-láticas e ácido-acéticas que estão aderidos a uma trama de polissacarídeos denominada Kefiran (ATALAR; DERVISOGLU, 2015). As relações simbióticas entre estes microrganismos são responsáveis pelas especificidades desta bebida probiótica que possui sabor ácido suave e aroma característico. Diversos benefícios são atribuídos ao Kefir, tais como estimulação do sistema imune, inibição do crescimento de tumores e de microrganismos patogênicos, regularização do trânsito intestinal e redução de colesterol (GOLOWCZYC et al., 2011). O Kefir também é rico em nutrientes, tais como vitaminas, minerais e aminoácidos essenciais que auxiliam no tratamento e manutenção das funções do corpo (OTLES; CAGINDI, 2003).

Em partes dos continentes asiático, europeu, africano e norte americano, o Kefir ocupa um importante lugar na dieta humana devido a seus significativos valores terapêutico e nutricional (OTLES; CAGINDI, 2003; SARKAR, 2007). Sua produção é conhecida em diversos países, como Rússia, Canadá, Suécia, onde é consumido com relevância, mas no Brasil, a sua maior produção ainda é artesanal para consumo próprio (PRADO et al, 2013; MACHADO et al, 2012). Nos Estados Unidos, este produto é comercializado há mais de 20 anos. No Brasil, o interesse pelo produto tem aumentado, representando um desafio tecnológico. O cultivo de Kefir não é uma tarefa muito prática diante da rotina da vida nas grandes cidades e envolve muitos cuidados (ROSA et al., 2017). Muitos consumidores preferem produtos mais práticos e rápidos, sem abrir mão da “saudabilidade” (BRASIL FOOD TRENDS, 2010). Uma pesquisa realizada pela FIESP/IBOPE (BRASIL FOOD TRENDS, 2010) concluiu que, entre as tendências observadas para o consumo de alimentos no Brasil, “Conveniência e Praticidade” é o quesito mais importante para 34% da população. O quarto quesito mais importante foi “Saudabilidade e Bem-estar”, para 21% da população.

O desenvolvimento de um produto a base de Kefir desidratado representa “Saudabilidade e Bem-estar”, além de “Conveniência e Praticidade” ao consumidor que não precisa realizar a fermentação caseira do produto. Deste modo, entende-se que o desenvolvimento de Kefir desidratado gera um produto que pode ser consumido como

suplemento em cápsulas ou comprimidos com grandes possibilidades futuras no mercado brasileiro, embora a reconstituição da bebida também seja uma possibilidade.

Porém para a produção industrial de células probióticas, estas devem manter-se estáveis e viáveis em níveis satisfatórios durante todo o prazo de validade do produto (SAAD, 2006; ARAÚJO, 2007). A redução da atividade de água é uma estratégia para aumentar estabilidade e viabilidade de microrganismos (GOLOWCZYC et al., 2011). A desidratação de Kefir para obtenção de um pó pode aumentar o prazo de validade, reduzir custos de armazenamento, além de aumentar a praticidade na comercialização e utilização do produto.

1.2 JUSTIFICATIVA

No Brasil, é possível comprar os grãos de Kefir desidratados, mas o consumidor precisa hidratar os grãos e proceder com a fermentação caseira para produzir seu leite fermentado (Kefirado), o que não é uma tarefa muito prática diante da rotina da vida nas grandes cidades. Existe um produto importado do Canadá (Yogourmet®) disponível para venda no Brasil, que é uma cultura iniciadora para o preparo do Kefir, mas é composta de microrganismos isolados liofilizados. Embora já seja uma evolução em praticidade em relação ao uso dos grãos, ainda é necessário preparar seu próprio Kefir, além de ser um produto caro. A liofilização é um método eficiente para desidratação de microrganismos, mas tem um custo de produção muito elevado (ATALAR; DERVISOGLU, 2015).

Além de toda sua versatilidade, a tecnologia empregada para o desenvolvimento do Kefir desidratado, e a matéria-prima a ser utilizada, torna o produto ainda mais atrativo em termos financeiros, tanto para quem irá fabricar o produto, quanto para quem irá fazer o seu consumo. Para o desenvolvimento do presente projeto, pretende-se utilizar a técnica de atomização, utilizando um equipamento denominado spray dryer, que em comparação a liofilização, possui custos de processamento comercialmente viáveis, o que gera um grande interesse comercial sobre o produto. A utilização do soro do leite desnatado em pó como matéria prima para a fermentação dos grãos, também surge como um diferencial desse trabalho, uma vez em que apresenta baixo custo e, por si, protege os microrganismos (PETROVIC et al., 2007).

A microencapsulação é uma técnica que permite o empacotamento de partículas ou pequenas gotas de material líquido ou gasoso. O material externo é chamado agente encapsulante, enquanto o ingrediente interno é denominado material ativo, no caso o probiótico. A microencapsulação de probióticos pode ser realizada por diversas técnicas, como *spray-congealing* que consiste na solidificação do material por congelamento do revestimento, método eletrostático que parte do princípio de oposição das cargas para gerar

a interação dos componentes e também pela técnica de *spray dryer*, que realiza a atomização dos componentes por nebulização e posterior secagem do material por evaporação. A microencapsulação por *spray-drying* possui como vantagens a produção de grande quantidade de material, alta viabilidade econômica e alta capacidade de maleabilidade da técnica para a estabilidade dos microorganismos (MENEZES et al., 2013).

O presente projeto é parte de um projeto maior do nosso grupo de pesquisa que resultou em um projeto PIPE fase 1 aprovado recentemente (FAPESP- 2018/00374-1) vinculado a uma pequena empresa estabelecida na incubadora da Universidade Presbiteriana Mackenzie (Tekóporã Alimentos e Probióticos®). Como resultado preliminar, já foi obtido um produto a partir da desidratação de leite desnatado em pó fermentado com Kefir que possui elevada sobrevivência de bactérias lácticas (9 log UFC/g após secagem). Os microrganismos foram microencapsulados na própria matriz caseína/proteínas do soro de leite e Kefiran do leite fermentado (processo sigiloso a ser patenteado e ainda não publicado), obtendo microcápsulas já analisadas por microscopia eletrônica de varredura contendo bactérias probióticas de diferentes espécies.

O presente projeto é, portanto, uma continuidade dos resultados descritos acima e pretende avaliar se o uso de soro de leite e microencapsulantes melhoram a qualidade do produto já obtido. A proposta é uma solução à falta de praticidade de utilização do Kefir, desenvolvendo um produto barato pelo uso de soro de leite e a técnica de *spray drying* e que tenha elevada sobrevivência de microrganismos benéficos à saúde.

A ANVISA define probiótico como microrganismo vivo que, quando administrado em quantidades adequadas, confere um benefício à saúde do indivíduo. O uso de probióticos em alimentos requer a comprovação da sua segurança e benefícios à saúde. (BRASIL, 2018). Portanto, os possíveis efeitos probióticos do produto proposto neste projeto precisam ser posteriormente comprovados por estudos clínicos.

1.3 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de produto lácteo fermentado a partir de grãos de Kefir e soro de leite desnatado e subsequente desidratação por *spray dryer* utilizando goma acácia e pectina como microencapsulantes.

1.3.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- A) Fermentar o Kefir em soro de leite desnatado em pó (soro doce) reconstituído a 8,10 e 12% (m/m) em água;
- B) Avaliar o comportamento de fermentação e secagem do Kefir em soro de leite;
- C) Avaliar o efeito da adição de goma acácia e/ou pectina como agentes microencapsulantes ao fermentado de Kefir obtido a partir do soro de leite desnatado

reconstituído sobre:

- (i) A sobrevivência dos microrganismos após a secagem por *spray dryer*;
- (ii) O teor de umidade residual do pó e rendimento do processo após secagem por *spray dryer*.
- (iii) Determinar o valor de Atividade de água (A_w) do soro de leite fermentado e seco por *spray dryer*.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

Os probióticos possuem capacidade de modular a microbiota intestinal, tornando-a desejável, já que protege o hospedeiro, dificultando o crescimento de microorganismos patogênicos. Auxiliam na manutenção de sua saúde, impedindo a reabsorção de compostos aminados indesejáveis, decompondo ácidos biliares, biodisponibilizando minerais como cálcio, ferro e outros nutrientes, além de estimular o sistema imunológico e atividades antitumorogênica e antimutagênica (BUJALANCE et al., 2007; COOK, et al., 2012). Leite et al. (2013) descreve também como propriedade dos probióticos, a diminuição da intolerância a lactose.

Segundo a Instrução Normativa nº 46/07, Kefir é um produto resultante da fermentação do leite pasteurizado ou esterilizado, por cultivos ácido-lácticos elaborados com grãos de Kefir, que contém *Lactobacillus Kefir* e diversas espécies que produzem ácido láctico, etanol e dióxido de carbono. Os grãos de Kefir são ainda constituídos por leveduras fermentadoras de lactose e leveduras não fermentadoras de lactose, além de outros microorganismos, como *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium sp.* e *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* (BRASIL, 2007).

O Kefir também é conhecido por *Kefyr*, *Kephir*, *Kefer*, *Kiaphur*, *Knapon*, *Kepi* e *Kippi* (CARNEIRO, 2010). Apresenta-se como grãos gelatinosos, com propriedades organolépticas definidas para cada combinação microbiológica (DINIZ; CARVALHO; SCHNEENEDORF, 2003), visto que contém mais de 40 cepas de bactérias e leveduras (PRADO et al., 2013).

No Sudoeste da Ásia, Leste e Norte da Europa, América do Norte, Japão, Oriente Médio, Norte da África e Rússia é largamente consumido (OTLES e CAGINDI, 2003; SARKAR, 2007). Em alguns países sua produção em nível industrial já é conhecida, porém a produção artesanal para consumo próprio prevalece (PRADO et al., 2013; MACHADO et al., 2012). Os grãos de Kefir podem ser cultivados em água com adição de açúcar mascavo ou leite, apresentando baixo custo (MACHADO et al., 2012). A literatura apresenta-se ampla com relação aos benefícios do Kefir, além de colaborar beneficemente com o trato

gastrintestinal, também apresenta função antimicrobiana muito importante, através de seus substratos bioativo (LEITE et al., 2013; DIAS et al., 2016).

É necessário ampliar a produção industrial do Kefir. A liofilização tem sido a técnica mais utilizada para desidratação de microrganismos (ATALAR; DERVISOGLU, 2015), mas é um processo muito caro, o que eleva o custo ao consumidor (ORDÓÑEZ et al., 2005). Alternativamente, a secagem por *spray dryer* pode ser utilizada para este fim, mas devido às condições de temperatura e pressão osmótica durante o processo, existe um alto índice de perda de viabilidade dos microrganismos (MENEZES, et al. 2013). Desse modo, deve-se utilizar de algumas estratégias para aumentar a sobrevivência dos microrganismos.

A fim de otimizar a viabilidade dos microrganismos sujeitos a secagem por atomização, autores como Golowczyc et al. (2011) e Castro-Cislaghii, Fritzen-Freireii e Sant'anna, (2012) têm estudado o possível uso de agentes microencapsulantes como a goma acácia, proteína do soro do leite, leite desnatado e goma do cajueiro para este fim (PETROVIC et al., 2007).

Os principais agentes encapsulantes utilizados são: carboidratos (amido, maltodextrinas, xarope de milho, sacarose e ciclodextrinas), celulose (carboximetilcelulose e derivados), gomas (arábica, ágar, alginato, agarose, carragenana), lipídeos (ceras, parafinas e ácidos graxos), proteínas (glúten, caseína, gelatina, albumina), quitosana e alguns materiais inorgânicos. De maneira geral, os encapsulantes devem possuir características específicas, tais como, baixa viscosidade em concentrações elevadas, ser de fácil manipulação durante o processo, baixa higroscopicidade para facilitar a manipulação e evitar aglomeração, habilidade para dispersar ou emulsificar e estabilizar o material ativo, não ser reativo com o mesmo, além de ter a habilidade selá-lo e segurá-lo dentro da estrutura da cápsula (PAULO; ASSIS; SANTOS, 2009).

A goma acácia tem sido utilizada em microencapsulação devido a sua baixa viscosidade em solução, pela boa retenção de compostos voláteis e por favorecer a estabilidade das emulsões (ABURTO; TAVARES; MARTUCCI, 1998). Além disso, estudos comprovaram que bifidobactérias presentes em probióticos encapsuladas por goma acácia, resistiram à passagem gastrointestinal. Já a pectina pode ser usada como agente microencapsulante pela sua propriedade gelificante. Pesquisas concluíram também que a conjugação pectina/caseína na formação de microcápsulas é eficiente, pois protege algumas bactérias do baixo pH estomacal (PAULO; ASSIS; SANTOS, 2009).

A técnica de microencapsulação dos probióticos é importante porque esses microrganismos tornam-se mais quantificáveis e assim a dose administrada pode ser controlada, a capacidade de resistência e sobrevivência a processos industriais é

aumentada, e essas culturas passam a ter maior funcionalidade frente a indústria, uma vez que podem ser adicionadas a diversos alimentos. Exemplos são os iogurtes, queijos e derivados de leite, sobremesas congeladas e até em biomassas, porque a encapsulação fornece maior proteção contra agentes externos e condições adversas (MENEZES et al., 2013).

O Kefir é comumente fermentado em leite integral, mas o leite desnatado (GOLOWCZYC et al., 2011) e o soro de leite (CASTRO-CISLAGHI; FRITZEN-FREIREII; SANT'ANNA, 2012) têm se mostrado mais eficientes como microencapsulantes para secagem de culturas probióticas por spray-dryer. O soro é a porção aquosa liberada do coágulo durante a fabricação do queijo, de elevado valor nutricional, em termos de lactose e proteínas, e sua utilização tem sido cada vez mais estudada em busca de novas finalidades para sua utilização (BRAVO; OLIVEIRA; TONIAL, 2012)

Não é um produto totalmente utilizável pelas indústrias alimentícias, e na maioria das vezes, é considerado resíduo líquido industrial, sendo despejado junto a outros resíduos líquidos, o que acarreta na duplicação do sistema de tratamento, gerando maiores custos a indústria, uma vez em que o descarte desse resíduo gera efluentes com uma elevada carga orgânica, refletindo em uma Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) elevada, entre 25.000 e 80.000 mg/L (PAWLOWSKY; GIROTO, 2001).

Assim sendo, este trabalho pretende avaliar a fermentação de soro de leite desnatado (em pó) reconstituído utilizando grãos de Kefir e posterior desidratação por spray dryer com o uso de microencapsulantes, visando à sobrevivência dos microrganismos, e utilizando um meio de cultura (soro de leite) economicamente viável às indústrias, prático e de baixo custo aos consumidores que buscam por produtos probióticos viáveis. E além do baixo custo de produção e sua versatilidade, o produto proposto não causará impactos agravantes ao meio ambiente.

Resultados preliminares já indicam a viabilidade desta pesquisa em que foi possível obter sobrevivência de bactérias lácticas na ordem de 9 log UFC/g após secagem por spray dryer com fermentação em leite desnatado sem adição de microencapsulantes. Espera-se que com o uso de soro de leite em pó e microencapsulantes essa sobrevivência aumente e o custo de produto proposto seja bem menor.

3. METODOLOGIA

3.1 Origem, congelamento e ativação dos grãos de Kefir.

Os grãos de Kefir utilizados foram cultivados no laboratório de Bromatologia da Universidade Presbiteriana Mackenzie desde 2016. Eventualmente, os grãos são congelados a -20°C em soro de leite desnatado por até 2 meses. Para reutilização dos grãos

congelados, eles foram ativados a 5% (m/m) em 1 L de leite desnatado UHT (concentração de sólidos ~10%) por 24h a $30^{\circ}\text{C} \pm 2$. Após este tempo, os grãos foram coados em peneira fina e submetidos a uma nova fermentação do mesmo modo. Após 2 ciclos de ativação em leite UHT, os grãos passaram por um processo de adaptação em soro de leite desnatado em pó reconstituído a 10% em água potável. Foi realizado o mesmo procedimento de ativação em leite, porém foram realizados 5 ciclos de troca do soro de leite antes do início do experimento em si.

3.2 Avaliação do processo e o crescimento fermentativo do Kefir em soro de leite desnatado.

Após ativação, e antes de iniciar a secagem por spray dryer foram realizados testes iniciais em diferentes tipos (Soro de leite desnatado e Soro de leite desnatado e desmineralizado, ambos da marca Alibra ingredientes Ltda) e concentrações (8, 10 e 12%) de soro de leite para observar o comportamento dos grãos em cada tipo de soro, para isso foram feitos testes de crescimento dos grãos, pH e análise microbiológica.

Após a definição do Soro a ser utilizado, os grãos foram colocados para fermentação conforme tabela 1, totalizando 4 amostras (em triplicata) com massa de 500g. As amostras foram obtidas a partir da dissolução de soro de leite em pó desnatado em água potável para obter a concentração desejada. Os grãos foram adicionados ao soro de leite e deixados a 30°C por 24h para fermentação. Após este período, o produto fermentado foi diluído em água destilada na proporção 1:1 antes da secagem por *spray dryer*. As amostras GA, Pc e GA+Pc (tabela 1) receberam os aditivos (goma acácia e pectina) na concentração de 10% em massa sobre a matéria seca do fermentado e então foram homogeneizados e deixados em agitação por 30 minutos a 30°C antes da secagem. Foram retiradas amostras de 10 mL de cada etapa para controle da fermentação pela medida de pH utilizando um potenciômetro (soro reconstituído antes e após inoculação dos grãos, após 24 horas de fermentação e imediatamente antes da secagem). Foi retirada uma alíquota de 1g de cada replicata (imediatamente antes e depois da secagem) para o controle do crescimento microbiológico e eficiência de secagem (análise de umidade e atividade de água).

Tabela 1 – Composição das amostras preparadas para secagem

Amostra	% Soro de leite desnatado (m/m)	% grãos de Kefir (m/m)	Goma acácia (%m/m)	Pectina (%m/m)
SL	10	5	-	-
GA	10	5	1	-
Pc	10	5	-	1
GA+Pc	10	5	1	1

3.3 Secagem por spray dryer.

A secagem foi realizada em um mini-spraydryer (LabMiq do Brasil MSD1.0) a um fluxo de 0,5L/h, Temperaturas de alimentação, entrada e saída de 9, 135 e 78°C, respectivamente, seguindo parâmetros publicados por Atalar e Dervisoglu (2015).

3.4 Análises Microbiológicas.

Este controle microbiológico foi feito imediatamente antes e após o processo de secagem para avaliação da sobrevivência de microrganismos. O controle do crescimento de microrganismos foi realizado para bactérias lácticas e leveduras de acordo com Aplevicz, Ogliari e Sant'anna (2013). A contagem das BAL foi realizada em condições de microaerofilia em meio MRS ágar, a contagem de lactobacilos foi feita em meio de cultura M17 ágar, ambos suplementados com nistatina e cicloheximida (50 mg/mL de cada) para suprimir o crescimento de leveduras. A contagem de leveduras foi realizada em Ágar YGC (extrato de levedura glicose com cloranfenicol). Todas as culturas foram incubadas a 30°C por 3 dias para posterior contagem.

Assepticamente, 1 g de cada amostra foi diluída em 9mL de solução salina peptonada 0,9% esterilizada prosseguindo com diluições seriadas apropriadas para cada amostra em duplicata (APLEVICZ; OGLIARI; SANT'ANNA, 2013). O acompanhamento do crescimento foi feito através da contagem do número de células viáveis em logaritmos (log UFC/g).

O grau de sobrevivência de bactérias lácticas (MRS) e leveduras (YGC), N/No, foi expresso como o quociente da contagem de colônias do Kefir antes da secagem (No) e após a secagem (N).

3.5 Teor de umidade residual e rendimento do pó obtido.

O teor de umidade foi avaliado utilizando 0,5g de amostra em uma balança de umidade Shimadzu (MOC 120H). O rendimento do pó foi calculado após pesagem do pó obtido em balança semi-analítica pela seguinte fórmula:

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{(\text{massa de Kefir em pó obtido após secagem} - \text{teor de umidade \%}) \times 100}{\text{massa de soro de leite em pó inicial usada para fermentação}}$$

3.6 Atividade de Água (Aw)

Para determinar o valor de atividade de água utilizou-se um medidor LabMaster – aw com precisão de ($\pm 0,003$ aw) seguindo os procedimentos indicados pelo fabricante.

4 RESULTADO E DISCUSSÃO

Nos gráficos 1 e 2 , podemos observar que tanto no soro de leite desnatado (SL) quanto no soro de leite desmineralizado (SLD), após a fermentação, o crescimento dos grãos foram muito próximos em todas as concentrações, e quando comparados os dois tipos de soro, a variação entre eles também não é significativa. De acordo com Farnworth (2005) quando os grãos são colocados em leite fresco sua massa pode aumentar em até 25% em aproximadamente 20 horas de fermentação.

Gráfico 1 – Análise de crescimento de grãos de kefir em soro de leite (SL) em diferentes concentrações (8, 10 e 12%) após 24 horas de fermentação a 30° C.

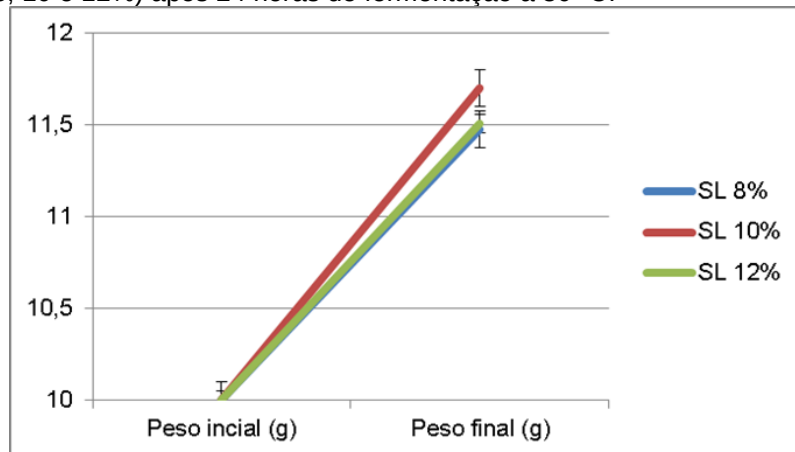
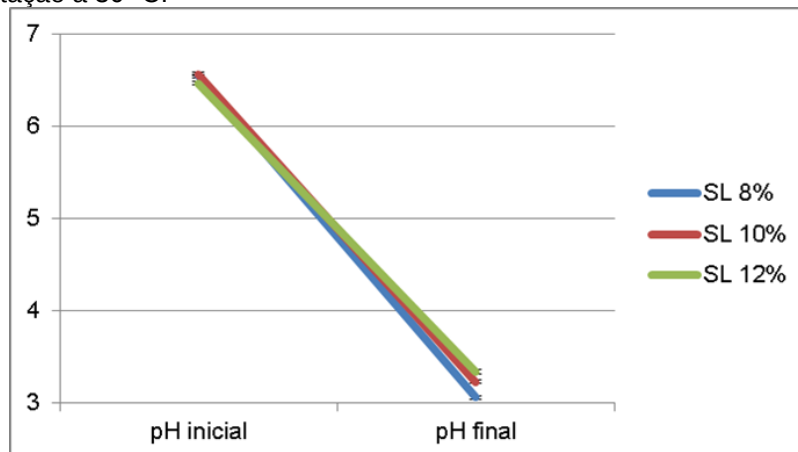


Gráfico 2 – Análise de pH em soro de leite (SL) em diferentes concentrações (8, 10 e 12%) após 24 horas de fermentação a 30° C.



Portanto, após as análises de crescimento de grãos de kefir percebeu-se que não há diferença comparando as concentrações de sólidos e os dois tipos de soro, sendo assim essas variáveis não interferem no desenvolvimento dos grãos. Este crescimento dos grãos pode ser explicado pelo aumento da biomassa de microorganismos e um aumento de proteínas e polissacarídeos na matriz dos grãos (GARROTE; ABRAHAM; DE ANTONI, 2001).

Os gráficos 3 e 4 apresentam o pH das duas amostras de soro do leite antes de iniciar a fermentação, e após 24 horas a 30° C, e ao observar os resultados também podemos observar que ambos os tipos de soro possuem um pH equivalente antes e depois

da fermentação, e que as concentrações de soro também não interferem no pH. Dessa maneira compreende-se que as diferentes concentrações e os dois tipos de soro não influenciam no pH.

Gráfico 3 – Análise de crescimento de grãos de kefir em soro de leite desmineralizado (SLD) em diferentes concentrações (8, 10 e 12%) após 24 horas de fermentação a 30° C.

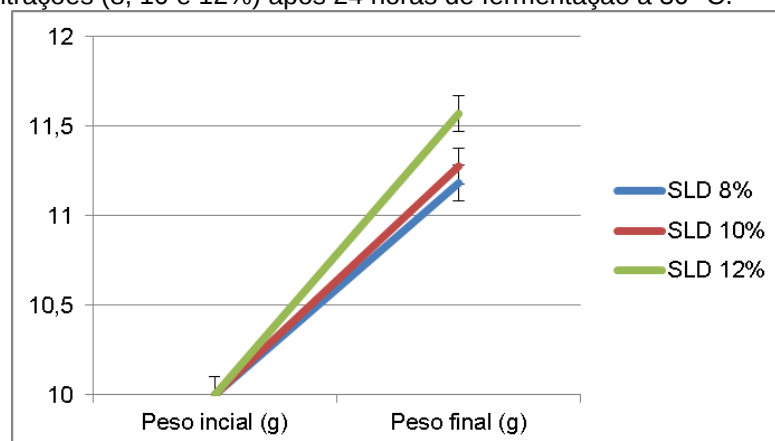
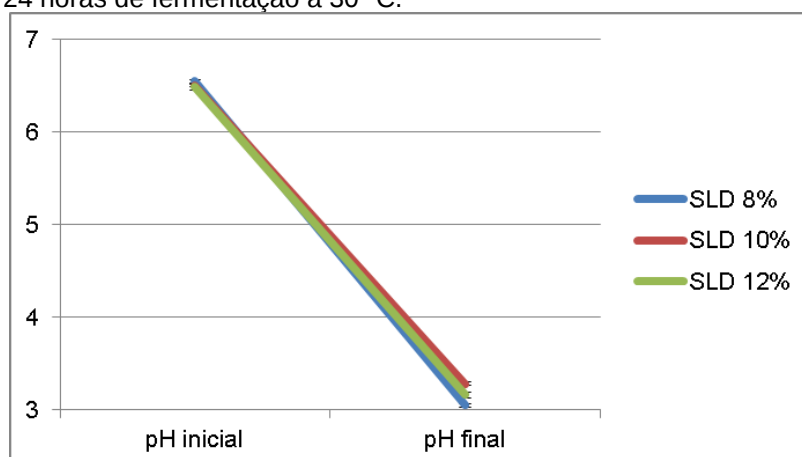


Gráfico 4 – Análise de pH em soro de leite desmineralizado (SLD) em diferentes concentrações (8, 10 e 12%) após 24 horas de fermentação a 30° C.



Um estudo de Weschenfelder et al. (2011) que avaliou os valores de pH em leite fermentado com grãos de kefir em diferentes concentrações por um período de incubação de 24 horas em uma temperatura de 25° C os resultados variaram entre 3,57 e 3,79. Estes valores se aproximam com os encontrados no presente estudo.

Irigoyen et al. (2005) também observaram uma redução de pH na fermentação de leite com grãos de kefir que pode ser explicada devido a degradação da lactose e formação de ácido láctico e outros ácidos orgânicos pelas bactérias presentes nos grãos.

Ao concluir os testes iniciais é possível observar que os grãos de kefir se comportam da mesma maneira nos processos de fermentação nos dois tipos de soro de leite e independente das concentrações de sólidos utilizadas.

Nos testes iniciais de análise microbiológica optou-se por realizar a contagem apenas das amostras contendo 10% de sólidos em ambos os tipos de soro, devido a indiferença entre as concentrações.

Na tabela 2 pode-se observar a contagem microbiológica de bactérias lácticas e leveduras nos diferentes tipos de soro na concentração de 10%. De acordo com a instrução normativa nº 46 de 2007, leites fermentados por kefir devem possuir uma contagem mínima (UFC/g) de 10^4 de leveduras e 10^7 de bactérias lácticas, o que demonstra que o soro de leite (SL) fermentado ficou dentro dos padrões exigidos. Já o soro de leite desmineralizado (SLD) fermentado não atingiu a contagem de bactérias lácticas exigidas pela legislação ($p=0,03$) quando comparado a contagem de BAL entre as amostras.

Tabela 2 – Análise Microbiológica de bactérias lácticas (BAL) e leveduras a 10% da concentração de soro de leite (SL) e soro de leite desmineralizado (SLD) após 24 horas de fermentação a 30° C. O símbolo de asterisco (*) significa diferença estatística entre as amostras ($p<0,05$).

Contagem	Soro de Leite (10%)			
	SL		SLD	
	Média	DP	Média	DP
BAL	7,320*	0,176	6,519	0,090
Leveduras	6,446	0,152	6,168	0,231

Após as primeiras análises, concluiu-se que tanto o soro de leite quanto o soro de leite desmineralizado possuem características similares quando comparados o crescimento dos grãos e o pH. Porém ao realizar a contagem microbiológica pode-se observar que o soro de leite encontra-se dentro dos padrões impostos pela legislação. Sendo assim, decidiu-se pela utilização deste soro a 8 e 10% de sólidos para prosseguir o estudo. As amostras de soro a 12% foram descartadas porque foram inviáveis durante a secagem pelo aumento da viscosidade, elevada umidade e baixo rendimento.

Na tabela 3, podemos observar que quando o soro de leite a 10% foi fermentado por kefir e seco em spray dryer, não apresentou variação de umidade, atividade de água e rendimento ($p>0,05$), independente da utilização de microencapsulantes.

Tabela 3 – Umidade, atividade de água e rendimento em kefir fermentado em soro de leite a 10% e adição de microencapsulantes após secagem por spray dryer. Não foram encontradas diferenças significativas na comparação entre as amostras.

Microencapsulante	Umidade (% m/m)		Aw		Rendimento (% m/m)	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
-						
PURO	3,39	0,64	0,17	0,01	40,22	11,32
GA	3,57	0,58	0,16	0,03	41,39	16,18
GA + PEC	3,94	1,43	0,16	0,04	41,96	8,82
PEC	4,32	0,71	0,18	0,04	32,31	4,15

Um estudo de Maciel (2013) que avaliou a microencapsulação por spray dryer utilizando soro doce e leite desnatado, ambos reconstituídos a 30% de sólidos totais, foi observado umidade média de 4,79 e 4,28 respectivamente, e em relação a atividade de água, os resultados encontrados foram de 0,20 para o soro e 0,15 para o leite desnatado, valores que se aproximam dos obtidos no presente estudo.

Do ponto de vista físico-químico o teor máximo desejável de umidade para soro em pó é de 3,0% e essa especificação está relacionada com o valor de atividade de água, que deve ser aproximadamente 0,2 a 25°C. Esses parâmetros favorecem a preservação do produto evitando o empedramento (SCHUCK, 2011).

A tabela 4 apresenta os resultados do kefir fermentado em soro de leite a 8% de sólidos e seco em spray dryer, os resultados mostram que a umidade e atividade de água são similares quando comparados entre si.

O rendimento do processo com a utilização de pectina foi inferior às demais condições testadas ($P=0,04$). Em um estudo de Silva et al. (2014) que objetivou avaliar o rendimento do pó de extrato de casca de berinjela a partir da secagem por spray dryer, e obteve resultados que variou entre 34,9 a 43,4%, valores que se aproximam com os encontrados neste estudo.

Tabela 4 – Umidade, atividade de água e rendimento em kefir fermentado em soro de leite a 8% e adição de microencapsulantes após secagem por spray dryer. O símbolo de asterisco (*) significa diferença estatística entre as amostras ($p<0,05$).

Microemcapsulante	Umidade (% m/m)		Aw		Rendimento (% m/m)	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
-						
PURO	3,81	0,93	0,15	0,04	44,10	1,88
GA	3,42	0,72	0,16	0,02	48,83	1,69
GA + PEC	3,90	0,29	0,18	0,01	41,47	3,14
PEC	4,41	0,61	0,14	0,01	36,44*	1,17

As tabelas 5 e 6 apresentam os resultados da análise microbiológica do soro de leite fermentado com grãos de kefir nas concentrações 10 e 8% respectivamente, conseguimos observar em ambos que a contagem de microorganismos na forma líquida (antes do processo de spray dryer) foi estatisticamente maior quando comparados com as micropartículas resultantes da secagem por atomização ($p<0,05$). Além disso, em ambas as concentrações não houve sobrevivência significativa de BAL, Lactobacilos e leveduras com a utilização dos microencapsulantes quando comparados com o pó puro.

Tabela 5 – Contagem Microbiológica de bactérias lácticas (BAL), Lactobacilos e leveduras em soro de leite (SL) a 10%, fermentado com grãos de kefir e microemcapsulado em spray dryer. O símbolo de asterisco (*) significa diferença estatística entre as amostras.

Contagem	BAL	Lactobacilos	Leveduras
----------	-----	--------------	-----------

log UFC/g	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Líquido	9,17*	0,35	8,90*	0,33	7,21*	0,45
Pó puro	6,05	0,45	6,13	0,33	0,10	0,17
Pó g. acácia	5,84	0,45	5,84	0,51	0,93	1,60
Pó pectina	5,99	0,74	5,91	0,51	0,00	0,00
Pó ga + pec	5,89	0,49	6,04	0,50	1,20	1,70

Tabela 6 – Contagem Microbiológica de bactérias lácticas (BAL), Lactobacilos e leveduras em soro de leite (SL) a 8%, fermentado com grãos de kefir e microemcapsulado em spray dryer. O símbolo de asterisco (*) significa diferença estatística entre as amostras.

Contagem	BAL		Lactobacilos		Leveduras	
log UFC/g	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Líquido	7,79*	0,73	8,13*	1,59	6,48*	0,49
Pó puro	5,13	0,28	5,03	0,44	0,77	1,33
Pó g. acácia	5,10	0,22	5,02	0,21	0,00	0,00
Pó pectina	5,40	0,14	4,88	0,39	0,00	0,00
Pó ga + pec	5,19	0,58	5,05	0,49	0,00	0,00

Em um estudo de Mesquita (2017) que avaliou a concentração celular de bactérias e leveduras em kefir elaborado com leite pasteurizado e UHT, utilizando os mesmos meios de cultura do presente estudo (MRS, M17 e YGC) encontrou uma contagem em log UFC/g de 7,41 para bactérias, 9,48 para lactobacilos e 6,46 de leveduras no fermentado com leite pasteurizado. Já para o leite UHT as contagens foram 7,16, 9,47 e 6,29 respectivamente. Essas concentrações celulares corroboram com os resultados do presente estudo.

Em um estudo de Jantzen, Gopel e Beermann (2013) que foi avaliado o desempenho da microencapsulação de Lactobacilos reuteri com soro de queijo por spray dryer, foi observado uma redução de 1,81 log UFC/g após o processo de secagem. No presente estudo a variação de Lactobacilos foi superior, apresentando uma redução de 2,77-3,06 log UFC/g no soro a 10% e 3,08-3,25 log UFC/g no soro reconstituído a 8%.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

É possível utilizar o soro de leite reconstituído a 10% como meio para fermentação de kefir, pois nesta condição a contagem microbiológica atingiu os padrões exigidos pela legislação vigente. Porém a desidratação por spray dryer com a utilização de goma acácia e pectina como microencapsulantes no soro fermentado não possui eficácia, devido à redução de bactérias lácticas, lactobacilos e leveduras no processo de secagem.

6 REFERÊNCIAS

ABURTO, L. C.; TAVARES, D. Q.; MARTUCCI, E. T. Microencapsulação de óleo essencial de laranja. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 18, n. 1, p. 45-48, 1998. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010120611998000100010&script=sci_abstract&tlng=pt>. Acesso em: 19 mar. 2018.

APLEVICZ*, K. S.; OGLIARI, P. J.; SANT'ANNA, E. S. **Influence of fermentation time on characteristics of sourdough bread**. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 49, n. 2, apr./jun., 2013.

ARAÚJO, E. A. **Desenvolvimento e caracterização de queijo tipo Cottage adicionado de Lactobacillus Delbrueckii UFV H2b20 e de Inulina**. 2007. 67f. Dissertação (Programa de PósGraduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

ARNWORTH, E. R. Kefir – a complex probiotic. **Food Science e Technology Bulletin: Functional Foods**, v. 2, p. 1-17, 2005.

ATALAR I.; DERVISOGLU M. Optimization of spray drying process parameters for Kefir powder using response surface methodology. **Food Science and Technology**. V.60, [s.n.], p. 751-757, 2015.

BAPTISTA, E.V.; GARCIA, S. **Desenvolvimento de um novo produto desidratado a base de subprodutos de agroindústria com característica simbiótica, fermentado com grãos de Kefir e cultura liofilizada** (Mt 036 Lv). Universidade Estadual de Londrina (BR/PR). Instituto Nacional de Propriedade Intelectual Pedido: PI 1001541-8 A2. Pesquisa realizada em 23/03/2017.

BRASIL. **Instrução Normativa nº 46/07**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento. Disponível em: <<http://www.cidasc.sc.gov.br/inspecao/files/2012/08/instru%C3%87%C3%83o-normativa-n%C2%BA-46-de-23-de-outubro-de-2007.pdf>>. Acesso em: 31 de mar. de 2019.

BRASIL. **Resolução da Diretoria Colegiada- RDC nº 241, de 26 de Julho de 2018**. Brasília: ANVISA. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3898888/RDC_241_2018_.pdf/941cda52-0657-46dd-af4b-47b4ee4335b7>. Acesso em: 31 de mar. de 2019.

BRASIL FOOD TRENDS, PP de População - São Paulo: **Fiesp/Ital**, 2010. Disponível em: <<http://www.ital.sp.gov.br/tecnolat/anais/tl230513/Arquivos/Brasil%20Food%20Trends%202020.pdf>>. Acesso em: 17 mar. 2018.

BRAVO, C.E.C; OLIVEIRA, F.D; TONIAL, B.I. Soro de leite: um subproduto valioso. **Rev. Inst. Latic**, [S.l.: s.n], 2012. p. 64-71.

BRUNO, L. M. **Manual de Curadores de Germoplasma – Micro-organismos: Bactérias Ácido-Láticas**. / Laura Maria Bruno. – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2011. 15 p. – (Documentos / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 336; Documentos / Embrapa Agroindústria Tropical, 151). Disponível em: <<https://www.embrapa.br/documents/1355163/2005846/doc336-151.pdf/4c82dbc8-73bd-4689-a47e-5819e3f1ffc7>>. Acesso em: 14 nov. 2015.

BUJALANCE, C. et. al. A probiotic strain of *Lactobacillus plantarum* stimulates lymphocyte responses in immunologically intact and immunocompromised mice. **International Journal of Food Microbiology**, [s.l.], v. 113, n. 28-34, 2007. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160506004417?via%3Dihub>>. Acesso em: 15 mar. 2018.

CARNEIRO, R. C. **Desenvolvimento de uma cultura iniciadora para produção de Kefir**. 2010. 143 f. Dissertação (Mestre em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/handle/1843/MAFB-8EBKTH/disserta__o_vers_o_finalissima.pdf?sequence=1>. Acesso em: 16 mar. 2018.

CASTRO-CISLAGHII, F.P.; FRITZEN-FREIREII, C.B.; SANT'ANNA, E.S. Potencial do soro de leite líquido como agente encapsulante de Bifidobacterium Bb-12 por spray drying: comparação com goma arábica. **Revista Ciência Rural**, v.42, n.9, p.1694-1700, 2012.

COOK, M. T. et al. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. **Journal of Controlled Release**, [s.l.], v. 162, p. 56-67, 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365912004968?via%3Dihub>>. Acesso em: 17 mar. 2018.

COPPOLA, M. M.; TURNES, C. G. Probióticos e resposta imune. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 4, p. 1297, jul./ago. 2004.

DIAS, P. A. et al. Propriedades antimicrobianas do Kefir. **Arq. Inst. Biol.**, [s.l.], v.83, [s.n.], p.1-5, 2016.

DINIZ, R. O.; CARVALHO, F. F.; SCHNEENEDORF, J. M. Atividade anti-inflamatória de quefir, um probiótico da medicina popular. **Rev. Bras. Farmacogn.**, [s.l.], v.13, n.supl, p.19-21, 2003.

GARROTE GL, ABRAHAM AG, DE ANTONI GL. Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. **J Dairy Res.** 2001;68(4):639-652.

GOLOWCZYC, M.A. et al. Survival of spray-dried Lactobacillus Kefir is affected by different protectants and storage conditions. **Biotechnol Lett.** v.33, [s.n.], p.681–686, 2011.

INPI – INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL. Disponível em: <<https://gru.inpi.gov.br/pePI/servlet/PatenteServletController>>. Acesso em: 27 mar. 2018.

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

JANTZEN, M.; GÖPEL, A.; BEERMANN, C. Direct spray drying and microencapsulation of probiotic Lactobacillus reuteri from slurry fermentation with whey. **Journal of Applied Microbiology**. 115, p. 1029—1036, 2013.

KAMIYAMA, H. A complexidade do DBO. **Revista DAE**, vol. 48, n. 152, p. 25-32, 1998. Disponível em <http://www.revistadae.com.br/artigos/artigo_edicao_152_n_60.pdf>. Acesso em: 17 mar. de 2019.

LAURENTI, E; GARCIA, S. Eficiência de materiais encapsulantes naturais e comerciais na liberação controlada de probiótico encapsulado. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 16, n. 2, p. 107-115, abr./jun. 2013. Disponível em <http://www.scielo.br/pdf/bjft/v16n2/aop_1212.pdf>. Acesso em 26 mar. 2018.

LEITE, A. M. de O. et al. Microbiological, technological and therapeutic properties of Kefir: a natural probiotic beverage. **Brazilian Journal of Microbiology**, [s.l.], v.44, n.2, p.341-349, 2013.

MACHADO, B. A. S. et al, Mapeamento tecnológico de patente de Kefir. **Cadernos de prospecção**, [s.l.], v.5, n.2, p.86-97, 2012.

MACIEL, M. G. **Microencapsulação de lactobacillus acidophilus por spray- drying utilizando soro doce e leite desnatado**. Dissertação (Mestrado em tecnologia de alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, 2013.

MENEZES, C. R. et al. Microencapsulação de probióticos: avanços e perspectivas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.43, n.7, p.1309-1316, 2013.

MESQUITA, A.R.C. **Desenvolvimento e caracterização físico-química e microbiológica de kefir de leite liofilizado**. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2017.

ORDÓÑEZ, J.A. et al. **Tecnologia de Alimentos – Componentes dos Alimentos e Processos**; trad. Fátima Murad – Porto Alegre: Atmed, 2005.Vol. 1. 294 p.

OTLES, S.; CAGINDI, O. Kefir: a probiotic dairy-composition, nutritional and therapeutic aspects. **PakistanJournalofNutrition**, [s./], v. 2, p. 54-59, 2003.

Organização Mundial da Gastroenterologia. **Probióticos e Prebióticos**. 2011. Disponível em <<http://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/probiotics-portuguese-2011.pdf>>. Acesso em 16 mar. 2018.

PAULO, E. M.; ASSIS, S. A.; SANTOS, V. L. C. S. Polímeros constituídos por carboidratos utilizados no processo de microencapsulação de bactérias: uma revisão. **Sitientibus - Série Ciências Biológicas**, Feira de Santana, v. 9, n. 4, p. 185-191, out./dez. 2009.

PAWLOWSKY, U; GIROTO, J.M. O soro de leite e as alternativas para o seu beneficiamento. **Brasil alimentos**, vol. 10, n. 10, p. 43-46, 2001. Disponível em: <<http://www.signuseditora.com.br/BA/pdf/10/10%20-%20Laticinios.pdf>>. Acesso em: 19 de mar.de 2019.

PETROVIĆ, T. et al. Protectionofprobioticmicroorganismsbymicroencapsulation. **CI & CEQ**, [s./], v.13, n. 3, p.169-174, 2007.

PRADO, B. O. et al. Níveis séricos de cortisol basal em ratos sob tratamento oral com Kefir. **Rev. Ciências farmacêuticas**, [s./], v.34, n.3, p. 339-344, 2013.

ROSA DD, DIAS MMS, GRZES´KOWIAK LM, REIS SA, CONCEIÇÃO LL AND PELUZIO MCG. Milk Kefir: nutritional, microbiological and health benefits. **Nutrition Research Reviews**, p.82-9, 2017.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s./], v.42, n.1, p.01-16, 2006.

SARKAR, S. Potencial of Kefir as a dietetic beverage – a review. **British FoodJournal**, [s./], v. 109, p. 280-290, 2007.

SCHUCK, P. Milk Powder: Physical and Functional Properties of Milk Powders. **Encyclopedia of Dairy Sciences**. Elsevier. 2a ed., p. 117–124, 2011.

SILVA, R.H. et al. Secagem do extrato de berinjela em spray dryer com adição de adjuvantes. **XII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica**, UFSCar -São Carlos – SP, 2017.

SOUZA, A.V. et al.Aplicação da secagem por spray drying para a produção de extratos vegetais secos. **Revista Científica UNILAGO**, 2013. Disponível em: <<http://www.unilago.edu.br/revista/edicaoanterior/Sumario/2013/downloads/2013/APLICA%C3%87%C3%83O%20DA%20SECAGEM%20POR%20SPRAY%20DRYING%20PARA%20A%20PRODU%C3%87%C3%83O%20DE%20EXTRATOS%20VEGETAIS%20SECOS.pdf>>. Acesso em: 31 mar. 2017.

WESCHENFELDER, S. et al . Caracterização físico-química e sensorial de kefir tradicional e derivados. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte , v. 63, n. 2, p. 473-480, Apr. 2011.

Contatos: gustavo.patriani@outlook.com.br e Isabela.pereira@mackenzie.br