

JOÃO PAULO VICTORINO SANTOS

**AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA DE GRÃOS DE KEFIR E ATIVIDADE  
INIBIDORA DA BEBIDA SOBRE ALGUMAS BACTÉRIAS PATOGÊNICAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2008

JOÃO PAULO VICTORINO SANTOS

**AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA DE GRÃOS DE KEFIR E ATIVIDADE  
INIBIDORA DA BEBIDA SOBRE ALGUMAS BACTÉRIAS PATOGÊNICAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 19 DE NOVEMBRO DE 2008

---

Prof<sup>ª</sup>. Regina Célia Santos Mendonça

---

Prof. Nélcio José de Andrade

---

Prof. Mauro Mansur Furtado  
(Conselheiro)

---

Prof<sup>ª</sup>. Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto  
(Conselheira)

---

Prof<sup>ª</sup>. Célia Lucia de Luces Fortes Ferreira  
(Orientadora)

Aos meus pais,  
À minha esposa,  
Aos parentes e amigos.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por sua infinita presença em minha vida.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar o curso.

À professora Célia Lúcia de Lucas Fortes Ferreira, pela orientação e principalmente por exigir sempre o melhor.

À Universidade Presidente Antônio Carlos e Cooperativa Agropecuária de Raul Soares, empresas nas quais trabalhei durante o período do mestrado.

À minha esposa Simone pelo companheirismo e apoio sempre.

Aos meus pais Ana e Luiz, meus sogros Francisca e Sebastião e meus cunhados Denise e Cássio pela imprescindível amizade.

À amiga Tatiane pelos conselhos no momento necessário.

A todos os amigos do Laboratório de Culturas Láticas, da UFV.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	ix
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	3
2.1 História do Kefir .....	3
2.2 Kefir bebida .....	3
2.3 Grãos de kefir .....	5
2.4 Kefiran .....	7
2.5 Microbiota presente nos grãos de kefir .....	8
2.6 O papel das BAL e leveduras em produtos lácteos fermentados .....	12
2.6.1 BAL .....	12
2.6.2 Leveduras .....	13
2.7 Benefícios associados ao kefir e microrganismos isolados .....	14
2.8 Substâncias inibidoras produzidas por kefir .....	16
2.8.1 Ácidos orgânicos .....	16
2.8.2 Peróxido de hidrogênio .....	17
2.8.3 Diacetil e acetaldeído .....	17
2.8.4 Bacteriocinas .....	18
2.9 Alguns patógenos associados a doenças de origem alimentar .....	19
2.9.1 <i>Escherichia coli</i> .....	19
2.9.2 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	19
2.9.3 <i>Listeria monocytogenes</i> .....	20
2.9.4 <i>Salmonella sp</i> .....	20

2.9.5 <i>Bacillus cereus</i> .....	21
3. OBJETIVOS .....	22
3.1 Gerais .....	22
3.2 Objetivos específicos .....	22
4. METODOLOGIA .....	23
4.1 Origem e manutenção das amostras de grãos de kefir .....	23
4.2 Contagem dos grupos microbianos .....	24
4.3 Determinação das formas microbianas dos diferentes grãos de kefir .....	25
4.4 Isolamento, caracterização e identificação de leveduras .....	26
4.5 Teste de antagonismo de kefir esterilizado por filtração .....	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	29
5.1 Contagem dos grupos microbianos presentes nos grãos de kefir K 1, K 2 e K 3 .....	29
5.2 Proporção cocos/bacilos/leveduras dos grãos de kefir .....	30
5.3 Isolamento e identificação de leveduras .....	31
5.4 Antagonismo do kefir .....	35
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	38
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	39
APÊNDICES .....	51

## RESUMO

SANTOS, João Paulo Victorino, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2008. **Avaliação da microbiota de grãos de kefir e atividade inibidora da bebida sobre algumas bactérias patogênicas.** Orientadora: Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira. Co-orientadores: Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto e Mauro Mansur Furtado.

A finalidade deste trabalho de pesquisa foi realizar contagem dos diferentes grupos microbianos presentes em grãos de kefir de origens diferentes, verificar suas características de morfologia, identificar isolados de leveduras e avaliar o potencial do soro de kefir esterilizado por filtração em membrana MILIPORE (membrana em éster de celulose, 0,22 µm de poro, 25 mm de diâmetro) em inibir o crescimento de microrganismos patogênicos *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC11229), *Salmonella typhimurium* (ATCC 6539), *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313) e *Bacillus cereus* (RIBO 1222-173-S4). O kefir é um produto lácteo fermentado feito a partir da inoculação de grãos de kefir em leite, ou parte da bebida como cultura inicializadora, resultando em um produto semelhante ao iogurte, porém com características próprias devido, principalmente, à presença de CO<sub>2</sub> e etanol. Sua origem é antiga, estimada em mais de 2.000 anos a.C nas montanhas da região do Cáucaso. Os grãos de kefir avaliados foram obtidos em três diferentes regiões sendo dois do estado de Minas Gerais (Viçosa e Caratinga) e um do estado de São Paulo (São Paulo). As amostras de grãos de kefir 1 (Viçosa), kefir 2 (Caratinga) e kefir 3 (São Paulo), apresentaram distribuição morfológica média em relação à proporção de cocos, bacilos e leveduras de (18%, 59% e 23%) respectivamente. As contagens dos grupos microbianos observadas nas três amostras apresentaram resultados médios em Log UFC.mL<sup>-1</sup> para BAA (7,07), Lactobacilos (8,05), Lactococos (4,76), Leuconostoc (8,18) e Leveduras (6,55). A identificação das leveduras isoladas das amostras de grãos de kefir apresentou *Cândida kefir*, *Cândida dubliniensis*, *Pichia ohmeri* e *Cândida zeilanoides*, com classificação de identificação que variou de boa a excelente utilizando o kit API 20 AUX. Todas as amostras de kefir avaliadas apresentaram redução de no mínimo 30% no crescimento dos patógenos em relação ao controle. As maiores inibições ocorreram para a amostra de kefir (2) para o crescimento de *Bacillus cereus* (RIBO 1222-173-S4) (86,8%) e *Salmonella typhimurium* (ATCC 6539) (73,05%) e amostra do kefir (1) para o crescimento de *Bacillus cereus* (RIBO 1222-173-S4)

(72,88%). O patógeno que sofreu maior inibição em relação às três amostras de kefir foi, *Bacillus cereus* (RIBO 1222-173-S4) apresentando crescimento (76,69%) menor que o controle. A inibição de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) nas três amostras avaliadas variou de (42,80% a 69,15%), para o crescimento de *Escherichia coli* (ATCC 11229) a faixa de inibição foi de (30,73% a 59,89%), sendo este patógeno o que mostrou a maior diferença de inibição em relação às três amostras de kefir, *Salmonella typhimurium* (ATCC 6539) apresentou faixa de inibição de (44,99% a 73,05%), *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313) de (41,45% a 54,18%) e *Bacillus cereus* (RIBO 1222-173-S4) de (70,38% a 86,80%). Essa capacidade de inibição apresentada é interessante porque justifica a sua caracterização como alimento funcional. Além disso, a técnica utilizada no estudo viabiliza a avaliação da bebida “in vitro”. É a primeira vez que se utiliza o soro de kefir (bebida) esterilizado em membrana para avaliar essa inibição, uma vez que, devido à presença de polissacarídeos na bebida, os testes em placas impedem a difusão para os meios de cultura inviabilizando a avaliação por essa técnica. De acordo com os resultados obtidos nesse trabalho é possível concluir que os grãos de kefir das três diferentes origens avaliadas possuem características microbiológicas diferentes e capacidade antagonística frente a diferentes patógenos variada, refletindo a necessidade de se conhecer mais a respeito dos diversos grãos que existem no Brasil e no mundo.

## ABSTRACT

SANTOS, João Paulo Victorino, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, November 2008. **Evaluation of microbiota of kefir grains and action inhibition of beverage on some pathogenics bacteriuns**. Advisor: Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira. Co-Advisors: Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto and Mauro Mansur Furtado.

The purpose of this study was to count different microbial groups in kefir grains of different origins; to verify the morphological characteristics and to identify yeast strains; and evaluate the potential of kefir serum sterilized by membrane filtration through Millipore filter (cellulose ester membrane, pores 0.22  $\mu\text{m}$ , diameter 25 mm) for growth inhibition of the pathogenic microorganisms *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC11229), *Salmonella typhimurium* (ATCC 6539), *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313) and *Bacillus cereus* (RIBO 1222-173-S4). Kefir is a milk product fermented by the inoculation of kefir grains in milk, or of part of the milk as initiating culture, resulting in a yogurt-like product, but with proper characteristics, mainly due to the presence of  $\text{CO}_2$  and ethanol. The origin is ancient, estimated at over 2,000 years BC from the mountains of the Caucasus region. Kefir grains from the state of Minas Gerais (Viçosa and Caratinga) and from the state of Sao Paulo (Sao Paulo) were used here. The morphological distribution of the kefir grain samples 1 (Viçosa), 2 (Caratinga) and 3 (Sao Paulo) was average in relation to the proportion of cocci, bacilli and yeasts (18%, 59% and 23%, respectively). The counts of the microbial groups of the three samples showed average performance in Log UFC.mL<sup>-1</sup> for BAA (7.07), Lactobacilli (8.05), Lactococci (4.76), Leuconostoc (8.18) and yeasts (6.55). Yeast isolation from the kefir grains samples identified *Candida kefir*, *Candida dubliniensis*, *Pichia ohmeri* and *Candida zeylanoides*. The yeasts were classified as good to excellent by the kit API 20 AUX. All kefir samples reduced the pathogen growth by at least 30% in comparison to the control. Highest inhibition was observed in sample 2 on the growth of *Bacillus cereus* (RIBO 1222-173-S4) (86.8%) and *Salmonella typhimurium* (ATCC 6539) (73.05%) and sample 1 on the growth of *Bacillus cereus* (RIBO 1222-173-S4). Highest inhibition by the three kefir samples was observed in the pathogen *Bacillus cereus* (RIBO 1222-173-S4) with a growth reduction of 76.69% compared to the control. The inhibition of *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) in the three samples ranged from 42.80% to 69.15%, and from 30.73% to 59.89% for *Escherichia coli*

(ATCC 11229), where the growth inhibition range induced by the three kefir samples was greatest. The inhibition range of *Salmonella typhimurium* (ATCC 6539) was 44.99% to 73.05%, of *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313) from 41.45% to 54.18% and of *Bacillus cereus* (RIBO 1222-173-S4) from 70.38% to 86.80%. This inhibition capacity is interesting since it characterizes kefir as functional food. Furthermore, the beverage can be evaluated "*in vitro*" by the technique used here. It is the first time the kefir serum (beverage) was sterilized in membrane to evaluate this inhibition, since, due to the presence of polysaccharides, the spread of the medium is impeded in plate tests hampering the culture evaluation by this technique. Based on the results of this study it was possible to conclude that the kefir grains from the three different origins have different microbiological characteristics and antagonistic capacity towards different pathogens, which points to the need to learn more about the various grains that exist in Brazil and around the world.

## 1- INTRODUÇÃO

Kefir é um produto lácteo fermentado feito a partir da inoculação de grãos de kefir em leite ou parte da bebida como cultura inicializadora que resulta em uma bebida semelhante ao iogurte, porém com características próprias associadas, principalmente, à presença de CO<sub>2</sub> e etanol.

Sua origem é antiga, estimada em mais de 2.000 anos a.C nas montanhas da região do Cáucaso. As tribos muçulmanas desta região consideravam os grãos de kefir um presente de Alá e mantinham como tradição a passagem desses grãos apenas aos familiares próximos. A saúde e longevidade desses povos foram atribuídas ao consumo freqüente de kefir, o que despertou o interesse de médicos russos pelo produto no fim do século XIX. Hoje, vários países como Canadá, Rússia, EUA e França consomem o produto de forma industrializada e outros como Brasil, Argentina, África do Sul, Portugal e Espanha tem o hábito de produção e consumo do kefir artesanal.

A principal característica do kefir é a presença de uma microbiota diversificada composta por *Lactobacilos*, *Lactococos*, bactérias do ácido acético, leveduras dentre outros microrganismos, mantidos juntos pela matriz de polissacarídeos, proteínas e gorduras que formam os seus grãos. As leveduras presentes conferem um caráter diferenciado ao produto, não só pelo aroma, mas pela produção de vitaminas do complexo B e sua atuação no produto mesmo refrigerado, com produção de etanol e CO<sub>2</sub>.

Kefir é considerado um alimento funcional em função dos diversos benefícios à saúde que lhe são atribuídos, tais como, capacidade de reduzir a intolerância à lactose, inibir o crescimento de tumores cancerígenos, reduzir as concentrações de colesterol LDL além de estimular o sistema imunológico, inibir o crescimento de microrganismos patogênicos, dentre outros.

Os microrganismos presentes no kefir produzem diversas substâncias antimicrobianas como peróxido de hidrogênio, ácidos orgânicos e bacteriocinas, capazes de inibir o crescimento de patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus*.

Os objetivos desta pesquisa foram quantificar grupos microbianos presentes em grãos de kefir de diferentes origens, identificar leveduras e avaliar o potencial do kefir em inibir o crescimento de bactérias patogênicas. Este estudo contribuirá para o melhor entendimento da composição microbiana dos grãos de kefir, utilizados para produção artesanal no Brasil, o que servirá de base para futuras pesquisas voltadas para o setor industrial.

## **2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 História do Kefir**

A palavra kefir é de origem turca, derivada de “keif”, que significa sentir bem. A origem da bebida é estimada em mais de 2000 anos a.C nas montanhas do Cáucaso na Rússia, entre o mar Negro e o mar Cáspio (Figura 1). As tribos desta região o consideravam um presente de Alá e por isso não permitiam que outros povos, principalmente não mulçumanos, tivessem acesso a ele, o que fez com que o conhecimento a respeito deste alimento não fosse difundido durante muitos anos, (GORSKI, 1994) .

No fim do século XIX uma expedição Russa foi a esta região com a finalidade de conseguir os grãos de kefir e utilizá-los no tratamento da tuberculose em casas de saúde, pois já se falavam em propriedades “milagrosas” atribuídas ao produto. Em 1908 o produto chegou a Moscou e daí por diante foi se difundindo para outras regiões, (GORSKI, 1994).

Ao longo dos anos, o consumo do kefir foi restrito a produções por aqueles indivíduos que possuíam os grãos em suas residências e os utilizavam repetindo o processo, sucessivamente. Comercialmente, o produto é encontrado em países como a Rússia, Turquia, Estados Unidos, Canadá e França, (POWELL, 2006). No Brasil não é encontrado comercialmente e seu uso é restrito à produção artesanal.

### **2.2 Kefir bebida**

Kefir é uma bebida refrescante, com um sabor ligeiramente ácido e consistência cremosa. Pode ser produzida a partir de leite de vaca, cabra, ovelha, camelo ou búfalo (ABRAHAM e DE ANTONI, 1999), pode ser fabricado com leite pasteurizado integral, semi-desnatado ou desnatado.



Figura 1: Região do Cáucaso.

Fonte: [http://geocities.yahoo.com.br/kefirbrasil/Fazendo\\_Real\\_Kefir.htm](http://geocities.yahoo.com.br/kefirbrasil/Fazendo_Real_Kefir.htm)

A composição nutricional e o sabor do kefir variam em função de fatores como a origem dos grãos, teor de gordura do leite, condições de fermentação e maturação. O kefir possui um pH que varia de 4,2 a 4,6, etanol entre 0,5 e 2,0 % (v/v), ácido lático de 0,8 a 1,0 % (m/v) e dióxido de carbono entre 0,08 a 0,2 % (v/v) (SALOFF-COSTE, 1996). Contém ainda os ácidos fórmico, propiônico, succínico e acético, além de acetaldeído e diacetil. O teor de lactose diminui e de b-galactosidase aumenta durante a fermentação. Há também um pequeno aumento na proteólise, levando a um maior número de aminoácidos livres (ZUBILLAGA et al, 2001).

Kefir pode ser produzido a partir dos grãos ou a partir de uma cultura “starter”, que consiste em uma parte da bebida. Os grãos ou a bebida são adicionados, 5 % ou 3 % respectivamente, ao leite, mantido por 18 horas à temperatura ambiente ou até a coagulação. Quando os grãos são utilizados no processo eles devem ser recuperados empregando-se peneira. O produto coagulado é resfriado de  $6^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ} \text{C}$ , por 24 a 48 horas para indução da fermentação alcoólica que acumulará  $\text{CO}_2$ , etanol e vitaminas do complexo B, após o que, o produto poderá ser consumido. As leveduras modificam as características do produto mesmo sob refrigeração o que limita

a sua vida de prateleira. Os grãos de kefir recuperados podem ser lavados em água filtrada e reutilizados em uma nova fabricação, (PINTADO et al, 1996).

O CO<sub>2</sub> produzido confere efervescência ao produto, melhora suas características de refrescância, porém em embalagens flexíveis provoca estufamento, o que pode ser confundido com deterioração ou condições precárias de higiene. Para contornar esse problema é necessária a seleção dos grãos de kefir para produção da bebida que produza quantidades mais baixas desse gás, além de embalagens mais adequadas ao tipo de produto (IRIGOYEN et al, 2005).

No Brasil, o kefir não é comercializado e é encontrado apenas em residências que o produzem artesanalmente, ao passo que em outros países é disponibilizado industrialmente como o Actívia Kefir na Rússia e Kefir Liberté no Canadá e França (Figura 2).



Figura 2: Kefir Liberté

Fonte: [www.liberte.qc.ca/en/page.ch2?uid=kefir22](http://www.liberte.qc.ca/en/page.ch2?uid=kefir22)

### **2.3 Grãos de Kefir**

Os grãos de kefir possuem forma gelatinosa irregular de 1 a 2 cm de diâmetro com aparência de couve flor (Figura 3), coloração levemente amarelada e são insolúveis em água. Normalmente são utilizados para fermentar o leite e produzir a bebida que será consumida sem os grãos (WITTHUN et al, 2004).



Figura 3: Grãos de kefir.

Fonte: [www.kefirbrasil.com.br](http://www.kefirbrasil.com.br)

Esses grãos contêm em sua matriz variados grupos de microrganismos em relação de simbiose, que por meio de crescimentos em tempos e condições diferentes, formam uma bebida com características próprias de aroma, sabor e textura.

A composição dos grãos de kefir mantidos em leite desnatado é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1: Composição dos grãos de kefir mantidos em leite desnatado.

Componente	(%)
Umidade:	
90,1 %	
Gordura:	0,2 %
Cinza:	0,7 %
Carboidratos:	6,0 %
Proteínas:	3,0 %

Fonte: Garrote et al, 2001.

Assadi et al (2000) realizaram estudos comparativos sobre a produção de bebida fermentada com microrganismos isolados de kefir e grãos de kefir concluindo que os grãos de kefir conferiam à bebida as suas características mais desejáveis de cor,

textura, flavor, acidez, efervescência e viscosidade. O objetivo do estudo era eliminar os grãos do processo produtivo e facilitar a elaboração do kefir industrial, porém concluíram que a utilização dos grãos para iniciar a fermentação era essencial para a formação do produto característico.

Os grãos de kefir quando não forem usados para uma nova produção imediata podem ser mantidos em geladeira entre (5 e 10° C, por 8 a 10 dias em água filtrada, ou podem ser preservados por congelamento a -20° C em leite desnatado reconstituído (LDR), a 10% e adição de 20% de glicerol, por um período de até oito meses.

## 2.4 Kefiran

Kefiran ou kefirana (Figura 4) é o principal polissacarídeo encontrado nos grãos do kefir, sua presença confere maior viscosidade à bebida. É produzido por, *Lb. Kefiranofaciens* e *Lb. Kefir*, homofermentativos. Esse polissacarídeo é também responsável por manter a microbiota variada presa à matriz que será multiplicada, perpetuando assim a microbiota presente ao redor dos grãos (SANTOS et al, 2003).

Sua estrutura é formada por quantidades aproximadamente iguais de resíduos de D-Glicose e D-Galactose e constituem de 24 % a 25 % (m/m) do peso seco do grão de kefir.

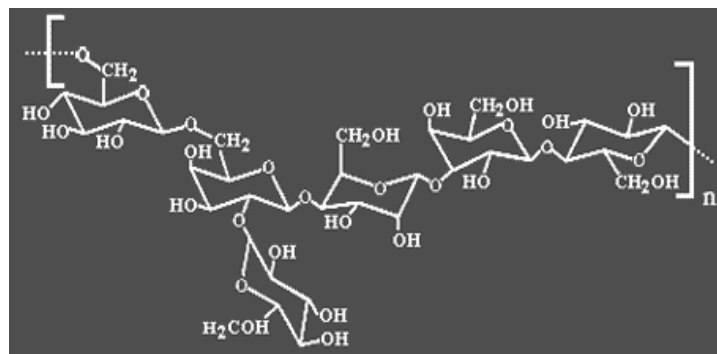


Figura 4: Estrutura do polissacarídeo, kefiran.

Fonte: [www.kefirbrasil.com.br](http://www.kefirbrasil.com.br)

*Lactobacillus kefiranofaciens* é identificado como o principal produtor do polissacarídeo kefiran em kefir seguido pelo *Lactobacillus kefir* em quantidades menores (FUJISAWA et al, 1988; REA et al, 1996).

## 2.5 Microbiota presente nos grãos de kefir

De acordo com Ferreira (2005) as bactérias do ácido lático (BAL) constituem o grupo mais importante de microrganismos na produção de alimentos por terem a capacidade de atuar em diferentes substratos.

Os diferentes microrganismos presentes nos grãos de kefir estarão ativos em fases distintas da fermentação. Espécies de *Lactococcus* irão se desenvolver primeiro fazendo com que a acidez aumente durante as primeiras horas da fermentação. A acidez mais alta propicia condições para o crescimento de *Lactobacillus*. As leveduras, bactérias do ácido acético e as produtoras de aroma têm um crescimento mais lento e irão conferir as suas características ao produto ao longo da sua maturação, que ocorre na fase de refrigeração (REA et al, 1996). A morfologia variada de microrganismos presentes na superfície do grão de Kefir é apresentada na Figura 5.

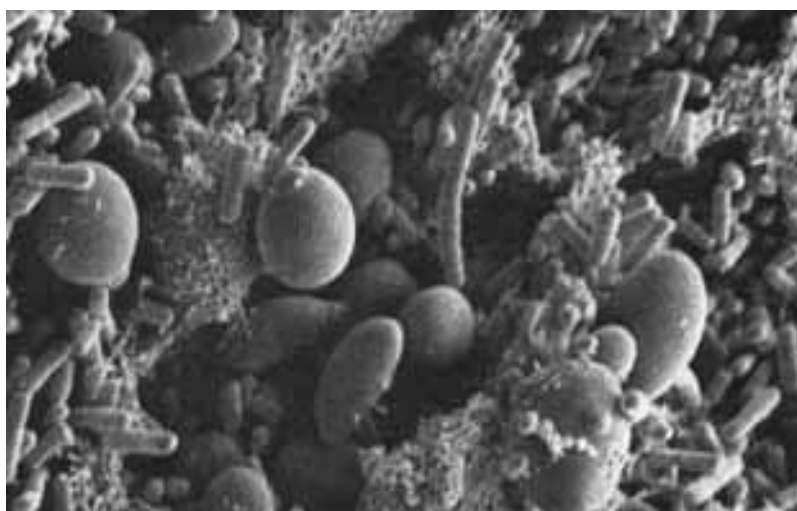


Figura 5: Superfície dos grãos de kefir observada por Microscopia Eletrônica de Varredura.

Fonte: Rea et al, 1996.

Os principais microrganismos presentes nos grãos de kefir estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2: Microrganismos associados aos grãos de kefir.

<b>Microrganismo</b>	<b>Referências*</b>
<i>Enterococcus durans</i>	a, b
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	c, d, e, f
<i>Lactobacillus brevis</i>	c, d, e, g
<i>Lactobacillus buchneri</i>	h
<i>Lactobacillus casei</i>	
<i>subsp. alactosus</i>	a, c, d, i
<i>subsp. rhamnosus</i>	a,c, j
<i>subsp. pseudoplantarum</i>	g, l
<i>subsp. tolerans</i>	l
<i>Lactobacillus cellobiosus</i>	a, c, d
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	
<i>subsp. bulgaricus</i>	a; d, g, j
<i>subsp. lactis</i>	a, c, m
<i>Lactobacillus fermentum</i>	l, m
<i>Lactobacillus gasseri</i>	l
<i>Lactobacillus helveticus</i>	
<i>subsp. jugurti</i>	c, d, j
<i>subsp. lactis</i>	a
<i>Lactobacillus kefir</i>	a, b, d, f, n, o
<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i>	a, d, f, n
<i>Lactobacillus kefirgranum</i>	p
<i>Lactobacillus parakefir</i>	o, p
<i>Lactobacillus plantarum</i>	d, o
continua...	

\* (a) Marshall, 1993; (b) Yuksekdag et al, (2004) ; (c) Libudzisz e Piatkiewicz, (1990); (d) Kwak et al, (1996); (e) Marshall, (1987); (f) Santos et al, (2003); (g) Simova et al, (2002); (h) Iwasawa et al, (1981); (i) Kurmann et al, (1992) ; (j) Koroleva, (1988); (l)

Angulo et al, (1993) ; (m) Withuhn et al, (2004) ; (n) Pintado et al, (1996); (o) Garrote, (2001); (p) Takizawa et al, (1994); (q) Saloff-Coste, (1996); (r) Mann, (1979); (s) Garrote et al., (1997); (t) Lin et al, (1999) ; (u) Kaufmann, (1997); (v) Liu e Moon, (1983); (x) Streinkraus, (1996); (y) Brialy et al, (1995).

Tabela 2: Microrganismos associados aos grãos de kefir.

---

<i>Lactococcus lactis</i>	
<i>subsp. cremoris</i>	a, c, d, j
<i>subsp. lactis</i>	a, d, m, n, o
<i>subsp. Lactis biov. diacetylactis</i>	a, c, d, o
<i>Leuconostoc kefir</i>	d
<i>Leuconostoc mesenteriodes</i>	
<i>subsp. cremoris</i>	a, c
<i>subsp. dextranicum</i>	c, d, j
<i>subsp. mesenteriodes</i>	a, d, m
<i>Streptococcus salivarius</i>	
<i>subsp. thermophilus</i>	a, c, d, g
<i>Weissella viridescens</i>	l
<b>Bactérias do Ácido Acético</b>	
<i>Acetobacter aceti</i>	a, i, j
<i>Acetobacter rasens</i>	a, j
<b>Leveduras</b>	
<i>Brettanomyces anomalus</i>	r, s, t
<i>Candida friedricchii</i>	r, s, t
<i>Candida holmii</i>	a, m, r, s, t
<i>Candida kefir</i>	a, c, e, m
<i>Candida pseudotropicalis</i>	a, c, n
<i>Candida tenuis</i>	n
<i>Candida valida</i>	r, s, t
<i>Cryptococcus kefir</i>	d, j, u, v
<i>Kluyveromyces bulgaricus</i>	a, c
	continua...

---

\* (a) Marshall, 1993; (b) Yuksekdag et al, (2004) ; (c) Libudzisz e Piatkiewicz, (1990); (d) Kwak et al, (1996); (e) Marshall, (1987); (f) Santos et al, (2003); (g) Simova et al,

(2002); (h) Iwasawa et al, (1981); (i) Kurmann et al, (1992) ; (j) Koroleva, (1988); (l) Angulo et al, (1993) ; (m) Withuhn et al, (2004) ; (n) Pintado et al, (1996); (o) Garrote, (2001); (p) Takizawa et al, (1994); (q) Saloff-Coste, (1996); (r) Mann, (1979); (s) Garrote et al., (1997); (t) Lin et al, (1999) ; (u) Kaufmann, (1997); (v) Liu e Moon, (1983); (x) Streinkraus, (1996); (y) Brialy et al, (1995).

Tabela 2: Microrganismos associados aos grãos de kefir.

<i>Kluyveromyces fragilis</i>	d, u, v
<i>Kluyveromyces lactis</i>	a, c, d
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	
<i>subsp. marxianus</i>	a, d, j
<i>subsp. bulgaricus</i>	d, u, v
<i>Pichia fermentans</i>	r, s, t
<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	c, d, n
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	d, e, g, j, m
<i>Saccharomyces delbrueckii</i>	x
<i>Saccharomyces florentinus</i>	c, y
<i>Saccharomyces globosus</i>	c
<i>Saccharomyces kefir</i>	d
<i>Saccharomyces lactis</i>	n
<i>Saccharomyces lipolytic</i>	r, s, t
<i>Saccharomyces unispores</i>	c
<i>Torula kefir</i>	d
<i>Torulasporea delbrueckii</i>	c, e, j
<i>Torulopsis holmii</i>	x

Fonte: Adaptado de Powell, 2006.

\* (a) Marshall, 1993; (b) Yuksekdag et al, (2004) ; (c) Libudzisz e Piatkiewicz, (1990); (d) Kwak et al, (1996); (e) Marshall, (1987); (f) Santos et al, (2003); (g) Simova et al, (2002); (h) Iwasawa et al, (1981); (i) Kurmann et al, (1992) ; (j) Koroleva, (1988); (l) Angulo et al, (1993) ; (m) Withuhn et al, (2004) ; (n) Pintado et al, (1996); (o) Garrote, (2001); (p) Takizawa et al, (1994); (q) Saloff-Coste, (1996); (r) Mann, (1979); (s) Garrote et al., (1997); (t) Lin et al, (1999) ; (u) Kaufmann, (1997); (v) Liu e Moon, (1983); (x) Streinkraus, (1996); (y) Brialy et al, (1995).

As formas predominantes da microbiota dos grãos de kefir estão indicadas no Quadro 1 (ÂNGULO et al, 1993).

Quadro 1: Formas predominantes da microbiota do grão de kefir.

Morfologia	-	%
Bacilos	-	62 % a 69 %
Cocos	-	11 % a 12 %
Leveduras	-	16 % a 20 %

Fonte: Ângulo et al, 1993.

## 2.6 O papel da BAL e leveduras em produtos lácteos fermentados

### 2.6.1 BAL

Bactérias do ácido láctico (BAL) constituem um dos mais importantes grupos de microrganismos com capacidade de transformar diversos substratos tendo como resultado produtos mais favoráveis aos interesses do homem, que podem aumentar a durabilidade, conferir segurança alimentar, promover benefícios à saúde e modificar as características sensoriais (FERREIRA, 2005).

Estão presentes em ambientes nutricionalmente ricos, como vegetais, leite e carnes, possuem características comuns: são Gram positivas, não esporuladas e catalase negativas, apesar de algumas espécies poderem produzir uma pseudocatalase. Além disso, apresentam forma de bacilo ou coco, quase sempre não possuem motilidade, são fermentadoras de açúcar, produzem principalmente ácido láctico e podem ser divididas em homo e heterofermentativas. As homofermentativas convertem a glicose a praticamente um produto, o ácido láctico, enquanto as heterofermentativas produzem também outros compostos como dióxido de carbono e ácido acético.

As bactérias lácticas fazem parte de um dos mais importantes grupos produtores de ácido láctico em alimentos industrializados que correspondem às espécies dos gêneros *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Vagococcus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus*, *Carnobacterium* e *Atopodium* (ALEXANDRE et al,

2002). Em produtos como queijos, auxiliam na coagulação e formação de aromas, em iogurte promovem o abaixamento do pH do leite e modificam benéficamente as características sensoriais e de textura. No kefir atuam na etapa de fermentação a temperatura ambiente e produzem ácido láctico, aroma e foram um ambiente mais favorável ao crescimento das leveduras na etapa de maturação. Vários benefícios são associados aos produtos lácteos fermentados como regulação das funções intestinais, possibilidade de consumo por indivíduos lactose intolerantes, estimulação do sistema imunológico, recomposição da microbiota intestinal dentre outros (JAY, 2005).

### **2.6.2 Leveduras**

Levedura, por definição, é um microrganismo unicelular, que se reproduz principalmente por brotamento. Existem pelo menos 80 gêneros de leveduras com, aproximadamente, 600 espécies conhecidas (RAVEN et al, 2001) .

Ao microscópio, leveduras caracterizam-se pela maior dimensão das suas células comparadas às bactérias. Crescem em uma ampla faixa de pH entre 3,0 a 9,0, em até 18 % de etanol e em presença de 55 % a 60 % de sacarose. As colônias de leveduras apresentam morfologias variadas e podem apresentar consistência cremosa, brilhantes ou opacas, de cor branca a creme, podem apresentar coloração do marfim ao vermelho (JAY, 2005).

Apresentam grande significado em alimentos, considerando a sua capacidade de causar deterioração ou conduzir a uma fermentação desejável. Tradicionalmente e do ponto de vista econômico, são os microrganismos mais importantes explorados pelo homem, usados na produção de pão, cerveja, vinho e outras bebidas alcoólicas, extrato de levedura, pigmentos e produtos lácteos fermentados (FLEET, 1990; JAKOBSEN e NARVHUS, 1996).

Leveduras são essenciais na fabricação de produtos lácteos como kourmis, kefir e laben, atuam principalmente no período de maturação em temperatura de refrigeração (FERREIRA, 2005).

Segundo a via metabólica que utiliza, dois subgrupos podem ser observados: a) leveduras em aerobiose (respiração aeróbica): durante o crescimento em presença de oxigênio, menos de 30% da glicose é fermentada. A intensidade respiratória é alta e a glicose é degradada em CO<sub>2</sub> e água, o que resulta em alto rendimento energético; b) levedura em anaerobiose (fermentação anaeróbica): durante o crescimento em presença de oxigênio, grande parte da glicose é fermentada, acima de 90 %, a intensidade

respiratória é baixa e os glicídios, incompletamente oxidados a etanol. O rendimento energético é pequeno e o crescimento é frequentemente mais lento que no caso precedente. Pode-se observar, na Figura 6, as vias metabólicas utilizadas pelas leveduras em aerobiose e em anaerobiose (LARPENT et al, 1991).

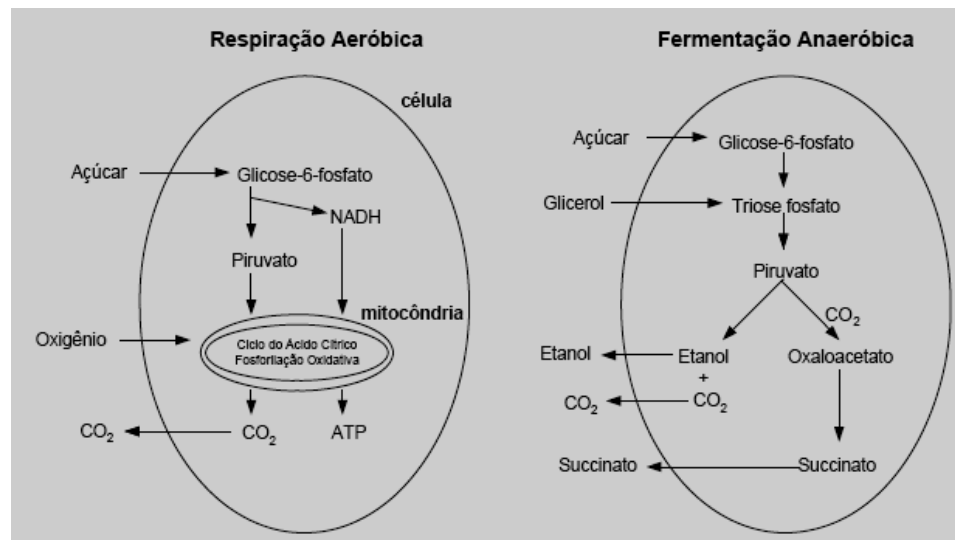


Figura 6. Vias metabólicas das leveduras em aerobiose e anaerobiose.

Fonte: Larpent et al, 1991.

## 2.7 Benefícios associados ao kefir e microrganismos isolados

Kefir tem sido usado por muitos anos na Rússia para tratamento de vários tipos de enfermidades e são atribuídas a ele várias propriedades funcionais (ZUBILLAGA, 2001). Dentre essas propriedades são citadas o retardamento de tumores cancerígenos (MUROFUSHI et al, 1983; HOSONO et al, 1990), ativação do sistema imunológico (OSADA et al, 1994; VINDEROLA et al, 2005), possibilidade de consumo por indivíduos lacto-intolerantes, combate a infecções intestinais e outros.

Em estudo recente foi demonstrado que *Lactobacillus kefir* pode interagir com a *Salmonella Enteritidis*, antagonizando a adesão e a invasão às células epiteliais (GOLOWCZYC et al, 2007). Atividades antibacterianas, antifúngicas e antitumorais também foram atribuídas aos grãos de kefir em estudos realizados em ratos (CERIKBAS e YEMNI, 1994).

Kefir apresentou atividade antimicrobiana, *in vitro*, sobre uma grande variedade de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e alguns fungos (SALOFF-COSTE, 1996; GARROTE et al, 2000). Bactérias patogênicas como *Shigella* e *Salmonella* não apresentaram crescimento em bebida fermentada por grãos de kefir

(Koroleva, 1988). *Lactobacillus acidophilus* isolados de kefir, apresentaram atividade inibitória sobre vários microrganismos Gram-positivos e Gram negativos (GILLILAND e SPECK, 1977; APELLA et al, 1992; GUPTA et al, 1996). Dentre diferentes microrganismos isolados do kefir, *Lactococcus* e bactérias do ácido acético (BAA) foram os que apresentaram maior efeito inibitório sobre coliformes (VAN WYK, 2001), apresentando também atividade inibitória sobre *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium tyrobutyricum* e *Listeria monocytogenes*.

Leveduras como as *Torulaspóra*, isolada do kefir, possuem atividade antimicrobiana contra bactérias do grupo coliformes (Koroleva, 1988; Naidu et al, 1999).

Apesar da causa da inibição dos microrganismos patogênicos não ser totalmente clara, BAL inibem a aderência, multiplicação e ação patogênica de microrganismos invasivos (SAAVEDRA, 1995). Os mecanismos antagonísticos de BAL podem incluir a atividade de ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio (SHAHANI e CHANDAN, 1979, JUVEN et al, 1992), diacetil, bacteriocinas e outros compostos (HELANDER et al, 1997).

Shiomi et al (1982) foram os primeiros pesquisadores a apresentarem um relatório sobre os efeitos antitumorais de um polissacarídeo solúvel em água de peso molecular 1.000.000 Da, isolados de grãos de kefir. O polissacarídeo inibiu o crescimento de Ehrlich Carcinoma ou Sarcoma comparado ao controle que eram camundongos que não receberam polissacarídeos derivados de kefir.

Murofushi et al (1983) estudaram o efeito dos polissacarídeos encontrados nos grãos de kefir sobre a inibição do crescimento de tumores cancerígenos em ratos e sugeriram que esses polissacarídeos estimulam o crescimento das células de defesa do organismo.

Güven et al (2003) após pesquisa realizada com ratos, propuseram uma alternativa sobre a forma de como o kefir protege os tecidos. Esses autores mostraram que camundongos expostos ao tetracloreto de carbono, hepatotóxica para induzir a um dano oxidativo, tiveram os efeitos destes diminuídos pelo consumo constante de kefir, o que indicou que a bebida estaria agindo como um antioxidante. Além disso, kefir foi mais eficaz do que a vitamina E, conhecida por ter propriedades antioxidantes, para proteção contra danos oxidativos.

Vários pesquisadores observaram os benefícios do kefir no auxílio da digestão (GONCHAROVA et al, 1979; SUKHOV et al, 1986; CARDOSO et

al, 2003). Um dos benefícios foi a sua ação sobre o trânsito intestinal de ratos, onde uma suspensão à base de kefir produziu um estímulo 65,4 % superior ao do grupo controle (CARDOSO et al, 2003).

Segundo Güven et al (2003) o leite fermentado com os grãos de kefir têm um efeito antioxidante similar ao da vitamina E ou tocoferol, para redução da peroxidação lipídica.

Parte da população mundial é incapaz de digerir lactose, associado à insuficiência de produção de  $\beta$ -galactosidase ou lactase, (ALM, 1982). Estudos em humanos foram realizados na Universidade de Ohio no EUA com objetivo de comprovar o efeito da bebida a base de kefir em promover digestão da lactose em indivíduos lacto-intolerantes e os resultados indicam que a bebida pode ser utilizada para promover esse benefício por conter uma microbiota capaz de produzir lactase (VRESE, 1991 e HERTZLER et al, 2003).

Efeitos positivos em relação ao consumo de kefir e a redução nas concentrações de colesterol foram observados. Várias hipóteses foram propostas para o eventual mecanismo de ação empregado pelas bactérias para reduzir as concentrações de colesterol. Vujicic et al (1992) mostraram que grãos de kefir da Iugoslávia, Hungria e da região do Cáucaso foram capazes de assimilar colesterol do leite quando incubados a 20 °C durante 24 h, reduções de até 62 %, ou incubados e armazenados a 10 °C durante 48 h, reduções de até 84 %. Esses autores defenderam que kefir possui sistema enzimático colesterol-degradante.

## **2.8 Substâncias inibidoras produzidas por kefir**

Kefir, em função de sua microbiota constituinte, são produzidas variadas substâncias inibidoras que atuam sobre microrganismos patogênicos com frequência associados a doenças de origem alimentar (HELANDER et al, 1997). Microrganismos isolados de kefir possuem capacidade de inibir *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, além de outros patógenos (AROUTCHEVA et al, 2001).

### **2.8.1 Ácidos orgânicos**

O abaixamento do pH no kefir, causado pelo acúmulo de ácidos orgânicos como ácido láctico, produzido principalmente por BAL, resultou em atividade inibitória sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (NAIDU et al, 1999).

As formas não dissociadas dos ácidos láctico e acético penetram na membrana celular e promovem acidificação do citoplasma, degradação de enzimas, o que provoca acúmulo de sais associados à modificação da permeabilidade da membrana (PIARD e DESMAZEAUD, 1991). Esses ácidos foram capazes de inibir o crescimento de *E. coli* (GARROTTE et al, 2000) e *B. cereus* (ROSSLAND et al, 2005).

Garrote et al (2000) mostraram que o leite adicionado de ácido láctico ou de ácido láctico acrescido de ácido acético nas concentrações encontradas no kefir possui atividade inibitória sobre *E. coli*. Os autores concluíram que os ácidos orgânicos produzidos no kefir durante a fermentação poderiam ter propriedades bacteriostáticas importantes até mesmo nas fases iniciais da fermentação do leite.

### **2.8.2 Peróxido de hidrogênio**

Peróxido de hidrogênio é um metabólito produzido por variadas espécies de BAL e contribui com o efeito antagonístico sobre microrganismos patogênicos e assim auxiliam na preservação de alimentos (HELANDER et al, 1997).

As bactérias lácticas produzem peróxido de hidrogênio como mecanismo de proteção frente ao oxigênio, pela ação das oxidases ou NADH peroxidases. O acúmulo de peróxido de hidrogênio nos produtos fermentados ocorre em função do fato das BAL não possuírem a enzima catalase necessária para sua degradação. A ação bactericida desse composto é atribuída ao seu efeito altamente oxidante, mediante a peroxidação dos lipídeos da membrana e à destruição da estrutura básica molecular das proteínas celulares (Dahl et al, 1989).

Yüksekçag et al (2004) realizaram pesquisas com 21 cocos isolados de kefir turco sendo *Lactococcus cremoris* (11), *Lactococcus Lactis* (4), *Streptococcus thermophilus* (3) e *Enterococcus durans* (3) e encontraram capacidades diferentes de produção de peróxido de hidrogênio entre esses isolados. Dois isolados de *Lactococcus Lactis* produziram maior concentração de peróxido atingindo 0,17 µg/mL em leite desnatado esterilizado, tendo sido também os mais eficazes em inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus*, *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Entre os 21 microrganismos testados 10 não produziram peróxido e não mostraram capacidade de inibição para *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, porém inibiram *Staphylococcus aureus*.

### **2.8.3 Diacetil e acetaldeído**

O diacetil é um composto produzido por bactérias lácticas que têm a capacidade de fermentar o citrato como *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* e *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis biov. diacetylactis* (NAIDU, 1999), além de ser o produto final do ciclo da fermentação butanodiólica, que ocorre num dos destinos do piruvato (DAESCHEL, 1989).

Archer et al (1996) relataram a inibição da *Salmonella Typhimurium* em concentrações subletais de diacetil. A concentração de 0,2 mg/mL de citrato é exigida para atividade antimicrobiana sobre bactérias Gram negativas e leveduras, enquanto que a concentração de 0,3 mg/mL é necessária para a inibição bactérias Gram positivas de origem não láctea (JAY, 1982; PIARD e DESMAZEAUD, 1991)

Acetaldeído é produto do metabolismo de BAL como *S. thermophilus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* e *Leuconostoc*. Constitui o principal componente de “flavor” do iogurte. É formado pela ação de enzimas que catalisam reações a partir de carboidratos, proteínas e alguns precursores de ácidos nucléicos. Estirpes de *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* possuem a enzima desidrogenase alcoólica capaz de converter o acetaldeído a etanol reduzindo sua concentração (FERREIRA, 2005).

Em concentrações de 100 mg/L, acetaldeído inibe *S. aureus*, *E. coli* e *S. Typhimurium* (KULSHRESTHA e MARTH, 1974 a,b,c).

Yüksekçag et al (2004) ao avaliarem 21 cocos isolados de kefir turco constataram que todos produziram acetaldeído em leite desnatado esterilizado, porém a concentração máxima foi de 3,96 µg/mL.

#### **2.8.4 Bacteriocinas**

Bacteriocinas são compostos protéicos que têm atividade letal sobre outras bactérias. Normalmente as células bacterianas que produzem bacteriocinas são imunes à sua ação antagônica e propiciam à bactéria secretora uma vantagem competitiva sobre outras bactérias no mesmo ambiente ecológico (NAIDU, 1999).

Uma hipótese amplamente aceita sobre o modo de ação das bacteriocinas sugere que a sua interação com uma célula sensível ocorre em duas etapas (PLATE e LURIA, 1972). A primeira corresponde à adsorção das moléculas da bacteriocina a um receptor específico ou não específico da superfície celular, sendo reversível por não produzir nenhum dano fisiológico. Na segunda etapa ocorrem mudanças patológicas

irreversíveis por consequência das alterações bioquímicas, como inibição de produção de energia, biossíntese de ácidos nucleicos e proteínas.

As bactérias do grupo dos lactobacilos possuem capacidade de agir na degradação de proteínas produzindo peptídeos com ação bactericida e podem constituir em mecanismo de antagonismo do kefir frente a microrganismos patogênicos (Yüksekçag et al, 2004).

## **2.9 Alguns patógenos associados a doenças de origem alimentar**

### **2.9.1 *Escherichia coli***

Bactérias do grupo da *Escherichia coli* são comumente encontradas no intestino de homens e animais e até a década de 50 eram reconhecidas como não-patogênicas. Entretanto, certas estirpes podem provocar intoxicações, e *E. coli* foi, então, considerada potencialmente patogênica (OLSVIK et al, 1991).

Embora possa ser introduzida nos alimentos a partir de fontes não-fecais, *Escherichia coli* é o melhor indicador de contaminação fecal conhecido até o momento, entendendo-se por população fecal aquela que, presumidamente, contenha alta proporção dessa espécie ou seus variantes, provavelmente de origem fecal recente (RIBEIRO, 1981 e SILVA et al, 1997).

A maioria das estirpes de *E. coli* presentes no trato intestinal é inócua, a menos que esteja distribuída em outras partes do corpo humano, como o trato urinário ou meninges, neste caso pode causar doenças (HOBBS e ROBERTS, 1998).

### **2.9.2 *Staphylococcus aureus***

Estão incluídos no gênero pelo menos 27 espécies, dessas, somente seis são coagulase positivas e geralmente produzem termonuclease (JAY, 1992). Algumas espécies coagulase negativas como *Staphylococcus gallinarum*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus equirum*, *Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus capitis* e *Staphylococcus xylosus*, produzem toxinas (VERNOZY-ROZAND et al, 1996).

*S. aureus* são cocos Gram-positivos, anaeróbios facultativos, apresentam crescimento a temperaturas entre 7° C e 45 °C, produzem toxinas entre 10 °C e 46 °C, com ótimo entre 40 °C e 45 °C, pH favorável entre 4,5 e 9,3, com ótimo entre 6,0 e 7,0. São capazes de crescer a valores de atividade de água entre 0,83 e 0,99 em condições

aeróbias, com produção de toxinas a partir de 0,86 e ótimo de 0,99, embora haja relatos de produção a 0,84 (JAY, 1992, MENDONÇA et al, 2003). Silva et al, (1997) relataram que, em geral, *S. aureus* não se multiplica a temperaturas inferiores a 8 °C, sendo que 10 °C é a temperatura mínima para a produção da toxina e o seu desenvolvimento é controlado em pH menor que 4,3.

A produção de concentrações de toxinas necessárias para ocasionar a intoxicação ocorre com  $10^5$  a  $10^6$  células por grama do alimento, em pH superior a 5,0 (SILVA e GOMES, 2001). Estas toxinas causam síndromes e são associadas a surtos de intoxicação alimentar e causadoras de complicações do sistema auto-imune. As toxinas estafilocócicas representam a família dos principais grupos sorológicos de toxinas termoestáveis; elas agem como potentes toxinas gastrintestinais e também como superantígenos que estimulam a multiplicação não-específica das células T (BALABAN e RASOOLY, 2000).

### **2.9.3 *Listeria monocytogenes***

*Listeria monocytogenes* ocorre amplamente no ambiente, podendo ser isolada do solo, dos fertilizantes orgânicos, da água, dos ambientes de processamento de alimentos e também em diferentes espécies animais (JAY, 1992; HOBBS e ROBERTS, 1998; PAK et al, 2002). São definidos como bastonetes regulares Gram-positivos, não-formadores de esporos, catalase positivos. São psicrotróficos, crescem numa ampla faixa de temperatura que varia, segundo diferentes autores, de 3 °C a 45 °C, com ótimo entre 30 °C e 37 °C (APHA, 1992; SILVA et al, 1997) e de 1 °C a 45 °C (JAY, 1992). São anaeróbios facultativos, fermentam a glicose com produção de ácido lático, sem produção de gás (SILVA et al, 1997) e apresentam crescimento na faixa de pH entre 5,2 e 9,6 (MENDONÇA et al, 2003).

Dentre as espécies de *Listeria*, *L. monocytogenes* é inquestionavelmente patogênica para o homem e, ao contrário da maioria dos patógenos de origem alimentar, que geralmente provocam sintomas gastrintestinais, as principais manifestações clínicas de listeriose são, inicialmente, semelhantes a um resfriado, com febre baixa e mal estar, podendo progredir para meningite, meningoencefalite, septicemia, aborto ou parto prematuro (SILVA et al, 1997).

### **2.9.4 *Salmonella* sp**

Bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos, não-formadores de esporos, pH de crescimento entre 4 e 9, com ótimo de 7, temperatura de crescimento entre 7 °C e 47 °C, e  $A_w$  mínima para crescimento de 0,94 (JAY, 1992; MENDONÇA et al, 2003). Representa um grupo de bactérias, compreendendo aproximadamente 2.000 sorotipos, cuja maioria infecta uma ampla classe de animais e humanos estando disseminada em países de clima tropical e subtropical, causando no homem desordem intestinal e febre por dois a três dias (SILVA e GOMES, 2001).

Uma vez que a bactéria vive no trato intestinal de diversos seres vivos, o leite é facilmente contaminado durante a ordenha dos animais. Podendo também ocorrer a contaminação pela água durante o processo de higienização de equipamentos e utensílios (SILVA e GOMES, 2001).

### **2.9.5 *Bacillus cereus***

Bacilo Gram-positivo, aeróbio facultativo, formador de esporos e produtor de enterotoxina entérica e emética. Sua diferenciação com outras espécies de *Bacillus* é dada em função de sua motilidade e de sua atividade hemolítica. Sua dose infectante é de  $10^6$  microorganismos/grama do alimento (JAY, 1992).

A intoxicação por *B. cereus* apresenta distribuição mundial, a contaminação inicial dos alimentos se dá por esporos. Nos alimentos preparados ou nas sobras alimentares, mantidas entre 10 °C e 50 °C, há germinação e posterior multiplicação bacteriana. A toxinfecção ocorre de alimentos contendo células vegetativas de *B. cereus*, as quais no intestino do homem irão produzir a enterotoxina responsável pelo quadro diarréico.

O agente encontra-se amplamente distribuído na natureza. É isolado freqüentemente no solo, poeiras, água, sedimentos, vegetação, cereais e pêlos de animais. Esta alta disseminação significa que o *B. cereus* é um componente habitual da microbiota intestinal temporária do homem.

### **3- OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral**

- Avaliar a microbiota de grãos de kefir e atividade inibidora da bebida sobre algumas bactérias patogênicas.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Quantificar *Lactobacilos*, *Lactococos*, *Leuconostoques*, Bactérias do Ácido Acético (AAB), Leveduras, mesófilos aeróbios totais e *Enterococos* em diferentes grãos de kefir.

- Avaliar a proporção bacilos/cocos/leveduras presente nos diferentes grãos de kefir.

- Isolar e identificar leveduras nos grãos de kefir estudados .

- Avaliar o kefir bebida produzido por estes grãos quanto a capacidade de inibição de microrganismos patogênicos: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC11229), *Salmonella Typhimurium* (ATCC 6539), *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313) e *Bacillus cereus* (RIBO 1222-173-S4).

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Origem e manutenção das amostras de grãos de kefir

Os grãos de kefir avaliados foram obtidos em três municípios da região Sudeste do Brasil, Viçosa (MG), Caratinga (MG) e São Paulo (SP), todos de origem artesanal, Figura 7. Os códigos utilizados para as amostras estão descritos no quadro 2.



Figura 7: Localização das cidades de origem as amostras de grãos de kefir.

Fonte: adaptado de [www.google.com.br/mapas](http://www.google.com.br/mapas)

Quadro 2: Amostras e códigos utilizados para os grãos de kefir.

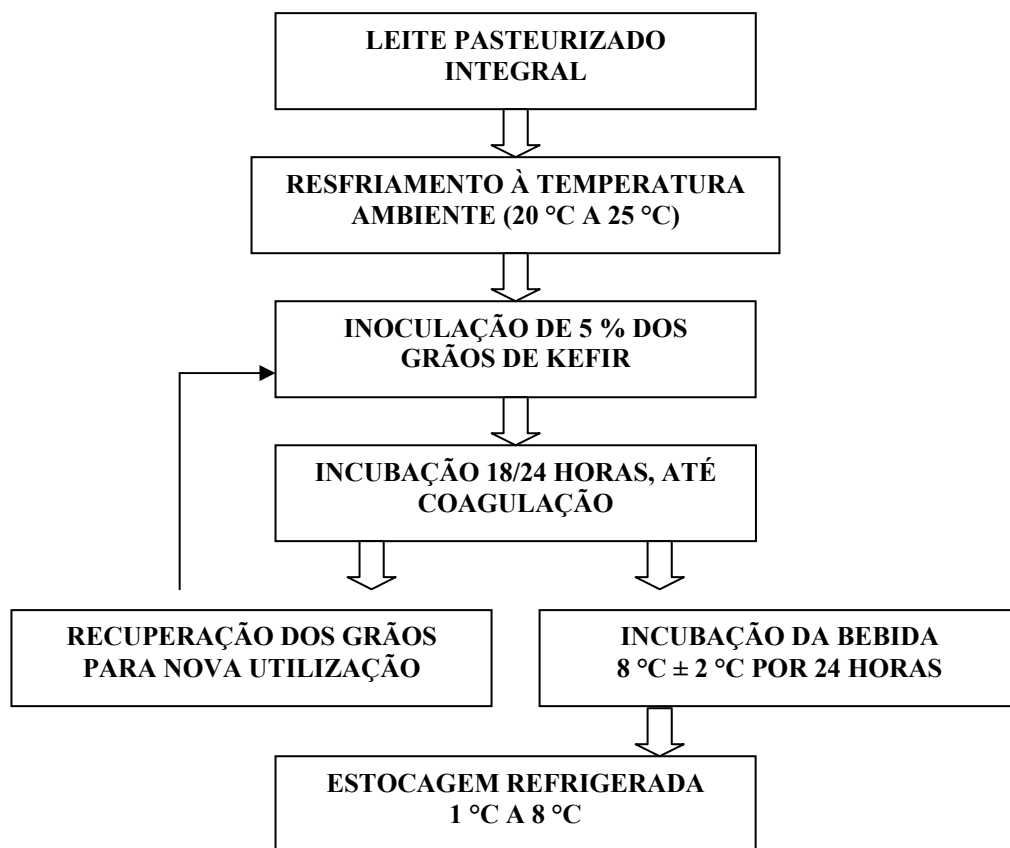
<b>Amostra/origem</b>	<b>Código</b>
Kefir Viçosa	K 1
Kefir Caratinga	K 2
Kefir São Paulo	K 3

As três amostras de grãos de kefir foram mantidas em constante ativação em leite integral pasteurizado. Para manutenção, os grãos foram colocados para fermentar o

leite à temperatura ambiente variando de 20° C a 25° C, até coagulação, retirados com auxílio de peneira, lavados com água destilada e colocados novamente para fermentar outro leite.

A ativação dos grãos por três vezes foi realizada previamente a cada teste forma microbiana, contagem dos grupos microbianos e antagonismo. Para o teste de antagonismo utilizando-se a bebida, os grãos foram retirados e o kefir estocado sob refrigeração, conforme mostra o Quadro 3.

Quadro 3: Ativação dos grãos de kefir e produção da bebida.



#### 4.2 Contagem dos grupos microbianos

Para determinação dos principais grupos microbianos presentes nos grãos de kefir K1, K2 e K3, foram realizados plaqueamentos em meios específicos (Quadro 4) a partir dos grãos de kefir ativos.

Os grãos de kefir foram macerados em cadinho de porcelana esterilizado e diluídos em solução salina a 0,90 %, na proporção de 1/10, posteriormente, foram feitas as diluições seriadas e o plaqueamento. O resultado foi expresso por meio da média de

três repetições de cada plaqueamento e estas comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância (Reis, 2006). As diferentes diluições foram feitas em duplicata.

Quadro 4: Meios para contagem dos grupos microbianos do kefir.

<b>Grupo</b>	<b>Meio de cultura</b>	<b>Incubação</b>	<b>Referências</b>
<i>Lactobacilos</i>	MRS (Difco)/E (etanol)	30 °C, 48 h, anaerobiose	WITTHUHN et al, 2004.
<i>Lactococos</i>	M17 (Difco)	30 °C, 48 h, aerobiose	NINANE et al, 2005. FONTAN et al, 2006.
<i>Leuconostoque</i>	MRS (Difco)/V (vancomicina – Bergamo)	30 °C, 48 h aerobiose	WITTHUHN et al, 2004. REA et al, 1996.
<b>Bactérias do Ácido Acético (AAB)</b>	AAB médium (Vetec)	30 °C, 72 h, anaerobiose	GARROTE et al, 1998.
<b>Leveduras</b>	BDA (Difco)	25 °C, 5 dias, aerobiose	LOPANDIC et al, 2006.
<b>Contagem Total</b>	PCA (Difco)	32 °C, 48 h, aerobiose	WITTHUHN et al, 2004.
<i>Enterococos</i>	KF (Isofar)	30 °C, 48 h, aerobiose	GIRAFFA et al, 1997.

#### 4.3 Determinação das formas microbianas dos diferentes grãos de kefir

Para verificação das formas microbianas dos grãos ativos de kefir K1, K2 e K3, estes foram macerados em cadinhos de porcelana esterilizado, diluídos em solução salina a 0,90 %, na proporção de 1/10 e submetidos à coloração de Gram. Posteriormente, foram visualizados ao microscópio óptico (OLIMPUS BX40) utilizando-se a objetiva com aumento de 100 vezes. Foram visualizados 10 campos

diferentes para cada amostra e realizada a contagem do número de cocos, bacilos e leveduras em cada campo.

#### **4.4 Isolamento, caracterização e identificação de leveduras**

As leveduras foram isoladas a partir das placas, em meio de cultura BDA (Difco), pH 3,5 aferido com solução estéril de ácido tartárico (Vetec) a 10%, utilizando-se os grãos ativos de kefir K1, K2 e K3; sendo selecionadas 15 colônias de cada. As colônias isoladas foram inoculadas em tubos, 15 mm x 100 mm, contendo caldo BHI (Difco)). Após crescimento os isolados foram observados ao microscópio (marca) para verificação da forma microbiana. Os isolados que apresentaram apenas formas leveduriformes foram estriados em placas contendo BHI-ágar (Difco) e separados em grupos de acordo com o perfil observado de suas colônias, os demais isolados que apresentaram formas variadas foram descartados. Para a identificação foram utilizados 5 isolados escolhidos aleatoriamente de cada amostra de kefir K1, K2 e K3, selecionando-se menos 2 representantes de cada grupo com base nas características das colônias.

Para identificação dos isolados foi utilizado o KIT API<sup>®</sup> 20 C AUX (BioMerieux<sup>®</sup> SA, Marcy-l'Etoile/França), seguindo-se as recomendações do fabricante. O Kit API<sup>®</sup> 20 C AUX contém 19 cúpulas plásticas e em cada uma, diferentes fontes de carbono, além de uma cúpula controle (negativo). As cúpulas foram inoculadas com as leveduras e incubadas a 29 °C (+/- 2 °C). A leitura dos resultados foi feita após 48 h e 72 h de acordo com o protocolo definido pelo distribuidor do KIT API<sup>®</sup> 20 C AUX. Realizou-se teste para determinação da presença de hifa ou pseudo-hifa. Este teste é o vigésimo primeiro teste proposto pelo método. A identificação foi obtida a partir do perfil numérico resultante do somatório dos resultados positivos processados em um programa (Apiweb<sup>TM</sup>). A base de dados do API<sup>®</sup> 20 C AUX inclui 45 espécies.

#### **4.5 Teste de antagonismo de kefir esterilizado por filtração.**

O teste para verificação da capacidade do kefir esterilizado por filtração em inibir o crescimento de microrganismos patogênicos foi desenvolvido devido ao fato de ensaios preliminares terem detectado que metodologias clássicas utilizando-se plaqueamentos não se aplicavam à bebida feita com kefir, possivelmente porque o

polissacarídeo, kefiran, apresenta capacidade de impedir a difusão de possíveis substâncias antimicrobianas. Optou-se pela utilização de técnica que emprega a separação do soro por aquecimento e filtração do sobrenadante (Figura 8).

O kefir elaborado com cada uma das amostras K1, K2 e K3 foi aquecido em banho-maria, a 50 °C, por 30 minutos. O soro separado foi filtrado em gaze com algodão por duas vezes e em seguida, centrifugado (CENTRÍFUGA FANEM® EXCELSA BABY 206-R) a 4000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi esterilizado a frio em membrana MILIPORE (membrana em éster de celulose, 0,22 µm de poro, 25 mm de diâmetro).

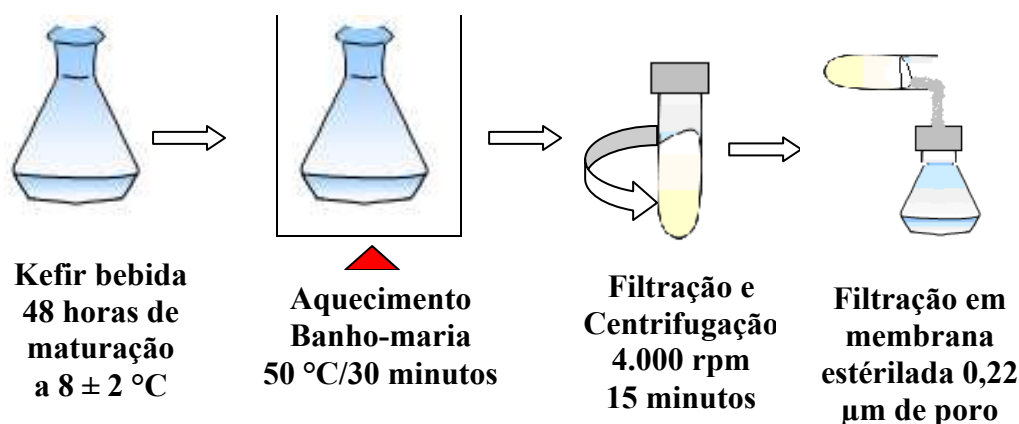


Figura 8: Processo de obtenção de soro de kefir, esterilizado por filtração.

O crescimento de microrganismos patogênicos em meio contendo o soro obtido foi avaliado por espectrofotometria (ESPECTROFOTÔMETRO – SPECTRONIC 20 D+), medindo-se a absorbância a 600 nm, e comparando-se o seu crescimento com o controle (Quadro 5).

Quadro 5: Meios utilizados no controle do teste antagonismo.

Meio	Descrição
Controle	Caldo BHI(Difco) (2,5 mL) adicionado de água destilada (2,5 mL). O pH foi ajustado com solução de ácido clorídrico (HCl).
K1	Caldo BHI (2,5 mL) adicionado de soro de kefir 1 (2,5 mL)
K2	Caldo BHI (2,5 mL) adicionado de soro de kefir 2 (2,5



## 5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Contagem dos grupos microbianos presentes nos grãos de kefir K1, K2 e K3

As contagens de mesófilos aeróbios, bactérias do ácido acético (BAA), *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* e leveduras são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Contagem de grupos microbianos dos grãos de kefir

GRÃO DE KEFIR	Contagem						
	total	BAA	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Leuconostoc</i>	Leveduras
1	*8,87a	6,15a	7,40a	7,37a	4,75a	7,65a	6,39a
2	9,37a	7,76b	9,10b	9,21b	4,60a	8,22a,b	6,86a
3	9,50a	7,25b	9,44b	9,34b	4,94a	8,67b	6,39a
<b>Média**</b>	<b>9,25±0,33</b>	<b>7,07±0,82</b>	<b>8,65 ±1,09</b>	<b>8,64 ±1,10</b>	<b>4,76 ± 0,17</b>	<b>8,18 ± 0,51</b>	<b>6,55 ±0,27</b>

\* média dos resultados em log UFC.mL<sup>-1</sup> obtidas de 3 repetições.

\* as médias das contagens de cada grupo microbiano seguidas por pelo menos uma letra igual não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de significância.

\*\* médias das contagens das três amostras de kefir seguidas dos respectivos desvios padrões.

Garrote et al (2001) isolaram BAA de quatro diferentes grãos de kefir de origem argentina, usando meio de cultura AAB e encontraram contagens médias de 5,41 log UFC.mL<sup>-1</sup>, valores que estão abaixo do encontrado nos grãos de kefir avaliados neste trabalho. Witthuhn et al (2004) encontraram contagens de BAA utilizando meio AAB em oito amostras de grãos de kefir de regiões da África do Sul com valores que variaram de 5,6 a 8,23 log UFC.mL<sup>-1</sup>, indicando que diferentes grãos de kefir podem ter contagens variadas de BAA.

Witthuhn et al (2004) observaram contagens para *lactobacilos* que variaram de 6,04 a 7,62 log UFC.mL<sup>-1</sup>, utilizando condições semelhantes deste trabalho. Os valores encontrados apresentaram-se acima desses e mais compatíveis com os encontrados por Irigoyen et al, (2005), porém em seus trabalhos foi utilizado meio de cultura MRS sem modificações. Resultados variados em trabalhos empregando-se técnicas semelhantes e amostras de origens diferentes são comuns quando se trabalha com grãos de kefir.

Irigoyen et al (2005) realizaram contagens de *lactococos* utilizando M17 e encontraram valores de 8,3 log UFC.mL<sup>-1</sup> para grãos de kefir de origem espanhola, esses valores aproximam-se do encontrado para os grãos pesquisados neste estudo.

Trabalhos de pesquisa realizando contagem de *enterococos* em grãos de kefir não foram encontrados na literatura porém, Fontám, 2006, em isolados obtidos de meio de cultura utilizados para isolar *lactococos* e *lactobacilos* de grãos de kefir, identificou *enterococos* entre as bactérias obtidas. Outros trabalhos de pesquisa tem relatado a presença de *enterococos* em grãos de kefir ao realizar identificação de isolados (MARSHALL, 1993 e YUKSEKDAG et al, 2004).

Os resultados encontrados para contagem de *leuconostoque* nos grãos de kefir avaliados, apresentaram valores superiores aos encontrados em pesquisa realizada por Rea et al, (1996) e Witthuhn et al, (2004), que obtiveram valores que atingiram o máximo de 7,72 log UFC.mL<sup>-1</sup>.

Garrote et al (1998) e Witthuhn et al (2004) encontraram valores para contagem de leveduras em grãos de kefir de aproximadamente 6,5 log UFC.mL<sup>-1</sup>, valores semelhantes aos observados neste estudo.

## 5.2 Proporção cocos/bacilos/leveduras presentes nos grãos de kefir.

A composição das formas microbianas dos grãos de kefir 1, 2 e 3 observados em 10 campos para cada amostra é apresentada no Quadro 6. A proporção média das formas microbianas dos três grãos de kefir das origens estudadas são apresentadas na Figura 9.

Quadro 6: Formas predominantes da microbiota dos grãos de kefir K 1, K 2 e K 3.

Campo de observação	Cocos			Bacilos			Leveduras		
	K 1	K 2	K 3	K 1	K 2	K 3	K 1	K 2	K 3
1	2	10	0	10	2	20	0	0	0
2	10	2	0	0	20	18	8	0	0
3	4	10	2	12	25	10	2	2	15
4	3	4	4	20	0	12	4	15	0
5	15	6	5	20	30	0	6	0	10
6	4	0	7	35	15	15	10	20	5
7	2	0	0	25	16	25	15	16	0
8	0	0	10	30	25	10	5	2	15
9	4	12	12	12	0	0	21	10	5
10	5	5	6	18	36	30	6	1	0
<b>Média</b>	4,9	4,9	4,6	18,2	16,9	14,0	7,7	6,6	5,0

A proporção encontrada nos três grãos de kefir para cocos, bacilos e leveduras está de acordo com o descrito por Ângulo et al, 1993, em grãos de kefir de origem espanhola. A proporção cocos/bacilos/leveduras, pode variar de acordo com a origem do grão de kefir, porém é comum uma proporção maior de bacilos, seguidos por leveduras e cocos (WITTHUHN et al, 2004).

### 5.3 Isolamento e identificação de leveduras

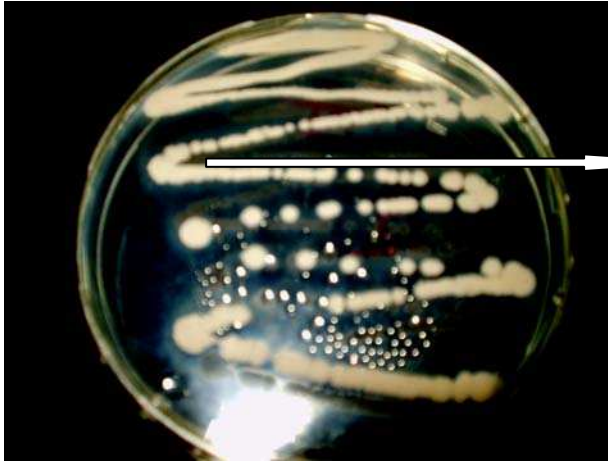
Após verificação dos 15 isolados de cada grão de kefir ao microscópio observou-se que, 6 isolados do kefir 1, 2 isolados do kefir 2 e 5 isolados do kefir 3 apresentavam formas microbianas variadas sendo descartados por não estarem puros, restando os que apresentaram somente leveduras.

A verificação das colônias estriadas em BHI, dos isolados puros de leveduras, apresentou 5 grupos variados, com base na observação das colônias Quadro 7.

Quadro 7: Perfil das colônias observadas nos grupos:

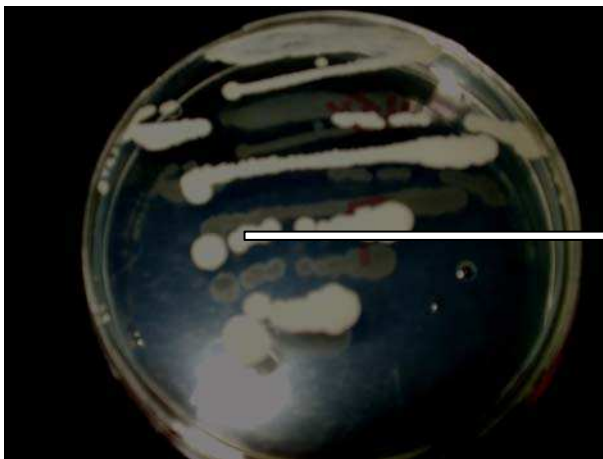
GRUPO	PERFIL	NUMERAÇÃO DOS ISOLADOS		
		K1	K2	K3
1	colônias mucilaginosas cor creme, com leve formação de pigmento avermelhado	—	—	1, 2, 3
2	colônias mucilaginosas cor creme.	—	1, 2, 3	—
3	colônias pequenas e médias sem crescimento concentrado ao centro.	1	4	—
4	colônias com crescimento concentrado ao centro e coloração creme.	2, 3, 4, 5, 6, 7, 8	5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12	4, 5, 6, 7, 8, 9, 10
5	colônias mucilaginosas cor creme levemente escuras.	9	13	—

Nas figuras 10, 11, 12, 13 e 14 são apresentados os perfis dos isolados separados respectivamente nos grupos 1, 2, 3, 4 e 5.



Perfil grupo 1.

Figura 10: Isolado nº 1 do kefir 3.



Perfil grupo 2.

Figura 11: Isolado nº 3 do kefir 2.



Perfil grupo 3.

Figura 12: Isolado nº 1 do kefir 1.

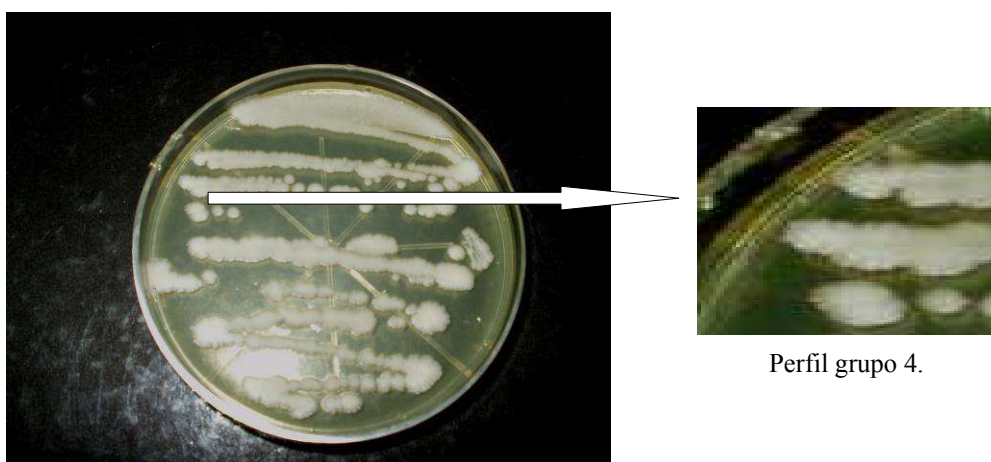


Figura 13: Isolado n° 9 do kefir 2.

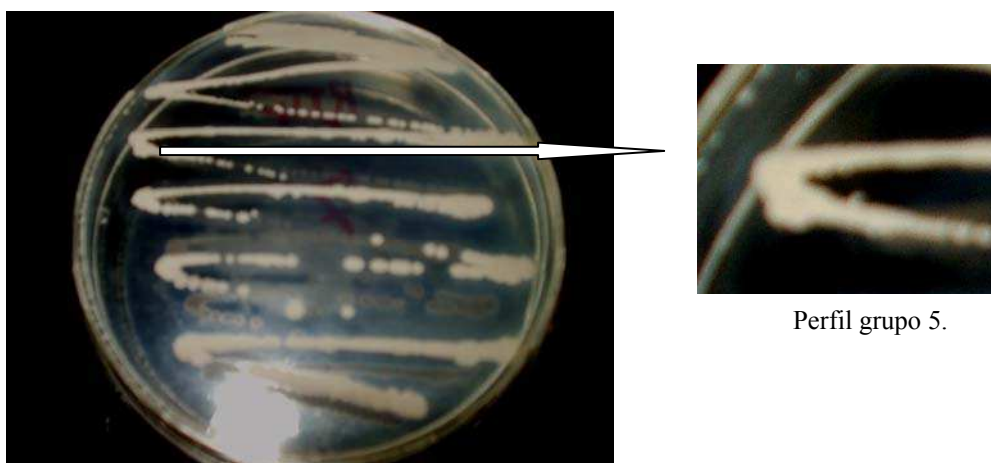


Figura 14: Isolado n° 9 do kefir 1.

Os isolados foram selecionados aleatoriamente, para que cada grão de kefir (1, 2 e 3) fosse representado por 5 de suas leveduras isoladas no teste de identificação API 20 AUX. A seleção também teve como objetivo que cada grupo (1, 2, 3, 4 e 5) observado pela forma das colônias estriadas em placas, tivesse pelo menos 2 isolados submetidos à identificação.

Na Tabela 4 é mostrado a identificação pelo teste com o percentual de acerto e a classificação obtida.

Tabela 4: Identificação dos isolados selecionados pelo API® 20 C AUX.

Isolado	Perfil numérico	Espécie	% Acerto	Classificação
1(G1)	6143014	<i>Candida dubliniensis</i>	99,90	Excelente
6(G4)	6140354	<i>Pichia ohmeri</i>	98,40	Boa
<b>K1</b> 7(G4)	6140354	<i>Pichia ohmeri</i>	98,40	Boa
8(G4)	6140354	<i>Pichia ohmeri</i>	98,40	Boa
9(G5)	6042426	<i>Candida kefir</i>	99,90	Excelente
2(G2)	6002144	<i>Candida zeilanoides</i>	99,90	Excelente
3(G2)	6002144	<i>Candida zeilanoides</i>	99,90	Excelente
<b>K2</b> 4(G3)	6143014	<i>Candida dubliniensis</i>	99,90	Excelente
9(G4)	6140354	<i>Pichia ohmeri</i>	98,40	Boa
13(G5)	6042426	<i>Candida kefir</i>	99,90	Excelente
1(G1)	6460436	<i>Candida kefir</i>	99,90	Excelente
2(G5)	6460436	<i>Candida kefir</i>	99,90	Excelente
<b>K3</b> 3(G3)	6140354	<i>Pichia ohmeri</i>	98,40	Boa
6(G4)	6140354	<i>Pichia ohmeri</i>	98,40	Boa
8(G4)	6460436	<i>Candida kefir</i>	99,90	Excelente

De acordo com os resultados dos 5 isolados de cada grão de kefir, somente um isolado da amostra do kefir 1, um isolado da amostra do kefir 2 e 3 isolados da amostra do kefir 3 foram identificados como *Candida kefir*, única espécie dentre as leveduras identificadas normalmente encontradas em grãos de kefir de acordo com a literatura (MARSHALL, 1993; WITHUHN et al, 2004).

Nas figuras 15, 16, 17 e 18 são apresentadas as galerias do API com a identificação dos carboidratos fermentados pela turvação do meio.

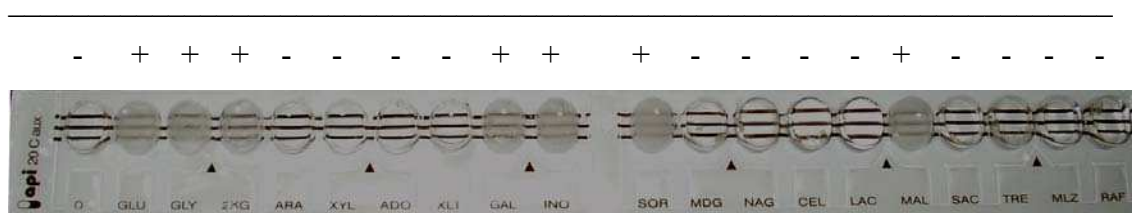


Figura 15: API isolado nº 4 da amostra do kefir 2, *Candida dubliniensis*.

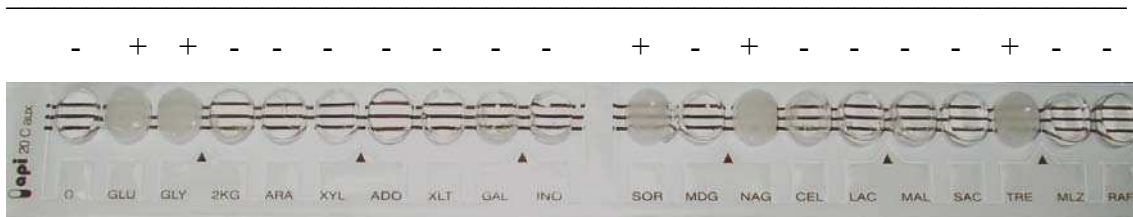


Figura 16: API isolado nº 3 da amostra do kefir 2, *Candida zeilanooides*.

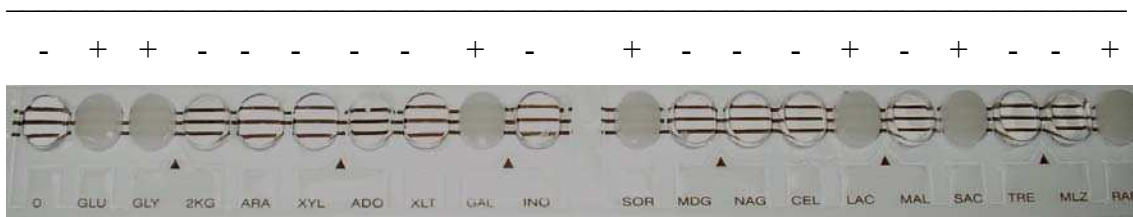


Figura 17: API isolado nº 9 da amostra do kefir 1, *Candida kefir*.

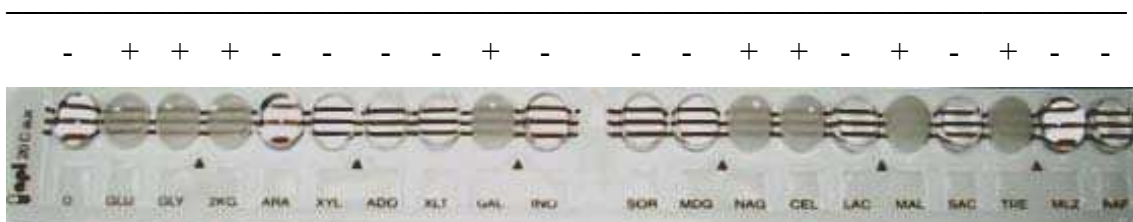


Figura 18: API isolado 3 da amostra do kefir 3, *Pichia ohmeri*.

#### 5.4 Antagonismo do kefir .

Nas tabelas 5, 6, 7, 8 e 9 estão apresentados os resultados médios da absorbância a 600 nm obtida, nas três repetições, pelo crescimento no tempo de 8 horas dos diferentes patógenos no controle e amostras de kefir 1, 2 e 3, com a inibição verificada. Os pH do controle, meio com amostra do kefir 1, 2 e 3 foram respectivamente 6,05; 6,05; 6,04 e 6,05.

Na Tabela 5 estão indicados os percentuais de inibição verificados pelas amostras de kefir 1, 2 e 3 comparado ao controle para cada patógeno e a média geral para as três amostras avaliadas. A relação entre o crescimento médio dos patógenos nas amostras de kefir 1, 2 e 3 está relacionada na figura 19.

Tabela 5: Percentual de inibição das amostras de kefir frente aos patógenos testados.

Patógeno	K 1	K 2	K 3	Média Geral
<i>Listeria monocytogenes</i> (ATCC 15313)	41,45 a	48,61 a	54,18 a	<b>48,08</b>
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 11229)	59,89 a	59,87 a	30,73 a	<b>50,16</b>
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	63,50 a, b	69,15 a	42,80 b	<b>59,08</b>
<i>Salmonela Typhimurium</i> (ATCC 6539)	65,35 a	73,05 a	44,99 a	<b>61,13</b>
<i>Bacillus cereus</i> (RIBO 1222-173-S4)	72,88 a	86,80 b	70,38 a	<b>76,69</b>

Obs: Resultados em (%) de inibição referentes à média de três repetições.

Médias de cada um dos três kefir, seguidas por pelo menos uma letra igual, não diferem entre si, quando comparadas para cada patógeno, ao nível de 5 % de significância pelo teste de Newman-Keuls.

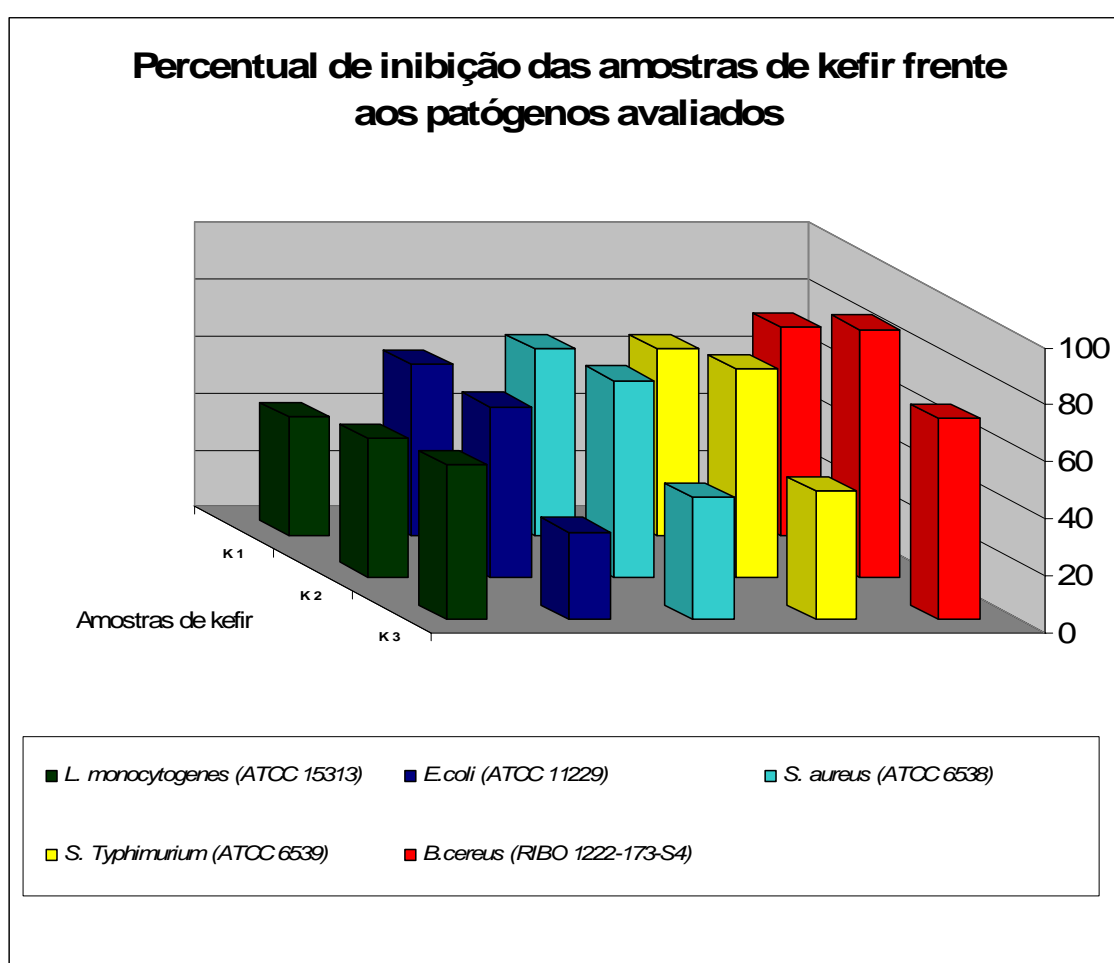


Figura 19: Inibição média das amostras de kefir esterilizados por filtração, frente aos patógenos avaliados.

Todas as amostras de kefir avaliadas apresentaram redução média de no mínimo 30 % no crescimento dos patógenos comparado ao controle. As maiores inibições ocorreram na amostra de kefir 2, para o crescimento de *Bacillus cereus* (RIBO

1222-173-S4) (86,8 %) e *Salmonella Typhimurium* (ATCC 6539) (73,05 %) e amostra do kefir 1 para o crescimento de *Bacillus cereus* (RIBO 1222-173-S4) (72,88 %).

O patógeno mais inibido em média comparado às três amostras de kefir foi, *Bacillus cereus* (RIBO 1222-173-S4) apresentando crescimento 76,69 % menor que o controle.

A inibição de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) nas três amostras variou de 42,80 % a 69,15 %, para o crescimento de *Escherichia coli* (ATCC 11229), a faixa de inibição foi de 30,73 % a 59,89 %, sendo este patógeno o que apresentou a maior diferença de inibição comparado às três amostras de kefir, *Salmonella Typhimurium* (ATCC 6539), apresentou faixa de inibição de 44,99 % a 73,05 %, *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313) de 41,45 % a 54,18 % e *Bacillus cereus* (RIBO 1222-173-S4) de 70,38 % a 86,80 %.

De acordo com a análise comparativa das médias, as amostras de kefir apresentaram variações apenas nas avaliações do patógeno *S. áureos* (ATCC 6538) e *B. cereus*, onde a amostra de K 2 foi mais eficiente na inibição que a amostra de K 3.

Em vários trabalhos tem sido demonstrado o efeito antagonista de kefir (SALOFF-COSTE, 1996; GARROTE et al, 2000 e GÜVEN e GOLES, 2003) sendo que nos dois últimos a inibição ocorreu na bebida fermentada frente a bactérias Gram (+) e Gram (-) sem especificações das mesmas.

Yuksekgag et al (2004) demonstraram inibição de microrganismos isolados dos grãos de kefir sobre *S. aureus* e *Pseudomonas*. Esses autores sugeriram o peróxido de hidrogênio e outras substâncias não citadas, atuaram como responsáveis pela inibição. Além disso, sugeriram também a possibilidade dessa inibição estar ligada à presença de acetaldeído que foi produzido por 21 isolados dos grãos de kefir. No entanto verificaram que a concentração encontrada foi considerada baixa e provavelmente sem influência no resultado.

No presente estudo, verificou-se antagonismo de três amostras de grãos de kefir coletados em diferentes cidades da região sudeste do Brasil. As condições utilizadas no teste com pH em torno de 6,05 para os tratamentos e para o controle indicaram que somente a presença de ácidos orgânicos produzidos pelo metabolismo das bactérias lácticas não explica os resultados, ou seja, o antagonismo observado não foi em função do abaixamento de pH e portanto outras substâncias inibidoras podem estar presentes no soro obtido da bebida e envolvidos nos resultados.

## 6- CONSIDERAÇÕES FINAIS

As amostras de grãos de kefir 1 (Viçosa), kefir 2 (Caratinga) e kefir 3 (São Paulo), apresentaram distribuição em relação às formas de cocos, bacilos e leveduras de acordo com vários outros trabalhos de pesquisa realizados em diferentes partes do mundo, indicando a predominância dos bacilos. As contagens dos grupos microbianos observadas nas três amostras apresentaram diferenças que evidenciaram que produtos de origens diferentes apresentam microbiotas variadas conforme descrito em outros trabalhos semelhantes.

O teste de identificação das leveduras isoladas das amostras de grãos de kefir apresentou *Candida kefir*, levedura frequentemente isolada de grãos de kefir, *Candida dubliniensis*, *Pichia ohmeri* e *Candida zeilanoides*, essas três últimas até então não descritas em trabalhos anteriores.

As amostras de kefir apresentaram inibição do crescimento frente aos patógenos *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC11229), *Salmonella Typhimurium* (ATCC 6539), *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313) e *Bacillus cereus* (RIBO 1222-173-S4) que variaram em média de 48,08 % a 76,69 % entre os diferentes patógenos, sendo a amostra de kefir 2 testada para o crescimento de *Bacillus cereus* (RIBO 1222-173-S4) a que apresentou a maior inibição geral, (86,80 %).

Essa capacidade de inibição apresentada é de importância uma vez que contribui para sua classificação como alimento funcional. Além disso, a técnica utilizada no estudo viabilizou a avaliação da bebida “in vitro”.

Esse estudo permitiu constatar que kefir de três diferentes origens apresentaram variações na microbiota e na capacidade de antagonizar patógenos.

## 7. REFERÊNCIAS

ABRAHAM, A.G. AND DE ANTONI, G.L. Characterization of kefir grains grown in cows' milk and in soya milk. **Journal of Dairy Research** 66: 327-333, 1999.

ALEXANDRE, D.P., SILVA, M.R., SOUZA, M.R., SANTOS, W.L.M. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de queijo-de-minas artesanal do Serro (MG) frente a microrganismos indicadores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, vol.54 n° 4. Belo Horizonte July/Aug. 2002. Scielo. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S010209352002000400014&lng=en&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010209352002000400014&lng=en&nrm=iso&tlng=pt) , acessado em 21/11/07.

ALM, L. Effect of fermentation on lactose, glucose, and galactose content in milk and suitability of fermented milk products for lactose intolerant individuals. **Journal of Dairy Science** 65: 346-352, 1982.

ANGULO, L., LOPES, E., LEMA, C. Microflora present in kefir grains of the Galicial region (north-west of Spain). **Journal of Microbiology and Biotechnology**, 16, 541-543, 1993.

APELLA, M.C., GONZÁLEZ, S.N., NADER DE MACÍAS, M.E., ROMERO, N. & OLIVER, G. *In vitro* studies on the inhibition of the growth of *Shigella sonnei* by *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*. **Journal of Applied Bacteriology**, 73, 480-483, 1992.

(APHA) AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the enumeration of dairy products**. 16 ed., Washington, DC: APHA, p. 213-246 1992.

ARCHER, M.H., DILLON, V.M., CAMPBELL-PLATT, G. & OWENS, J.D. Effect of diacetyl on growth rate of *Salmonella typhimurium* determined from detection times in a micro-well plate photometer. **Food Control**, 7, 63-67, 1996.

AROUTCHEVA, A., GARITI, D. SIMON, M., SHOTT, S., FARO, J., SIMOES, J. A., E FARO, S. Defense factors of vaginal lactobacilli. **American Journal of Obstetrics Gynecology**, 185, 375-379, 2001

ASSADI, M. M., POURAHMAD, R., MOAZAMI, N. Use of isolated kefir starter cultures in kefir production. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, 16, 541-543, 2000.

BALABAN, N.; RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins. **International Journal of Food Microbiology**, v. 61, p. 1-10, 2000.

BRIALY, C., RIVALLAND, P., COIFFARD, L. & HOLTZHAUER, Y. Microbiological study of lyophilised kefir. **Folia Microbiologica**, 40, 198-200, 1995.

CARDOSO, L.G.V. Evaluation of a soured kefir on intestinal motility of rats. **Jornal Brasileiro de Fitomedicina**, v.1, n.3, p. 107-109, 2003.

CEVIKBAS, A., YEMNI, E. Antitumoural Antibacterial and Antifungal Activities of Kefir and Kefir Grain. **Phytotherapy Research**, vol. 8, 78-82, 1994.

CONDON, S. Responses of lactic acid bacteria to oxygen. **FEM Microbiology Reviews**, 46, 269-280, 1987.

DAESCHEL, M.A. Antimicrobial substance from lactic acid bacteria for use as food preservatives. **Food Technology**, 164-166, 1989.

DAHL, T.A., MIDDEN, W.R. & HARTMAN, P.E. Comparison of killing of Gram negative and Gram-positive bacteria by pure singlet oxygen. **Journal of Bacteriology**, 171, 2188-2194, 1989.

DE MAN, J. C., ROGOSA, M. E., e SHARPE, M. E. A medium for the cultivation of lactobacilli. **Journal of Applied Bacteriology**, 23, 130-135, 1960.

DIAS JR, Carlos F. Kefir Brasil. Acessado em Julho de 2007. Disponível em URL: [www.kefirbrasil.com.br](http://www.kefirbrasil.com.br).

EKLAND, T. The effect of carbon dioxide on bacterial growth and on uptake processes in the bacterial membrane vesicles. **International Journal of Food Microbiology**, **1**, 179-185, 1984.

ERCOLINI, D., HILL, P. J., DODD, C.E.R. Bacterial community structure and location in Stilton cheese. **Applied and Environmental Microbiology**, n. 6, v. 69, p. 3540-3548, 2003.

FERREIRA, C. L. L. F. **Produtos Lácteos Fermentados: Aspectos Bioquímicos e Tecnológicos**, 3ª edição-Viçosa: UFV, 2005.

FLEET, G.H. Yeasts in dairy products. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 68, p. 199-211, 1990.

FONTÁN, M. G., MARTÍNEZ, S. FRANCO, I. CARBALLO, J. Microbiological and chemical changes during the manufacture of Kefir made from cows' milk, using a commercial starter culture. **International Dairy Journal** 16, 762–767, 2006.

FUJISAWA, T., ADACHI, S., TOBA, T., ARIHARA, K. AND MITSUOKA, T. *Lactobacillus kefiranofaciens* sp. nov. isolated from kefir grains. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 38: 12-14, 1988.

GARROTE, G.L., ABRAHAM, A.G. & DE ANTONI, G.L. Preservation of kefir grains, a comparative study. **International Journal of Food Science and Technology**, **30**, 77-84, 1997.

GARROTE, G. L.; ABRAHAM, A. G.; ANTONI, G. L. Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. **Journal of Dairy Reserch**, 68, 639-652, 1998.

GARROTE, G.L., ABRAHAM, A.G. & DE ANTONI, G.L. Inhibitory power of kefir: the ratio of organic acids. **Journal of Food Protection**, **63**, 364-369, 2000.

GARROTE, G.L., ABRAHAM, A.G. & DE ANTONI, G.L. Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. **Journal of Dairy Research**, 68, 639-652, 2001.

GEOCITIE. Kefir Brasil. Acessado em Julho de 2008. Disponível em URL: Fonte: [http://geocities.yahoo.com.br/kefirbrasil/Fazendo\\_Real\\_Kefir.htm](http://geocities.yahoo.com.br/kefirbrasil/Fazendo_Real_Kefir.htm)

GILFILLAN GD, SULLIVAN DJ, HAYNES K, PARKINSON T, COLEMAN DC, GOW NAR. "Candida dubliniensis: Phylogeny and putative virulence factors". **Microbiology**, 144 (4): 829–838., 1998.

GILLILAND, S.E. & SPECK, M.L. Antagonistic action of *Lactobacillus acidophilus* toward intestinal and foodborne pathogens in associative cultures. **Journal of Food Protection**, 40, 820-823, 1977.

GIRAFFA, G., CARMINATI, D., NEVIANI, E. Enterococci isolated from dairy products: a review of risks and potential technological use. **Journal of Food Protection**, v. 60, 732– 738.1997.

GOLOWCZYC M.A., MOBILI P., GARROTE G.L., ABRAHAM A.G., DE ANTONI G.L. Protective action of *Lactobacillus kefir* carrying S-layer protein against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. **International Journal of Food Microbiology** 118: 264–273, 2007.

GONCHAROVA, G.I. Effects of different types of feeds for newborn infants on intestinal micro biocenosis. *Vopr. Pitan.*, v.6, p. 49-53, 1979.

GORSKI, D. Kefir: 21 st century yogurt? **Dairy Foods** 95:49, 1994.

GUPTA, P.K., MITAL, B.K. & GARG, S.K. Inhibitory activity of *Lactobacillus acidophilus* against different pathogens in milk. **Journal of Food Science and Technology**, **33**, 147-149, 1996.

GÜVEN, A., GÜVEN, A. e GÜLMEZ, M. The effect of kefir on the activities of GSH-Px, GST, CAT, GSH and LPO levels in carbon tetrachloride-induced mice tissues. **Journal of Veterinary Medicine B** 50: 412-416, 2003.

HELANDER, I.M., VON WRIGHT, A. e MATTILA-SANDHOLM, T.M. (1997). Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. **Trends in Food Science and Technology**, **8**, 146-150, 1997.

HERTZLER, S. R.; CLANCY, S. M. Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. **Journal of The American Dietetic Association**, vol. 103, nº 5, 2003.

HOBBS, B. C.; ROBERTS, D. **Toxinfecções e controle higiênico sanitário de alimentos**. Tradução de Silvia Panetta Nascimento e Marcelo Arruda Nascimento. 1. ed. São Paulo-SP: Livraria Varela, p. 29-31, 1998.

HOSONO, A., TANABE, T., OTANI, H. Binding properties of lactic acid bacteria isolated from kefir milk with mutagenic amino acid pyrolyzates. **Milchwissenschaft** 45: 647-651, 1990.

IRIGOYEN, A.; ARANA, I.; CASTIELLA, M.; TORRE, P.; IBANEZ, F. C. Microbiological, physicochemical, and sensory characteristics do kefir durante estocagem. **Food Chemistry**, 90, 613-620, 2005.

IWASAWA, S., UEDA, M., MIYATA, N., HIROTA, T. & AHIKO, K. Identification and fermentation character of kefir yeast. **Biological Chemistry**, **46**, 2631- 2636, 1981.

JAY, J.M. Antimicrobial properties of diacetyl. **Applied and Environmental microbiology**, 44, 525-532, 1982.

JAY, J. M. **Modern food microbiology**. 4. ed. New York: Chapman & Hall, 1992. 701 p.

JAY, J.M., *Microbiologia de alimentos*. 6 ed., Porto Alegre, **Artmedia**. 2005. 711p.

JAKOBSEN, M., NARVHUS, J., Yeasts and possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products. **International Dairy Journal**, v. 6, p. 755- 768, 1996.

JUVEN, B.J., SCHVED, F. e LINDER, P. Antagonistic compounds produced by a chicken intestinal strain of *Lactobacillus acidophilus*. **Journal of Food Protection**, **55**, 157-161, 1992.

Koroleva, N.S. Technology of kefir and kumys. Chapter VII. **Bulletin of the International Dairy Federation**, **277**, 96-100, 1988

KAUFMANN, K. Kefir Rediscovered (edited by K. Kaufmann). Pp. 3-17, 38. **Burnaby**, Canada: Alive Books, 1997.

KULSHRESTHA, D.A. e MARTH, E.H. Inhibition of bacteria by some volatile and non-volatile compounds associated with milk. I. *Escherichia coli*. **Journal of Milk and Food Technology**, **37**, 510-516, 1974a.

KULSHRESTHA, D.A. e MARTH, E.H. Inhibition of bacteria by some volatile and non-volatile compounds associated with milk. II. *Salmonella typhimurium*. **Journal of Milk and Food Technology**, **37**, 539-544, 1974b.

KULSHRESTHA, D.A. e MARTH, E.H. Inhibition of bacteria by some volatile and non-volatile compounds associated with milk. III. *Staphylococcus aureus*. **Journal of Milk and Food Technology**, **37**, 545-550, 1974c.

KURMANN, J.A., RAŠI, J.L. e KROGER, M. *An International Inventory of Fermented Milk, Cream, Buttermilk, Whey, and Related Products* (edited by J.A. Kurmann).

**Encyclopaedia of Fermented Fresh Milk Products**, Pp. 156-161. New York: Van Nostrand Reinhold, 1992.

KWAK, H.S., PARK, S.K. e KIM, D.S. Biostabilization of kefir with a nonlactose-fermenting yeast. **Journal of Dairy Science**, **79**, 937-942, 1996.

LARPENT, J.P., BERVAS, E., BEZENGER, M.C. Biotechnologie des levures. Paris. Masson. 1991. 425p.

LIBERTÉ. Acessado em Julho de 2008. Disponível em URL: Fonte: [www.liberte.qc.ca/en/page.ch2?uid=kefir22](http://www.liberte.qc.ca/en/page.ch2?uid=kefir22).

LIBUDZISZ, Z. & Piatkiewicz, A. Kefir production in Poland. **Dairy Industries International**, **55**, 31-33, 1990.

LIN, C., CHEN, H. e LIU, J. Identification and characterisation of lactic acid bacteria and yeasts isolated from kefir grains in Taiwan. **Australian Journal of Dairy Technology**, **54**, 14-18, 1999.

LIU, J.A.P. e MOON, N.J. Kefir – a ‘new’ fermented milk product. **Cultured Dairy Products Journal**, **18**, 11–12, 1983.

LOPANDIC, K., ZELGER, S., BÁNSZKY, L. K., ELISKASES-LECHNER, F., PRILLINGER, H. Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. **Food Microbiology**, n. 23, p. 341-350, 2006.

MANN, E.J. Kefir. **Dairy Industries International**, **44**, 39-41, 1979.

MARSHALL, V.M. Fermented milks and their future trends. I. Microbiological aspects. **Journal of Dairy Research**, **54**, 559-574, 1987.

MARSHALL, V.M. KEFIR. In: **Encyclopaedia of Food Science and Technology**, Vol. 3 (edited by Y.H. Hui). Pp. 1804-1808. Chichester, UK: John Wiley e Sons, 1993.

MENDONÇA, R. C. S., VIEIRA, E. N. R., OLIVEIRA, K. A. de M. Patógenos na indústria de carnes e derivados. In: Editado [por] Regina Célia Santos Mendonça... [e outros]. **Microbiologia de Alimentos: qualidade e segurança na produção e consumo**. Viçosa-MG: Tribuna Editora Gráfica, p. 21-48, 2003.

MUROFUSHI, M., SHIOMI, M., AIBARA, K. Effect of orally administered polysaccharide from kefir grain on delayed-type hypersensitivity and tumor growth in mice. **Japan Journal of Medical Science Biology** 36: 49–53, 1983.

NAIDU, A.S., BIDLACK, W.R. E CLEMENS, R.A. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 38, 26-34, 1999.

NINANE, V. BERBEN, G. ROMNEE, J. OGER, J. Variability of the microbial abundance of a kefir grain starter cultivated in partially controlled conditions. **Biotechnol. Agron. Soc. Environ.** 9 (3), 191–194, 2005.

OLSVIK, O.; WASTESON, Y.; LUND, A.; HORNES, E. Pathogenic *Escherichia coli* found in food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 12, p. 103-114, 1991.

OSADA, K., NAGIRA, K., TERUYA, K., TACHIBANA, H., SHIRAHATA, S., MURAKAMI, H. Enhancement of interferon- $\beta$  production with sphingomyelin from fermented milk. **Biotherapy** 7: 115–123, 1994.

PAK, S.; SPAHR, U.; JEMMI, T.; SALMAN, M. D. Risk factors for *L. monocytogenes* contamination of dairy products in Switzerland, 1990-1999. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 53, p. 55-65, 2002.

PIARD, J.C. e DESMAZEAUD, M. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. II. Bacteriocins and other antibacterial substances. **Lait**, 71, 525- 541, 1991.

PINTADO, M. E.; SILVA, J. A. L. Microbiological and rheological studies on Portuguese Kefir grains. **International Journal of Food Science and Technology**, 31, 15-26, 1996.

PLATE, C. A. e LURIA, S. E. Stages in Colicin K Action as Reveled by the Action of Trypsin. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 69, p. 2030-2034, 1972.

POWELL, J. E. **Bacteriocins and bacteriocin producers present in kefir and kefir grains**. 2006. 115 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Department of Food Science Faculty of AgriSciences Stellenbosch University,

RAVEN, P. H., EVERT, R. F., EICHHORN, S. E. *Biologia Vegetal*. Rio de Janeiro. **Guanabara Koogan**. 2001. 906p.

REA, M. C.; LENNARTSSON, T. Irish kefir-like grains: their structure, microbial composition and fermentation kinetics. **Journal of Applied Bacteriology**, 81, 83-94, 1996.

REIS, F. P. **Estatística Aplicada**. 2006, 103 f. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

RIBEIRO, A. S. M. G. **Coliformes em queijo tipo Minas Frescal: avaliação de metodologias para enumeração e isolamento**. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras-MG, 1981. 86 f.

ROSSLAND, E., LANGSRUD, T., GRANUM, P.E. e SORHAUG, T. Production of antimicrobial metabolites by strains of *Lactobacillus* or *Lactococcus* cocultured in milk. **International Journal of Food Microbiology**, 98, 193-200, 2005.

SAAVEDRA, J.M. Microbes to fight microbes: a not so novel approach to controlling diarrheal diseases. **Journal of Paediatric Gastroenterology and Nutrition**, 21, 125-129, 1995.

SALOFF-COSTE, C.J. KEFIR. Nutritional and health benefits of yoghurt and fermented milks. **Danone World Newsletter**, 11, 1-7, 1996.

SANTOS, A., SAN MAURO, M., SANCHEZ, A., TORRES, J.M. e MARQUINA, D. The antimicrobial properties of different strains of *Lactobacillus* spp. Isolated from kefir. **Systematic and Applied Microbiology**, **26**, 434-437, 2003.

SHAHANI, K.M. e CHANDAN, R.C. Nutritional and healthful aspects of cultured and culture-containing dairy foods. **Journal of Dairy Science**, **62**, 1685-1694, 1979.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 1. ed. São Paulo-SP: Livraria Varela Ltda., 1997.

SILVA, F. T.; GOMES, C. A. O. Segurança alimentar de leite e derivados: Aplicação de BPF e APPCC. IN: PORTUGAL, J. A. B.; CASTRO, M. C. D.; SILVA, P. H. F.; NEVES, B. S.; ARCURI, E. F. (Ed.) **O agronegócio do leite e os alimentos lácteos funcionais**. Juiz de Fora-MG: Templo Gráfica e Editora Ltda., p. 107-150, 2001.

SIMOVA, E., BESHKOVA, D., ANGELOV, A., HRISTOZOVA, TS., FRENGOVA, G. E SPASOV, Z. Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, **28**: 1-6, 2002.

SHIOMI M., SASAKI K., MUROFUSHI M. AND AIBARA K. Antitumor activity in mice of orally administered polysaccharide from kefir grain. **Japanese Journal of Medical Science and Biology** **35**: 75-80., 1982.

STEINKRAUS K.H. Acid-fermented milk and milk/cereal foods. In: **Handbook of Indigenous Fermented Foods**, 2nd ed (edited by K.H. Steinkraus). Pp. 305-308. New York: Marcel Dekker Inc., 1996.

SUKHOV, S.V., KALAMKAROVA, L.I., LL'CHENKO, L.A. e ZHANGABYLOV, A.K. Microfloral changes in the small and large intestines of chronic enteritis patients on diet therapy including sour milk products. *Voprosy Pitani* **4**: 14-17. (in Russian, abstract only), 1986.

TAKIZAWA, S., KOJIMA, S., TAMURA, S., FUJINAGA, S., BENNO, Y. e NAKASE, T. *Lactobacillus kefirgranum* sp. nov. and *Lactobacillus parakefir* sp. nov., two new species from kefir grains. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 44, 435-439, 1994.

VAN WYK, J. The inhibitory activity and sensory properties of kefir, targeting the low-income African consumer market. M.Sc. **Thesis. University of Stellenbosch**, Stellenbosch, South Africa, 2001.

VANETTI, M. C. D. Microorganismos patogênicos em leite. In: MENDONÇA, R. C. S. et al. (Ed.) **Microbiologia de alimentos: qualidade e segurança na produção e consumo**. Viçosa-MG: Tribuna Editora Gráfica, 2003. p. 49-56.

VERNOZY-ROZAND, C.; MAZUY, G.; PREVOST, G.; LAPEYRE, C.; BES, M.; BRUN, Y.; FLEURETTE, J. Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococci isolated from goats' milk and cheese. **International Journal of Food Microbiology** v. 30, p. 271-280, 1996.

VINDEROLA, C.G., DUARTE, J., THANGAVEL, D., PERDIGÓN, G., FARNWORTH, E., MATAR, C. Immunomodulating capacity of kefir. **Journal of Dairy Research**, 72: 195–202, 2005.

VRESE, M. D., KELLER, B., BARTH, C. A. Enhancement of intestinal hydrolysis of lactose by microbial  $\beta$ -galactosidase (EC 3.2.1.23) of kefir. **Journal of nutrition**, 61: 61-75, 1991.

VUJICIC, I.F., VULIC, M. AND KÖNYVES, T. Assimilation of cholesterol in milk by kefir cultures. **Biotechnology Letters**, 14: 847-850, 1992.

WITTHUHN, R. C., SCHOEMAN, T., BRITZ, T. J. Isolation and characterization of the microbial population of different South African kefir grains. **International Journal of Dairy Technology**, v.57, n. 1, p.33-37, 2004.

WITTHUHN, R.C.; CILLIERS, A.; e BRITZ, T. Evaluation of different preservation techniques on the storage potential of Kefir grains. **Journal of Dairy Reserch**, 72, 125-128, 2005.

YUKSEKGAG, Z. N., BEYATLI, Y. E ASLIM, B. Determination of some characteristics coccoid forms of lactic acid bacteria isolated from Turkish kefir with natural probiotic. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie** 37: 663-667, 2004.

ZUBILLAGA, M. Effect of probiotics and functional foods and their use in different diseases. **Nutrition Research** 21, 569-579, 2001.

## **APÊNDICES**

Apêndice A. Contagem total de mesófilos aeróbios de amostras de grãos de kefir.

<b>Amostra</b>	<b>Repetição</b>	<b>10<sup>-5</sup></b>	<b>10<sup>-6</sup></b>	<b>10<sup>-7</sup></b>	<b>UFC/g</b>
K 1	1	–	inc inc	124 160	1,4x10 <sup>9</sup>
	2	–	310 261	28 36	3,2x10 <sup>8</sup>
	3	–	inc inc	191 167	1,8x10 <sup>9</sup>
K 2	1	–	inc inc	233 261	2,5x10 <sup>9</sup>
	2	–	inc inc	250 263	2,6x10 <sup>9</sup>
	3	–	inc inc	189 211	2,0x10 <sup>9</sup>
K 3	1	–	inc inc	450 550	5,0x10 <sup>9</sup>
	2	–	inc inc	300 480	3,9x10 <sup>9</sup>
	3	–	inc inc	156 160	1,6x10 <sup>9</sup>

Apêndice B. Contagem de Bactérias do Ácido Acético (BAA) de amostras de grãos de kefir.

<b>Amostra</b>	<b>Repetição</b>	<b>10<sup>-4</sup></b>	<b>10<sup>-5</sup></b>	<b>10<sup>-6</sup></b>	<b>UFC/g</b>
K 1	1	201 310	10 23	– –	2,6x10 <sup>6</sup>
	2	80 70	1 1	0 0	7,5x10 <sup>5</sup>
	3	121 156	11 17	– –	1,4x10 <sup>6</sup>
K 2	1	– –	inc inc	320 415	3,7x10 <sup>7</sup>
	2	– –	inc inc	84 61	7,2x10 <sup>7</sup>
	3	– –	inc inc	68 73	7,0x10 <sup>7</sup>
K 3	1	– –	100 108	35 45	1,0x10 <sup>7</sup>
	2	– –	102 110	40 43	1,0x10 <sup>7</sup>
	3	– –	621 713	56 54	5,5x10 <sup>7</sup>

Apêndice C. Contagem de Lactobacilos de amostras de grãos de kefir.

<b>Amostra</b>	<b>Repetição</b>	<b>10<sup>-5</sup></b>	<b>10<sup>-6</sup></b>	<b>10<sup>-7</sup></b>	<b>UFC/g</b>
K 1	1	– –	31 28	2 7	3,0x10 <sup>7</sup>
	2	121 146	19 28	– –	1,3x10 <sup>7</sup>
	3	153 189	38 41	– –	4,0x10 <sup>7</sup>
K 2	1	– –	inc inc	122 120	1,2x10 <sup>9</sup>
	2	– –	inc inc	145 123	1,3x10 <sup>9</sup>
	3	– –	inc inc	131 128	1,3x10 <sup>9</sup>
K 3	1	– –	inc inc	410 510	5,0x10 <sup>9</sup>
	2	– –	inc inc	380 530	4,6x10 <sup>9</sup>
	3	– –	inc inc	97 98	9,7x10 <sup>8</sup>

Apêndice D. Contagem de Lactococos de amostras de grãos de kefir.

<b>Amostra</b>	<b>Repetição</b>	<b>10<sup>-5</sup></b>	<b>10<sup>-6</sup></b>	<b>10<sup>-7</sup></b>	<b>UFC/g</b>
K 1	1	– –	37 41	3 2	3,9x10 <sup>7</sup>
	2	190 230	1 2	1 1	2,1x10 <sup>7</sup>
	3	183 141	23 45	– –	1,6x10 <sup>7</sup>
K 2	1	– –	inc inc	60 75	7,0x10 <sup>8</sup>
	2	– –	inc inc	291 310	3,0x10 <sup>9</sup>
	3	– –	inc inc	198 217	2,0x10 <sup>9</sup>
K 3	1	– –	inc inc	300 340	3,2x10 <sup>9</sup>
	2	– –	inc inc	310 331	3,2x10 <sup>9</sup>
	3	– –	inc inc	100 96	9,8x10 <sup>8</sup>

Apêndice E. Contagem de Enterococos de amostras de grãos de kefir.

<b>Amostra</b>	<b>Repetição</b>	<b>10<sup>-3</sup></b>	<b>10<sup>-4</sup></b>	<b>10<sup>-5</sup></b>	<b>UFC/g</b>
K 1	1	70 11	0 1	0 0	9,0x10 <sup>4</sup>
	2	38 51	10 0	- -	4,4x10 <sup>4</sup>
	3	51 42	6 3	- -	4,6x10 <sup>4</sup>
K 2	1	60 50	3 5	0 0	5,5x10 <sup>4</sup>
	2	30 17	2 0	- -	2,4x10 <sup>4</sup>
	3	51 46	1 3	- -	4,8x10 <sup>4</sup>
K 3	1	150 150	11 15	0 0	1,5x10 <sup>5</sup>
	2	133 145	13 16	- -	1,4x10 <sup>5</sup>
	3	33 27	0 0	- -	3,0x10 <sup>4</sup>

Apêndice F. Contagem de Leuconostoc de amostras de grãos de kefir.

<b>Amostra</b>	<b>Repetição</b>	<b>10<sup>-5</sup></b>	<b>10<sup>-6</sup></b>	<b>10<sup>-7</sup></b>	<b>UFC/g</b>
K 1	1	inc inc	51 63	– –	5,7x10 <sup>7</sup>
	2	– –	30 41	2 3	3,6x10 <sup>7</sup>
	3	inc inc	46 41	– –	4,4x10 <sup>7</sup>
K 2	1	inc inc	41 39	– –	4,0x10 <sup>7</sup>
	2	– –	inc inc	39 45	4,2x10 <sup>8</sup>
	3	– –	inc inc	31 25	2,8x10 <sup>8</sup>
K 3	1	– –	inc inc	40 45	4,3x10 <sup>8</sup>
	2	– –	inc inc	30 46	3,8x10 <sup>8</sup>
	3	– –	220 221	65 64	6,5x10 <sup>8</sup>

Apêndice G. Contagem de Leveduras de amostras de grãos de kefir.

<b>Amostra</b>	<b>Repetição</b>	<b>10<sup>-4</sup></b>	<b>10<sup>-5</sup></b>	<b>10<sup>-6</sup></b>	<b>UFC/g</b>
K 1	1	– –	31 27	2 3	2,9x10 <sup>6</sup>
	2	215 310	18 23	– –	2,6x10 <sup>6</sup>
	3	198 213	31 19	– –	2,0x10 <sup>6</sup>
K 2	1	140 16	12 18	1 1	1,5x10 <sup>6</sup>
	2	inc inc	177 161	– –	1,7x10 <sup>7</sup>
	3	– –	151 143	17 19	1,5x10 <sup>7</sup>
K 3	1	270 278	31 36	– –	2,7x10 <sup>6</sup>
	2	282 263	21 35	– –	2,7x10 <sup>6</sup>
	3	195 198	29 30	– –	2,0x10 <sup>6</sup>

Apêndice H. Crescimento de *Staphilococcus aureos* (ATCC 6538) - Repetição 01

(A) Absorbância a 600 nm  $\Delta$  = média absorbância (tempo 8 - tempo 0)

Tempo	Controle			K 1			K 2			K 3		
	A	Média	$\Delta$	A	Média	$\Delta$	A	Média	$\Delta$	A	Média	$\Delta$
0	0,016			0,017			0,017			0,017		
	0,016			0,017			0,017			0,017		
		<b>0,016</b>			<b>0,017</b>			<b>0,017</b>			<b>0,017</b>	
8	0,299			0,128			0,108			0,260		
	0,423			0,166			0,098			0,268		
		<b>0,361</b>			<b>0,147</b>			<b>0,103</b>			<b>0,264</b>	
		<b>0,345</b>			<b>0,130</b>			<b>0,086</b>			<b>0,247</b>	

Apêndice I. Crescimento de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) - Repetição 02

(A) Absorbância a 600 nm  $\Delta$  = média absorbância (tempo 8 - tempo 0)

Tempo	Controle			K 1			K 2			K 3		
	A	Média	$\Delta$	A	Média	$\Delta$	A	Média	$\Delta$	A	Média	$\Delta$
0	0,014			0,017			0,017			0,016		
	0,016			0,017			0,017			0,018		
		<b>0,015</b>			<b>0,017</b>			<b>0,017</b>			<b>0,017</b>	
8	0,371			0,155			0,100			0,264		
	0,369			0,151			0,154			0,204		
		<b>0,370</b>			<b>0,153</b>			<b>0,127</b>			<b>0,234</b>	
		<b>0,354</b>			<b>0,136</b>			<b>0,110</b>			<b>0,217</b>	

Apêndice J. Crescimento de *Staphilococcus aureos* (ATCC 6538) - Repetição 03

(A) Absorbância a 600 nm  $\Delta$  = média absorbância (tempo 8 - tempo 0)

Tempo	Controle			K 1			K 2			K 3		
	A	Média	$\Delta$	A	Média	$\Delta$	A	Média	$\Delta$	A	Média	$\Delta$
0	0,016			0,014			0,019			0,019		
	0,015			0,018			0,015			0,018		
		<b>0,016</b>			<b>0,016</b>			<b>0,017</b>			<b>0,019</b>	
8	0,403			0,150			0,168			0,176		
	0,460			0,162			0,170			0,180		
		<b>0,432</b>			<b>0,156</b>			<b>0,169</b>			<b>0,178</b>	
		<b>0,416</b>			<b>0,139</b>			<b>0,152</b>			<b>0,161</b>	

Apêndice L. Crescimento de *Escherichia coli*(ATCC 11229) - Repetição 01

(A) Absorbância a 600 nm  $\Delta$  = média absorbância (tempo 8 - tempo 0)

Tempo	Controle			K 1			K 2			K 3		
	A	Média	$\Delta$	A	Média	$\Delta$	A	Média	$\Delta$	A	Média	$\Delta$
0	0,016			0,017			0,017			0,017		
	0,016			0,017			0,017			0,017		
		<b>0,016</b>			<b>0,017</b>			<b>0,017</b>			<b>0,017</b>	
8	0,290			0,168			0,164			0,321		
	0,379			0,182			0,164			0,321		
		<b>0,335</b>			<b>0,175</b>			<b>0,164</b>			<b>0,321</b>	
		<b>0,319</b>			<b>0,158</b>			<b>0,147</b>			<b>0,304</b>	

Apêndice M. Crescimento de *Escherichia coli*(ATCC 11229) - Repetição 02

(A) Absorbância a 600 nm  $\Delta$  = média absorbância (tempo 8 - tempo 0)

Tempo	Controle			K 1			K 2			K 3		
	A	Média	$\Delta$	A	Média	$\Delta$	A	Média	$\Delta$	A	Média	$\Delta$
0	0,014			0,017			0,017			0,016		
	0,016			0,017			0,017			0,018		
		<b>0,015</b>			<b>0,017</b>			<b>0,017</b>			<b>0,017</b>	
8	0,399			0,234			0,198			0,240		
	0,539			0,162			0,226			0,322		
		<b>0,469</b>			<b>0,198</b>			<b>0,212</b>			<b>0,281</b>	
		<b>0,453</b>			<b>0,181</b>			<b>0,195</b>			<b>0,264</b>	

Apêndice N. Crescimento de *Escherichia coli*(ATCC 11229) - Repetição 03

(A) Absorbância a 600 nm  $\Delta$  = média absorbância (tempo 8 - tempo 0)

Tempo	Controle			K 1			K 2			K 3		
	A	Média	$\Delta$	A	Média	$\Delta$	A	Média	$\Delta$	A	Média	$\Delta$
0	0,016			0,014			0,019			0,019		
	0,015			0,018			0,015			0,018		
		<b>0,016</b>			<b>0,016</b>			<b>0,017</b>			<b>0,019</b>	
8	0,493			0,148			0,164			0,304		
	0,530			0,191			0,180			0,267		
		<b>0,512</b>			<b>0,170</b>			<b>0,172</b>			<b>0,286</b>	
		<b>0,496</b>			<b>0,153</b>			<b>0,155</b>			<b>0,269</b>	

Apêndice O. Crescimento de *Salmonella typhimurium*(ATCC 6539) - Repetição 01

(A) Absorbância a 600 nm  $\Delta$  = média absorbância (tempo 8 - tempo 0)

Tempo	Controle			K 1			K 2			K 3		
	A	Média	$\Delta$	A	Média	$\Delta$	A	Média	$\Delta$	A	Média	$\Delta$
0	0,016			0,017			0,017			0,017		
	0,016			0,017			0,017			0,017		
		<b>0,016</b>			<b>0,017</b>			<b>0,017</b>			<b>0,017</b>	
8	0,350			0,100			0,095			0,260		
	0,350			0,104			0,149			0,240		
		<b>0,350</b>			<b>0,102</b>			<b>0,122</b>			<b>0,250</b>	
			<b>0,334</b>			<b>0,085</b>			<b>0,105</b>			<b>0,233</b>

Apêndice P. Crescimento de *Salmonella typhimurium*(ATCC 6539) - Repetição 02

(A) Absorbância a 600 nm  $\Delta$  = média absorbância (tempo 8 - tempo 0)

Tempo	Controle			K 1			K 2			K 3		
	A	Média	$\Delta$	A	Média	$\Delta$	A	Média	$\Delta$	A	Média	$\Delta$
0	0,014			0,017			0,017			0,016		
	0,016			0,017			0,017			0,018		
		<b>0,015</b>			<b>0,017</b>			<b>0,017</b>			<b>0,017</b>	
8	0,361			0,124			0,090			0,190		
	0,249			0,122			0,090			0,202		
		<b>0,305</b>			<b>0,123</b>			<b>0,090</b>			<b>0,196</b>	
		<b>0,289</b>			<b>0,106</b>			<b>0,073</b>			<b>0,179</b>	

Apêndice Q. Crescimento de *Salmonella typhimurium*(ATCC 6539) - Repetição 03

(A) Absorbância a 600 nm  $\Delta$  = média absorbância (tempo 8 - tempo 0)

Tempo	Controle			K 1			K 2			K 3		
	A	Média	$\Delta$	A	Média	$\Delta$	A	Média	$\Delta$	A	Média	$\Delta$
0	0,016			0,014			0,019			0,019		
	0,015			0,018			0,015			0,018		
		<b>0,016</b>			<b>0,016</b>			<b>0,017</b>			<b>0,019</b>	
8	0,301			0,138			0,099			0,106		
	0,318			0,142			0,077			0,124		
		<b>0,310</b>			<b>0,140</b>			<b>0,088</b>			<b>0,115</b>	
		<b>0,294</b>			<b>0,123</b>			<b>0,071</b>			<b>0,098</b>	

**Apêndice R. Crescimento de *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313) - Repetição 01**

**(A) Absorbância a 600 nm     $\Delta$  = média absorbância (tempo 8 - tempo 0)**

Tempo	Controle			K 1			K 2			K 3		
	A	Média	$\Delta$	A	Média	$\Delta$	A	Média	$\Delta$	A	Média	$\Delta$
0	0,016			0,017			0,017			0,017		
	0,016			0,017			0,017			0,017		
		<b>0,016</b>			<b>0,017</b>			<b>0,017</b>			<b>0,017</b>	
8	0,111			0,089			0,080			0,081		
	0,109			0,093			0,082			0,099		
		<b>0,110</b>			<b>0,091</b>			<b>0,081</b>			<b>0,090</b>	
			<b>0,094</b>				<b>0,074</b>			<b>0,064</b>		<b>0,073</b>

Apêndice S. Crescimento de *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313) - Repetição 02

(A) Absorbância a 600 nm  $\Delta$  = média absorbância (tempo 8 - tempo 0)

Tempo	Controle			K 1			K 2			K 3		
	A	Média	$\Delta$	A	Média	$\Delta$	A	Média	$\Delta$	A	Média	$\Delta$
0	0,014			0,017			0,017			0,016		
	0,016			0,017			0,017			0,018		
		<b>0,015</b>			<b>0,017</b>			<b>0,017</b>			<b>0,017</b>	
8	0,180			0,060			0,075			0,050		
	0,168			0,100			0,105			0,078		
		<b>0,174</b>			<b>0,080</b>			<b>0,090</b>			<b>0,064</b>	
		<b>0,158</b>			<b>0,063</b>			<b>0,073</b>			<b>0,047</b>	

Apêndice T. Crescimento de *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313) - Repetição 03

(A) Absorbância a 600 nm  $\Delta$  = média absorbância (tempo 8 - tempo 0)

Tempo	Controle			K 1			K 2			K 3		
	A	Média	$\Delta$	A	Média	$\Delta$	A	Média	$\Delta$	A	Média	$\Delta$
0	0,016			0,014			0,019			0,019		
	0,015			0,018			0,015			0,018		
		<b>0,016</b>			<b>0,016</b>			<b>0,017</b>			<b>0,019</b>	
8	0,185			0,108			0,078			0,060		
	0,174			0,112			0,086			0,072		
		<b>0,180</b>			<b>0,110</b>			<b>0,082</b>			<b>0,066</b>	
		<b>0,164</b>			<b>0,093</b>			<b>0,065</b>			<b>0,049</b>	

Apêndice U. Crescimento de *Bacillus cereus*(RIBO 1222-173-S4) - Repetição 01

(A) Absorbância a 600 nm  $\Delta$  = média absorbância (tempo 8 - tempo 0)

Tempo	Controle			K 1			K 2			K 3		
	A	Média	$\Delta$	A	Média	$\Delta$	A	Média	$\Delta$	A	Média	$\Delta$
0	0,016			0,017			0,017			0,017		
	0,016			0,017			0,017			0,017		
		<b>0,016</b>			<b>0,017</b>			<b>0,017</b>			<b>0,017</b>	
8	0,470			0,150			0,090			0,180		
	0,470			0,174			0,096			0,184		
		<b>0,470</b>			<b>0,162</b>			<b>0,093</b>			<b>0,182</b>	
		<b>0,454</b>			<b>0,145</b>			<b>0,076</b>			<b>0,165</b>	

Apêndice V. Crescimento de *Bacillus cereus*(RIBO 1222-173-S4) - Repetição 02

(A) Absorbância a 600 nm  $\Delta$  = média absorbância (tempo 8 - tempo 0)

Tempo	Controle			K 1			K 2			K 3		
	A	Média	$\Delta$	A	Média	$\Delta$	A	Média	$\Delta$	A	Média	$\Delta$
0	0,014			0,017			0,017			0,016		
	0,016			0,017			0,017			0,018		
		<b>0,015</b>			<b>0,017</b>			<b>0,017</b>			<b>0,017</b>	
8	0,610			0,171			0,094			0,191		
	0,526			0,165			0,068			0,157		
		<b>0,568</b>			<b>0,168</b>			<b>0,081</b>			<b>0,174</b>	
		<b>0,552</b>			<b>0,151</b>			<b>0,064</b>			<b>0,157</b>	

**Apêndice X. Crescimento de *Bacillus cereus*(RIBO 1222-173-S4) - Repetição 03**

**(A) Absorbância a 600 nm     $\Delta$  = média absorbância (tempo 8 - tempo 0)**

<b>Tempo</b>	<b>Controle</b>			<b>K 1</b>			<b>K 2</b>			<b>K 3</b>		
	<b>A</b>	<b>Média</b>	<b><math>\Delta</math></b>	<b>A</b>	<b>Média</b>	<b><math>\Delta</math></b>	<b>A</b>	<b>Média</b>	<b><math>\Delta</math></b>	<b>A</b>	<b>Média</b>	<b><math>\Delta</math></b>
<b>0</b>	0,016			0,014			0,019			0,019		
	0,015			0,018			0,015			0,018		
		<b>0,016</b>			<b>0,016</b>			<b>0,017</b>			<b>0,019</b>	
<b>8</b>	0,701			0,164			0,091			0,204		
	0,734			0,180			0,101			0,168		
		<b>0,718</b>			<b>0,172</b>			<b>0,096</b>			<b>0,186</b>	
		<b>0,702</b>			<b>0,155</b>			<b>0,079</b>			<b>0,169</b>	

Apêndice Z. Inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) por amostras de kefir.

	<b>Repetição</b>	<b><math>\Delta C</math></b>	<b><math>\Delta K 1</math></b>	<b><math>\Delta</math> Inibição</b>	<b>% Inibição</b>
<b>K1</b>	1	0,345	0,130	0,215	<b>62,32</b>
	2	0,354	0,136	0,218	<b>61,58</b>
	3	0,416	0,139	0,277	<b>66,59</b>
	<b>Média</b>	<b>0,372</b>	<b>0,135</b>	<b>0,237</b>	<b>63,50</b>

	<b>Repetição</b>	<b><math>\Delta C</math></b>	<b><math>\Delta K 2</math></b>	<b><math>\Delta</math> Inibição</b>	<b>% Inibição</b>
<b>K2</b>	1	0,345	0,086	0,259	<b>75,07</b>
	2	0,354	0,110	0,244	<b>68,93</b>
	3	0,416	0,152	0,264	<b>63,46</b>
	<b>Média</b>	<b>0,372</b>	<b>0,116</b>	<b>0,256</b>	<b>69,15</b>

	<b>Repetição</b>	<b><math>\Delta C</math></b>	<b><math>\Delta K 3</math></b>	<b><math>\Delta</math> Inibição</b>	<b>% Inibição</b>
<b>K3</b>	1	0,345	0,247	0,098	<b>28,41</b>
	2	0,354	0,217	0,137	<b>38,70</b>
	3	0,416	0,161	0,255	<b>61,30</b>
	<b>Média</b>	<b>0,372</b>	<b>0,208</b>	<b>0,163</b>	<b>42,80</b>

Resultados em absorbância a 600 nm,  $\Delta$  = média absorbância (tempo 8 - tempo 0)  
 $\Delta$  Inibição =  $\Delta C - \Delta K 1$ , C = controle

Apêndice AA. Inibição do crescimento de *Escherichia coli* (ATCC 11229) por amostras de kefir.

	<b>Repetição</b>	$\Delta C$	$\Delta K 1$	$\Delta$ Inibição	% Inibição
<b>K1</b>	1	0,319	0,158	0,161	<b>50,47</b>
	2	0,453	0,181	0,272	<b>60,04</b>
	3	0,496	0,153	0,343	<b>69,15</b>
	<b>Média</b>	<b>0,423</b>	<b>0,164</b>	<b>0,259</b>	<b>59,89</b>

	<b>Repetição</b>	$\Delta C$	$\Delta K 2$	$\Delta$ Inibição	% Inibição
<b>K2</b>	1	0,319	0,147	0,172	<b>53,92</b>
	2	0,453	0,195	0,258	<b>56,95</b>
	3	0,496	0,155	0,341	<b>68,75</b>
	<b>Média</b>	<b>0,423</b>	<b>0,166</b>	<b>0,257</b>	<b>59,87</b>

	<b>Repetição</b>	$\Delta C$	$\Delta K 3$	$\Delta$ Inibição	% Inibição
<b>K3</b>	1	0,319	0,304	0,015	<b>4,70</b>
	2	0,453	0,264	0,189	<b>41,72</b>
	3	0,496	0,269	0,227	<b>45,77</b>
	<b>Média</b>	<b>0,423</b>	<b>0,279</b>	<b>0,144</b>	<b>30,73</b>

Resultados em absorbância a 600 nm,  $\Delta$  = média absorbância (tempo 8 - tempo 0)  
 $\Delta$  Inibição =  $\Delta C - \Delta K 1$ , C = controle

Apêndice AB. Inibição do crescimento de *Salmonella typhimurium* (ATCC 6539) por amostras de kefir.

	<b>Repetição</b>	<b><math>\Delta C</math></b>	<b><math>\Delta K 1</math></b>	<b><math>\Delta</math> Inibição</b>	<b>% Inibição</b>
<b>K1</b>	1	0,334	0,085	0,249	<b>74,55</b>
	2	0,289	0,106	0,183	<b>63,32</b>
	3	0,294	0,123	0,171	<b>58,16</b>
	<b>Média</b>	<b>0,306</b>	<b>0,105</b>	<b>0,201</b>	<b>65,35</b>

	<b>Repetição</b>	<b><math>\Delta C</math></b>	<b><math>\Delta K 2</math></b>	<b><math>\Delta</math> Inibição</b>	<b>% Inibição</b>
<b>K2</b>	1	0,334	0,105	0,229	<b>68,56</b>
	2	0,289	0,073	0,216	<b>74,74</b>
	3	0,294	0,071	0,223	<b>75,85</b>
	<b>Média</b>	<b>0,306</b>	<b>0,083</b>	<b>0,223</b>	<b>73,05</b>

	<b>Repetição</b>	<b><math>\Delta C</math></b>	<b><math>\Delta K 3</math></b>	<b><math>\Delta</math> Inibição</b>	<b>% Inibição</b>
<b>K3</b>	1	0,334	0,233	0,101	<b>30,24</b>
	2	0,289	0,179	0,110	<b>38,06</b>
	3	0,294	0,098	0,196	<b>66,67</b>
	<b>Média</b>	<b>0,306</b>	<b>0,170</b>	<b>0,136</b>	<b>44,99</b>

Resultados em absorbância a 600 nm,  $\Delta$  = média absorbância (tempo 8 - tempo 0)  
 $\Delta$  Inibição =  $\Delta C - \Delta K 1$ , C = controle

Apêndice AC. Inibição do crescimento de *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313) por amostras de kefir.

	<b>Repetição</b>	<b><math>\Delta C</math></b>	<b><math>\Delta K 1</math></b>	<b><math>\Delta</math> Inibição</b>	<b>% Inibição</b>
<b>K1</b>	1	0,094	0,074	0,020	<b>21,28</b>
	2	0,158	0,063	0,095	<b>60,13</b>
	3	0,163	0,093	0,070	<b>42,94</b>
	<b>Média</b>	<b>0,138</b>	<b>0,077</b>	<b>0,062</b>	<b>41,45</b>

	<b>Repetição</b>	<b><math>\Delta C</math></b>	<b><math>\Delta K 2</math></b>	<b><math>\Delta</math> Inibição</b>	<b>% Inibição</b>
<b>K2</b>	1	0,094	0,064	0,030	<b>31,91</b>
	2	0,158	0,073	0,085	<b>53,80</b>
	3	0,163	0,065	0,098	<b>60,12</b>
	<b>Média</b>	<b>0,138</b>	<b>0,067</b>	<b>0,071</b>	<b>48,61</b>

	<b>Repetição</b>	<b><math>\Delta C</math></b>	<b><math>\Delta K 3</math></b>	<b><math>\Delta</math> Inibição</b>	<b>% Inibição</b>
<b>K3</b>	1	0,094	0,073	0,021	<b>22,34</b>
	2	0,158	0,047	0,111	<b>70,25</b>
	3	0,163	0,049	0,114	<b>69,94</b>
	<b>Média</b>	<b>0,138</b>	<b>0,056</b>	<b>0,082</b>	<b>54,18</b>

Resultados em absorbância a 600 nm,  $\Delta$  = média absorbância (tempo 8 - tempo 0)  
 $\Delta$  Inibição =  $\Delta C - \Delta K 1$ , C = controle

Apêndice AD. Inibição do crescimento de *Bacillus cereus* (RIBO 1222-173-S4) por amostras de kefir.

	<b>Repetição</b>	$\Delta C$	$\Delta K 1$	$\Delta$ Inibição	% Inibição
<b>K1</b>	1	0,454	0,145	0,309	<b>68,06</b>
	2	0,552	0,151	0,401	<b>72,64</b>
	3	0,702	0,155	0,547	<b>77,92</b>
	<b>Média</b>	<b>0,569</b>	<b>0,150</b>	<b>0,419</b>	<b>72,88</b>

	<b>Repetição</b>	$\Delta C$	$\Delta K 2$	$\Delta$ Inibição	% Inibição
<b>K2</b>	1	0,454	0,076	0,378	<b>83,26</b>
	2	0,552	0,064	0,488	<b>88,41</b>
	3	0,702	0,079	0,623	<b>88,75</b>
	<b>Média</b>	<b>0,569</b>	<b>0,073</b>	<b>0,496</b>	<b>86,80</b>

	<b>Repetição</b>	$\Delta C$	$\Delta K 3$	$\Delta$ Inibição	% Inibição
<b>K3</b>	1	0,454	0,165	0,289	<b>63,66</b>
	2	0,552	0,157	0,395	<b>71,56</b>
	3	0,702	0,169	0,533	<b>75,93</b>
	<b>Média</b>	<b>0,569</b>	<b>0,164</b>	<b>0,406</b>	<b>70,38</b>

Resultados em absorbância a 600 nm,  $\Delta$  = média absorbância (tempo 8 - tempo 0)  
 $\Delta$  Inibição =  $\Delta C - \Delta K 1$ , C = controle