

SILVIA TORRES TEIXEIRA

## **OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DO QUEFIR DE ÁGUA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2018

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

T266o  
2018  
Teixeira, Silvia Torres, 1970-  
Otimização da produção do quefir de água / Silvia Torres  
Teixeira. – Vicoso, MG, 2018.  
xv, 78 f. : il. ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Teixeira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 68-75.

1. Kefir de água. 2. Bioquímica. 3. Carboidratos. 4. Ácido acético. 5. Leveduras. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada. II. Título.

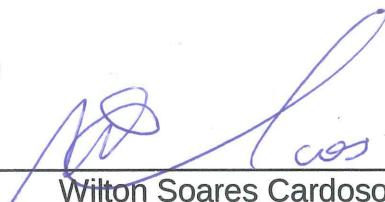
CDD 22. ed. 572.49

SILVIA TORRES TEIXEIRA

## OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DO QUEFIR DE ÁGUA

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 28 de fevereiro de 2018.



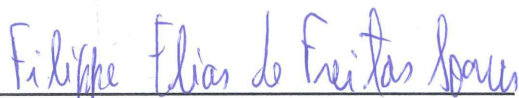
---

Wilton Soares Cardoso



---

Vânia Mayumi Nakajima



---

Filipe Elias de Freitas Soares  
(Coorientador)



---

Ana Íris Mendes Coelho  
(Coorientadora)



---

José Humberto de Queiroz  
(Orientador)

A Deus...  
Aos meus pais...  
... que são o esteio da minha vida.  
Aos meus irmãos...  
Aos meus amigos...  
... por tudo que representam em minha vida.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu pai, por me ajudar a começar de novo e por me ensinar o valor da persistência; o exemplo de um grande profissional na minha vida.

À minha mãe, que me deu amor, coragem e suporte para seguir em frente nesta nova fase, e por ser o exemplo de fé.

À professora Ana Vlândia Bandeira Moreira, por me acolher e abrir as primeiras portas dessa nova fase da minha vida profissional e me ajudar a encontrar o meu lugar dentro da área da pesquisa.

Ao professor José Humberto de Queiroz, por abrir as portas do seu laboratório e me conceder a oportunidade de aperfeiçoar o meu conhecimento com experiências valiosíssimas.

À professora Ana Íris Mendes Coelho, por disponibilizar o seu laboratório para a realização de parte desse estudo e sempre atender às minhas dúvidas com profissionalismo e dedicação. Sua sensibilidade a torna um exemplo do profissional da educação para mim.

Ao professor Lukasz Marcin Grzeskowiak, pelo profissionalismo e dedicação em me apoiar no desenvolvimento do meu projeto. Sua sensibilidade o torna um exemplo do profissional da educação para mim.

Ao professor Filipe Elias de Freitas Soares, pelo apoio integral e fundamental no desenvolvimento desse trabalho.

À professora Vânia Mayumi Nakajima, pela enorme competência em me ajudar a finalizar este trabalho e pelo apoio emocional tão necessário nesta reta final. Sua sensibilidade a torna um exemplo do profissional da educação para mim.

À querida colega Isadora Ferreira da Silva, pela valiosa contribuição dada ao longo deste trabalho.

Aos queridos colegas do laboratório, Angélica, Carlos, Gabriela, Isadora, Marcos, Natália, pelo apoio e amizade que carregarei para sempre na minha história.

Às queridas técnicas Larissa e Renata, por me apoiarem com profissionalismo e dedicação em seus laboratórios e pela amizade que ficará para sempre em minha história.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, em especial ao Eduardo, Marco Aurélio e Priscila pelo profissionalismo e dedicação que foram fundamentais para concluir este trabalho.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de doutorado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, pela oportunidade concedida.

À Universidade Federal de Viçosa, que carrego com carinho no meu coração por fazer parte de toda a minha vida, especialmente neste recomeço.

“Have no fear of perfection. You’ll never reach it.”

*Salvador Dali*

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Níveis da variável <i>fonte de carboidrato</i> analisada no teste preliminar	<b>P. 14</b>
<b>Tabela 2</b>	Níveis das variáveis analisadas em cada uma das etapas de delineamento	<b>P. 16</b>
<b>Tabela 3</b>	Médias das concentrações de carboidratos residuais (sacarose, glicose e frutose), pH final em função do tempo de fermentação do quefir de água.	<b>P. 19</b>
<b>Tabela 4</b>	Médias dos conteúdos de proteína e de cinzas em cada fonte de carboidrato estudada	<b>P. 24</b>
<b>Tabela 5</b>	Consumo de glicose e frutose na bebida do quefir de água fermentada em 24, 48 e 72 horas.	<b>P. 26</b>
<b>Tabela 6</b>	Análise dos fatores estudados no planejamento estatístico Plackett-Burman sobre a concentração de etanol	<b>P. 30</b>
<b>Tabela 7</b>	Análise dos fatores estudados no planejamento estatístico Plackett-Burman sobre a concentração de ácido acético	<b>P. 31</b>
<b>Tabela 8</b>	Análise dos fatores estudados no planejamento estatístico Plackett-Burman sobre a concentração de sacarose	<b>P. 31</b>
<b>Tabela 9</b>	Análise dos fatores estudados no planejamento estatístico Plackett-Burman sobre a concentração de glicose	<b>P. 32</b>
<b>Tabela 10</b>	Análise dos fatores estudados no planejamento estatístico Plackett-Burman sobre a concentração de frutose	<b>P. 32</b>

- Tabela 11** Análise dos fatores estudados no planejamento estatístico Plackett-Burman sobre o teor de carboidratos totais nas amostras **P. 33**
- Tabela 12** Segundo delineamento (Ajustado) com 13 corridas usadas para traçar as superfícies de resposta com a aplicação de duas variáveis (temperatura e pH inicial), cada uma com cinco níveis, e seus respectivos valores de etanol, ácido acético, carboidratos residuais (sacarose, glicose e frutose) e contagem de células viáveis de leveduras. **P. 34**
- Tabela 13** Análise de variância para a equação-resposta desenvolvida a partir das concentrações de etanol, ácido acético e carboidratos residuais (sacarose, glicose e frutose) no meio. **P. 35**
- Tabela 14** Análise dos fatores estudados no planejamento estatístico Plackett-Burman sobre a concentração de glicose **P. 41**
- Tabela 15** Análise dos fatores estudados no planejamento estatístico Plackett-Burman sobre a concentração de etanol **P. 41**
- Tabela 16** Análise dos fatores estudados no planejamento estatístico Plackett-Burman sobre a concentração de ácido acético **P. 42**
- Tabela 17** Terceiro delineamento (28 a 38°C) com 20 condições de fermentação usadas para traçar as superfícies de resposta com a aplicação de três variáveis (açúcar mascavo, tempo e pH inicial), cada uma com cinco níveis, e seus respectivos valores de etanol, ácido acético, glicose, frutose e contagem de células viáveis de leveduras. **P. 43**

- Tabela 18** Análise de variância para as equações-respostas desenvolvida a partir das concentrações de etanol, ácido acético, glicose e frutose no meio. **P. 44**
- Tabela 19** Quarto delineamento (Estreitado) com 20 condições de fermentação usadas para traçar as superfícies de resposta com a aplicação de três variáveis (açúcar mascavo, tempo e pH inicial), cada uma com cinco níveis, e seus respectivos valores de etanol, ácido acético, glicose, frutose e contagem de células viáveis de leveduras. **P. 57**
- Tabela 20** Análise de variância para as equações-respostas desenvolvidas a partir das concentrações de etanol, ácido acético, glicose e frutose no meio. **P. 58**
- Tabela 21** Micro-organismos isolados dos grãos do quefir de água e leite **P. 76**

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Os grãos do quefir de água utilizados para a realização deste estudo de otimização (A) comparados com aqueles obtidos de uma fermentação caseira de referência (B) **P. 20**
- Figura 2** Concentrações de ácido acético (A) e etanol (B) no meio fermentado com quatro fontes de carboidrato diferentes **P. 22**
- Figura 3** Superfícies de resposta da produção de etanol (A) e ácido acético (B) no processo de fermentação do quefir de água em função da temperatura e do tempo **P. 37**
- Figura 4** Superfícies de resposta da concentração de sacarose (A), glicose (B) e frutose (C) durante o processo de fermentação do quefir de água em função do pH inicial e temperatura. **P. 38**
- Figura 5** Superfícies de resposta da produção de etanol durante o processo de fermentação do quefir de água. (A) pH inicial vs açúcar mascavo. (B) pH inicial vs tempo. (C) açúcar mascavo vs tempo. **P. 46**
- Figura 6** Superfícies de resposta da produção de ácido acético durante o processo de fermentação do quefir de água. (A) açúcar mascavo vs pH inicial. (B) tempo vs pH inicial. (C) açúcar mascavo vs tempo. **P. 47**
- Figura 7** Superfícies de resposta da concentração de glicose durante o processo de fermentação do quefir de água. (A) pH inicial vs açúcar mascavo. (B) pH inicial vs tempo. (C) açúcar mascavo vs tempo. **P. 48**

- Figura 8** Superfícies de resposta da concentração de frutose durante o processo de fermentação do quefir de água. **P. 49**  
(A) açúcar mascavo vs pH inicial. (B) pH inicial vs tempo.  
(C) açúcar mascavo vs tempo.
- Figura 9** Superfícies de resposta da produção de etanol no processo de fermentação do quefir de água. **P. 61**  
(A) pH inicial vs açúcar mascavo. (B) tempo vs pH inicial. (C) açúcar mascavo vs tempo.
- Figura 10** Superfícies de resposta da produção de ácido acético no processo de fermentação do quefir de água. **P. 62**  
(A) açúcar mascavo vs pH inicial. (B) pH inicial vs tempo. (C) açúcar mascavo vs tempo.
- Figura 11** Superfícies de resposta da concentração de glicose durante o processo de fermentação do quefir de água. **P. 63**  
(A) açúcar mascavo vs pH inicial. (B) tempo vs pH inicial.  
(C) tempo vs açúcar mascavo.
- Figura 12** Superfícies de resposta da concentração de frutose durante o processo de fermentação do quefir de água. **P. 64**  
(A) açúcar mascavo vs pH inicial. (B) tempo vs pH inicial.  
(C) tempo vs açúcar mascavo.

## RESUMO

TEIXEIRA, Sílvia Torres, Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2018. **Otimização da Produção do Quefir de Água.** Orientador: José Humberto de Queiroz. Coorientadores: Ana Íris Mendes Coelho, Filipe Elias de Freitas Soares e Lukasz Marcin Grzeskowiak.

Dados sugerem que a bebida do quefir de água com menor acidez e concentração de etanol recebe a preferência dos consumidores. No entanto, informações referentes à otimização das características físico-químicas da bebida permanecem escassas. Por esta razão, nós testamos a influência de seis variáveis independentes sobre o processo de fermentação do quefir de água para identificar aquelas que influenciam significativamente as concentrações de etanol, ácido acético e carboidratos residuais na bebida. Nós também analisamos a variação das células viáveis de leveduras sob as diferentes condições de fermentação com o intuito de aumentar o potencial probiótico da bebida, já que essas espécies têm a habilidade de resistir o pH ácido e os sais biliares do trato gastrointestinal. As condições de fermentação foram estabelecidas de acordo com o planejamento Plackett-Burman e Superfície de Resposta. As análises físico-químicas foram realizadas segundo a metodologia da AOAC 2002 e por CLAE. A concentração do açúcar mascavo, a temperatura, o tempo de fermentação e o pH inicial foram as variáveis que influenciaram significativamente os parâmetros estudados. Os resultados indicaram uma condição de fermentação que leva à obtenção de uma nova bebida do quefir de água com um menor conteúdo de ácido acético, possibilitando a sua maior aceitação sensorial. A mesma condição também resulta em um menor conteúdo de carboidratos residuais, tornando a bebida mais adequada para indivíduos com dieta de restrição calórica. A contagem de células viáveis de leveduras foi maior com esta técnica de produção em relação à tradicional, o que aumenta o potencial probiótico da bebida. Este estudo é o primeiro a analisar as variações físico-químicas e microbiológicas da bebida do quefir de água produzida sob diferentes condições de fermentação. Os resultados encontrados possibilitaram o desenvolvimento de uma patente (BR 10 2018 003540 1) que descreve a nova técnica de produção e a nova bebida do quefir de água com menor valor calórico, maior potencial probiótico e

maior possibilidade de aceitação pelo consumidor. Estudos adicionais são necessários para confirmar essas vantagens.

## ABSTRACT

TEIXEIRA, Silvia Torres, Universidade Federal de Viçosa, February, 2018. **Optimization of Water Kefir Production.** Advisor: José Humberto de Queiroz. Co-Advisors: Ana Íris Mendes Coelho, Filippe Elias de Freitas Soares and Lukasz Marcin Grzeskowiak.

Data suggest that consumers prefer water kefir beverages with the least acidity and ethanol concentration. However, information regarding the beverage's physicochemical optimization is scarce. Thus, we tested the influence of six independent variables to identify those that significantly influence ethanol, acetic acid and residual carbohydrate concentrations in the beverage. We also evaluated viable yeast cell variation under different fermentation conditions to increase the beverage's probiotic potential, once these species can resist gastrointestinal low pH and bile. The fermentation conditions were established according to Plackett-Burmann designs and Response Surface methodology. Physicochemical analyses were carried out according to AOAC 2002 methodology and by HPLC. Muscovado sugar concentration, temperature, fermentation period and initial pH value were the variables that significantly influenced the studied parameters. Our results indicated one fermentation condition that leads to the production of a new water kefir beverage with lower acetic acid content, enabling better sensory acceptability. The same conditions also led to a lower residual carbohydrate content, which makes the beverage more suitable for individuals under caloric restriction diet. The viable yeast cell counting was higher compared to the traditional preparation technique, what can enhance the beverage's probiotic potential. This is the first study to analyze the physicochemical and microbiological variations of water kefir beverage produced under different fermentation conditions. These findings enabled us to file a patent application (BR 10 2018 003540 1) on the new production technique and on the new water kefir beverage with less acetic acid and residual carbohydrate concentrations and higher viable yeast counting. Further studies are necessary to support these advantages.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVOS .....	4
2.1. Objetivo geral .....	4
2.2. Objetivos Específicos .....	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	5
3.1. Quefir de água .....	5
3.2. Composição da microbiota do quefir de água .....	6
3.3. Atividade fermentativa da microbiota do quefir de água .....	7
3.4. Características físico-químicas da bebida do quefir de água .....	9
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
4.1. Grãos do quefir e manutenção da cultura .....	12
4.2. Análises físico-químicas.....	12
4.3. Contagem de leveduras .....	13
4.4. Estudos de otimização .....	14
4.4.1. Teste preliminar .....	14
4.4.2. Placket-Burman .....	14
4.5. Análise estatística .....	17
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
5.1. Estudo Preliminar.....	18
5.2. Delineamentos Fatoriais .....	29
5.2.1. Primeiro Delineamento .....	29
5.2.2. Segundo Delineamento: Ajustado.....	29
5.2.3. Terceiro Experimento.....	40
5.2.4. Quarto Experimento: Estreito.....	55

6. CONCLUSÃO.....	66
7. REFERÊNCIAS.....	68
8. ANEXO.....	76

## 1. INTRODUÇÃO

O surgimento de uma nova fronteira na ciência da nutrição vem expandindo os conceitos antigos do mundo ocidental sobre o uso dos alimentos além da ideia de sobrevivência, satisfação da fome e prevenção de efeitos adversos. A ênfase é em direção à promoção do bem-estar, de um melhor estado de saúde e da redução dos riscos de doenças. Um forte crescimento está ocorrendo em muitas categorias de alimentos com alegação de propriedade funcional e algumas das áreas mais dinâmicas incluem os iogurtes probióticos e sucos (Granato et al., 2010). Produtos probióticos lácteos são mais populares nos países desenvolvidos do ocidente e, por isto, mais de 78% das vendas atuais de probióticos no mundo são feitas sob a forma de iogurtes (Kandyliis et al., 2016). Todavia, a crescente preocupação com a intolerância à lactose e alergias à proteína do leite, bem como o elevado conteúdo de colesterol e ácidos graxos saturados contidos nos alimentos lácteos está causando uma permuta no mercado em direção aos alimentos não lácteos (Kumar et al., 2015). Este movimento combinado com a crescente tendência ao vegetarianismo, bem como o uso limitado de produtos lácteos na dieta de diversos países, especialmente na Ásia e na África, tem tornado o desenvolvimento de produtos probióticos não lácteos uma necessidade (Kandyliis et al., 2016).

O desenvolvimento de novos produtos probióticos não lácteos tem sido considerado cada vez mais desafiador, uma vez que precisa responder às expectativas do consumidor por produtos que são simultaneamente saborosos e saudáveis (Shah, 2007 apud Granato et al., 2010). De acordo com Jousse (2008, apud Granato et al., 2010), a criação de novos produtos alimentícios se resume essencialmente em um problema de otimização para gerar a melhor formulação.

O quefir de água é uma bebida não láctea fermentada com alegação de diversos benefícios à saúde advindos do seu conteúdo probiótico (Schneedorf et al., 2012). Contudo, seu potencial funcional ainda não foi cientificamente fundamentado (Waldherr et al., 2010). Seu consumo está crescendo lentamente por ser uma alternativa similar ao quefir de leite, um fermentado lácteo amplamente conhecido como excelente fonte de probióticos com propriedades benéficas à saúde (Fiorda et al., 2017).

Embora as bactérias lácticas e as bifidobactérias sejam os Micro-organismos mais amplamente estudados em busca de propriedades probióticas (Diosma et al., 2013), a aplicação de leveduras como suplemento probiótico está ganhando relevância (Fleet e Balia, 2006). A habilidade das leveduras de aglutinar patógenos e resistir ao pH ácido e aos sais biliares do trato gastrointestinal estão entre os critérios mais relevantes para a pré-seleção de probióticos (Diosma et al., 2013). Além da *Saccharomyces boulardii*, é provável que existam outras cepas de *Saccharomyces* de origem ambiental ou agroindustrial com propriedades funcionais (Cassanego et al., 2015). Dentre os gêneros de leveduras mais comumente utilizados para o consumo animal e humano estão a *Saccharomyces*, a *Candida* e a *Kluyveromyces*, gêneros comumente presentes nos grãos do quefir de água (Diosma et al., 2013). Assim sendo, o quefir de água é uma fonte promissora de novas cepas de leveduras para o desenvolvimento de uma nova bebida probiótica não láctea (Diosma et al., 2013; Cassanego et al., 2015).

O quefir de água é mais consumido no México e no Brasil em escala caseira (Magalhães et al., 2010), mas já começou a ser produzido por pequenas empresas no mercado americano, a maioria das quais é vendida em lojas de produtos para a saúde (Marsh et al., 2014). Todavia, o quefir de água ainda tem a sua produção industrial limitada devido ao seu processo de fermentação instável, que resulta em bebidas com qualidades organolépticas variáveis que frustra as expectativas dos consumidores contemporâneos (Laureys et al., 2017). O baixo crescimento dos seus grãos também é outra razão da limitada fabricação da bebida, um obstáculo que prejudica o seu reaproveitamento (*backslopping*) em sucessivos lotes da bebida (Laureys et al., 2017).

Ainda em 1989, Pidoux et al. (1989) sugeriram a aplicação dos grãos do quefir de água na fabricação de bebidas fermentadas com qualidades sensoriais melhoradas (Pidoux et al., 1989). Atualmente, outros substratos não lácteos além do açúcar mascavo têm sido testados em laboratório, como mel, frutas e legumes, para a criação de fermentados diferenciados (Randazzo et al., 2016; Corona et al., 2016; Fiorda et al., 2016a, 2016b). No entanto, os dados referentes à otimização da bebida são escassos em comparação com o quefir de leite (Laureys e Vuyst, 2014; Fiorda et al., 2017). Ainda são necessárias pesquisas adicionais sobre as propriedades

microbiológicas, funcionais e tecnológicas do quefir de água para a produção de novos produtos probióticos (Fiorda et al., 2017).

Nós avaliamos as variáveis independentes que influenciam a produção de etanol, ácido acético e carboidratos residuais na bebida do quefir de água para aumentar a sua aceitação e disponibilizar a bebida no nicho de alimentos com restrição calórica. Nós também analisamos a variação das células viáveis de leveduras sob as diferentes condições de fermentação, já que o aumento dessas espécies com habilidade de resistir ao pH ácido e aos sais biliares do trato gastrointestinal pode aumentar o potencial probiótico da bebida (Garcia-Hernandes et al., 2012).

## **2. OBJETIVOS**

### *2.1. Objetivo geral*

Identificar as variáveis que influenciam a fermentação do quefir de água e que modificam as características físico-químicas da bebida

### *2.2. Objetivos Específicos*

- Selecionar o tipo de carboidrato que leva à redução das concentrações de etanol, ácido acético e carboidratos residuais na bebida
- Identificar as variáveis que influenciam as concentrações de etanol, ácido acético e carboidratos residuais na bebida
- Analisar a variação do crescimento das leveduras na bebida de acordo com a variação das condições de fermentação
- Estabelecer os níveis ótimos de produção de uma nova bebida do quefir de água com menores concentrações de etanol, ácido acético e carboidratos residuais, bem como maior contagem de células viáveis de leveduras

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Quefir de água

O termo *quefir* é mais conhecido para designar um leite fermentado com cultivos ácido-láticos elaborados com grãos de quefir, *Lactobacillus kefir*, espécies dos gêneros *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Acetobacter* com produção de ácido láctico, etanol e dióxido de carbono (Instrução Normativa nº 46 de 23/10/2007). Contudo, existe outro tipo de quefir menos popular que produz uma bebida fermentada sem lactose e que tem recebido atenção crescente dos cientistas nos últimos anos (Paiva et al., 2016). Conhecido por quefir de água, este quefir é muito similar ao de leite em termos de estrutura física, microbiológica e dos produtos finais formados durante a fermentação (Fiorda et al., 2017). Semelhantemente ao quefir de leite, os grãos do quefir de água consistem de um complexo conglomerado de bactérias e leveduras incorporadas em uma matriz de exopolissacarídeo, chamada dextrana (Garrote et al., 2001). As espécies isoladas de ambos os quefires são mostradas no anexo.

A origem dos grãos do quefir de água é incerta. Segundo Beijerinck (1889 apud Pidoux, 1989), soldados britânicos trouxeram para a Inglaterra grãos de morfologia semelhante, denominados “*gingerbeer plant*”, da guerra da Criméia em 1885. No entanto, outros autores relatam que os grãos também são conhecidos por “*California bees*” (Kleber, 1921 apud Pidoux, 1989) e “tibi” ou “complexo tibi” que supostamente derivaram das folhas da *Opuntia* mexicana (Lutz, 1899 apud Pidoux, 1989; Daker et al., 1938; Moinas et al., 1980). Por estas razões, a ideia de múltiplas origens para o quefir de água é plausível (Leroi e Pidoux, 1993; Fiorda et al., 2017).

A bebida fermentada pelo quefir de água é tradicionalmente preparada pela imersão dos seus grãos em um meio contendo açúcar mascavo não orgânico que é fermentado à temperatura ambiente por um tempo que varia entre 12 horas a quatro dias (Reib et al., 1990; Gulitz et al., 2011; Marsh et al., 2013; Laureys e Vuyst, 2014; Laureys et al., 2017). O meio de cultura é suplementado com frutas secas ou frescas, preferencialmente figos, que provêm minerais adicionais e sabor (Reib et al., 1990; Marsh et al., 2013; Laureys et al., 2017). Ao completar o tempo de fermentação, os grãos são separados da bebida com o auxílio de uma peneira e reintroduzidos em um novo meio contendo açúcar mascavo (Laureys et al., 2017). A

bebida resultante é ácida e alcoólica, levemente gaseificada e com aspecto ligeiramente turvo (Reib et al., 1990; Stadie et al., 2013; Puerari et al., 2012; Schneedorf et al., 2012; Marsh et al., 2013; Laureys e Vuyst, 2014, 2014b).

Acredita-se que o quefir de água forneça as vantagens probióticas dos Micro-organismos presentes nos seus grãos, já que algumas bactérias e leveduras que podem compor o seu consórcio são reconhecidas como probióticas (Marsh et al., 2013; Alsayadi et al., 2013; Randazzo et al., 2016). O quefir de água também possui o potencial para fornecer as vantagens das moléculas bioativas (polipeptídios, polissacarídeos, ácidos orgânicos e outros compostos) produzidas por esses Micro-organismos, que são capazes de auxiliar na manutenção da saúde (Alsayadi et al., 2013; Stadie et al., 2013; Fiorda et al., 2017).

### 3.2. Composição da microbiota do quefir de água

Estudos utilizando técnicas moleculares (eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE), análise de restrição do DNA ribossomal amplificado, metagenômica) têm mostrado que os Micro-organismos predominantes nos grãos do quefir de água são lactobacilos ( $10^8$  UFC/g), leveduras ( $10^6$  a  $10^7$  UFC/g) (Magalhães et al., 2010; Waldherr et al., 2010; Miguel et al., 2011; Gulitz et al., 2013; Marsh et al., 2013; Stadie et al., 2013; Laureys et al., 2016; Fiorda et al., 2017) e bactérias acéticas que normalmente variam de quantidades negligenciáveis (Franzetti et al., 1998) até quantidades maiores do que  $10^8$  UFC/g (Gulitz et al., 2011). Recentemente, duas espécies de bifidobactérias (*Bifidobacterium psychraerophilum* e *B. crudilactis*) foram encontradas em amostras do quefir de água da Bélgica (Later et al., 2016) e da Alemanha (Gulitz et al., 2013). Nesta última, o número de células viáveis da família *Bifidobacteriaceae* nos grãos foi de  $10^5$  a  $10^6$  UFC/g (GULITZ et al., 2013).

Embora tenha sido evidenciada uma elevada variabilidade no perfil microbiano dos grãos do quefir de diferentes países, cepas comuns prevalecem, as mais prováveis sendo do gênero *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Kluyveromyces* e *Acetobacter* (Schneedorf et al., 2012; Fiorda et al., 2017). Outros gêneros comumente encontrados incluem *Streptococcus*, *Saccharomyces*,

*Zygosaccharomyces*, *Candida* e *Kloeckera* (Rubio et al., 1993; Magalhães et al., 2010).

Outro estudo que isolou e identificou Micro-organismos dos grãos de diversas amostras do quefir de água adquiridos de oito regiões diferentes do Brasil encontrou predominância das seguintes espécies de bactérias: *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus sunkii*, *Lactobacillus helveticus*, *Gluconobacter liquefaciens*, *A. lovaniensis* e *Bacillus cereus* (Miguel et al., 2011). Dentre as leveduras, as espécies predominantes foram *S. cerevisiae*, *Zygosaccharomyces fermentati*, *Yarrowia lipolytica*, *Candida valdiviana*, *Pichia cecembensis*, *Pichia fermentans*, *Pichia caribbica*, *Pichia membranifaciens* e *Kazachstania aerobia*. Os resultados deste estudo apontaram que os grãos advindos dos diferentes estados brasileiros apresentaram um perfil de DGGE similar, sugerindo a presença de um consórcio microbiano robusto (Miguel et al., 2011).

Magalhães *et al* (2010) também caracterizaram os Micro-organismos da bebida de uma amostra de quefir de água obtido em Lavras, MG, pela técnica do PCR-DGGE. Após 24 horas de fermentação, os seguintes gêneros de bactérias foram encontrados: *Lactobacillus* ( $10^8$  UFC/g), *Lactococcus* ( $10^8$  UFC/g), *Leuconostoc* ( $10^8$  UFC/g) e *Acetobacter* ( $10^8$  UFC/g). Dentre as leveduras ( $10^7$  UFC/g), os gêneros encontrados foram *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Lachancea* e *Kazachstania*. As espécies bacterianas encontradas na bebida foram *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus parabuchneri*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc citreum* e *Acetobacter lovaniensis*. Já as espécies de leveduras foram *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) e *Kluyveromyces lactis*.

### 3.3. Atividade fermentativa da microbiota do quefir de água

O quefir de água é uma bebida resultante da fermentação de um meio de cultura composto somente por açúcar mascavo, um ambiente que pode ser considerado difícil para a associação microbiana do quefir por conter elevado conteúdo de sacarose e baixos níveis de aminoácidos, vitaminas e fatores de crescimento. A habilidade do consórcio do quefir de água fermentar um meio pobre

em nutrientes por vários anos sem modificar o balanço dos diferentes Micro-organismos ainda não está bem explicada (Leroi e Pidoux, 1993). Wood e Hodge (1985) acreditam que os exopolissacarídeos que incorporam os Micro-organismos sejam um fator importante na preservação do nicho ecológico da microbiota. Todavia, a estabilidade da população microbiana também tem sido atribuída à simbiose entre as bactérias lácticas e as leveduras dos grãos (Ward et al., 1892 apud Leroi e Pidoux, 1993). Sabe-se que, quando as bactérias lácticas são isoladas dos grãos do quefir de água, elas são incapazes de crescer sozinhas em um meio simples de açúcar. Entretanto, um estudo mostrou que lactobacilos e leveduras isolados dos mesmos grãos e co-cultivados no próprio meio do quefir de água apresentaram maior crescimento celular (Stadie et al., 2013). Todavia, é difícil delinear um panorama exato de interações passíveis de ocorrerem na associação devido à variedade de Micro-organismos envolvidos nos diferentes grãos (Vuyst et al., 2005; Farnworth, 2005; Gulitz et al., 2011). Acredita-se que as leveduras exerçam um papel fundamental no consórcio do quefir de água por serem capazes de converter sacarose em glicose e frutose por meio da enzima invertase, disponibilizando esses açúcares redutores como metabólitos livres para os outros Micro-organismos (Ikram-UI-Haq et al., 2007). Além disto, as leveduras também provêm vitaminas, aminoácidos e fatores de crescimento (Feuillat et al., 1977).

Nas primeiras horas de fermentação, o alto conteúdo de sacarose pode estimular o crescimento das espécies de leveduras com alta capacidade fermentativa, tais como *Hanseniaspora*, *Pichia* e *Lachancea* (Fiorda et al., 2017), semelhantemente ao que sucede no primeiro estágio de fermentação do vinagre, antes das *Saccharomyces* dominarem (Morrissey et al., 2004). Desta forma, apesar das bactérias lácticas predominarem em maior número nos grãos, é a atividade metabólica das leveduras que prevalece no processo fermentativo do quefir de água (Laureys e Vuyst, 2014).

Por outro lado, Leroi e Pidoux (1993a) mostraram que pode haver uma relação entre o CO<sub>2</sub> liberado pelas leveduras e o estímulo das bactérias lácticas, já que foi comprovado que baixas concentrações de CO<sub>2</sub> estimulam estas últimas (Stamer, 1979). Nas primeiras horas de fermentação do quefir de água, é possível que pequenas quantidades de CO<sub>2</sub> possam estimular o crescimento das bactérias

láticas que, por sua vez, liberam ácidos orgânicos que acidificam o meio e podem servir de fonte de energia para as leveduras (Wood e Hodge, 1985). De fato, o co-cultivo de lactobacilos e leveduras isolados dos grãos do quefir de água resultou no maior crescimento das leveduras devido à acidificação do meio causada pela liberação de ácidos orgânicos pelos lactobacilos (Stadie et al., 2013).

A sacarificação e a simultânea fermentação alcoólica também são seguidas pelo aparecimento de ácido acético no meio (Reib et al., 1990), produzido principalmente pelas espécies de bactérias acéticas. A equipe de Magalhães (2010) mostrou que o metabólito aparece no meio logo nas primeiras horas de fermentação e aumenta ao longo do tempo. Parte do conteúdo de etanol é convertida em ácido acético pelas bactérias do gênero *Acetobacter* (Magalhães et al., 2010), já que essas espécies possuem a enzima álcool desidrogenase que transforma etanol em acetaldeído (Beshkova et al., 2003). Magalhães et al. (2010) mostraram que a conversão de etanol ocorre 12 horas depois do início da fermentação, quando a sua concentração começa a reduzir paralelamente ao incremento do ácido acético. Na fabricação do vinagre, Sengun e Karabiyikli (2011) acreditam que as cepas que iniciam a acetificação são mais bem adaptadas ao meio com baixo conteúdo de ácido acético e elevado conteúdo de etanol. Já as cepas que finalizam podem ser aquelas mais tolerantes ao ácido acético (Sengun e Karabiyikli, 2011).

#### *3.4. Características físico-químicas da bebida do quefir de água*

A composição da bebida do quefir de água é um reflexo da atividade metabólica dos Micro-organismos que prevalecem durante a fermentação. Os principais metabólitos consistem de etanol (leveduras), dióxido de carbono (leveduras), ácido láctico (bactérias láticas), glicerol (levedura) e ácido acético (leveduras, bactérias láticas, bactérias acéticas e bifidobactérias) (Laureys et al., 2017).

Além do etanol e do dióxido de carbono, as leveduras podem liberar pequenas quantidades de glicerol e ácido acético. Todos os ésteres encontrados na bebida também são associados ao metabolismo das leveduras e podem ser responsáveis pelo seu aroma frutado (Luareys e Vuyst, 2014), os mais abundantes

sendo acetato de isoamila, hexanoato de etila, octanoato de etila e decanoato de etila (Laureys et al., 2017).

Já o ácido láctico é o principal metabólito produzido pelas espécies de bactérias lácticas, embora se acredite que pequenas quantidades de etanol e acetato também sejam produzidas pelas espécies heteroláticas facultativas (como *Lactobacillus*) e homoláticas (como *Lactococcus*). As espécies de bactérias lácticas heterofermentativas facultativas (como *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus harbidensis* e *Lactobacillus kefiranofaciens*) ainda são capazes de produzir pequenas quantidades de manitol a partir da frutose que se encontra elevada nas primeiras horas de fermentação (Laureys e Vuyst, 2014).

São escassos os dados na literatura referentes a testes sensoriais com a bebida do quefir de água. Um estudo que provê informação útil em relação às propriedades organolépticas do quefir de água é o de Puerari et al. (2012). Os autores diluíram polpa do cacau em água destilada (1:1,5) - os sólidos solúveis foram ajustados para 12°B, inocularam o meio de cultura com 11% dos grãos do quefir de água e fermentaram-no em duas temperaturas diferentes, 10 e 25°C, por 48 e 72 horas. As bebidas finais foram submetidas ao teste de preferência de provadores treinados. As preferências foram pelas bebidas com baixa acidez/concentração alcoólica. As maiores aceitações foram pelas bebidas fermentadas a 10°C em ambos os tempos (48 e 72 horas), em contraste com aquelas fermentadas a 25°C nos mesmos tempos. Embora estas últimas tivessem recebido as menores aceitações, as rejeições não foram extremas, sendo que 20% aceitaram as bebidas.

O conteúdo de etanol foi quase 40 vezes menor na bebida fermentada a 10°C por 48 horas (~0,5 g/L) e 10 vezes menor na bebida fermentada a 10°C por 72 horas (~4,5 g/L) em comparação com aquelas preparadas a 25°C (~45,0 g/L em ambos os tempos). O mesmo ocorreu com o ácido acético, cuja concentração na bebida fermentada a 10°C (~1,5 g/L em 48 horas e ~2,0 g/L em 72 horas) foi quase 10 vezes menor do que aquelas registradas para as bebidas fermentadas a 25°C (~10,5 g/L em ambos os tempos) (Puerari et al., 2012). De acordo com os autores, a diferença na composição dos metabólitos, a menor acidez e a baixa concentração de etanol nas bebidas preparadas a 10°C podem ter sido responsáveis pela sua

melhor aceitação (Puerari et al., 2012). Estes resultados sugerem que bebidas do quefir de água com menores concentrações de ácidos orgânicos, especialmente ácido acético, e etanol podem aumentar sua aceitação pelo consumidor.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### *4.1. Grãos do quefir e manutenção da cultura*

Grãos do quefir de água foram gentilmente fornecidos pelos membros da Oficina Pró-Celiacos do Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa. Os grãos foram propagados em condições-padrão por, no mínimo, um mês antes da realização do estudo, com o intuito de eliminar influências resultantes do procedimento de cultivo do fornecedor. Para isto, os grãos foram lavados com água destilada e inoculados (10% p/v) em um meio com açúcar mascavo não orgânico (5% p/v) preparado com água destilada e incubados a 28°C (B.O.D. MA 415, Marconi). A cultura em estoque foi mantida por transferência diária do inóculo a um novo meio contendo açúcar mascavo não orgânico com o auxílio de uma peneira plástica (18 mesh).

### *4.2. Análises físico-químicas*

As fontes de carboidrato estudadas (açúcar mascavo não orgânico, açúcar mascavo orgânico, caldo de cana e mel silvestre) tiveram seus teores de proteína e cinzas quantificados conforme metodologia da AOAC 2002. O teor de proteínas foi determinado segundo o método micro Kjeldahl para a quantificação de nitrogênio total. O teor de cinzas foi determinado por calcinação em mufla a 550°C. As análises foram realizadas em triplicata.

As quantidades de glicose e frutose consumidas no meio de cultura fermentado separadamente com as quatro fontes de carboidrato foram calculadas conforme descrito a seguir. Para cada fonte de carboidrato, foram calculadas as quantidades de glicose e frutose liberadas no meio de cultura a partir da quantidade de sacarose hidrolisada em cada tempo de fermentação (24, 48 e 72 horas). Estes valores foram somados às quantidades de glicose e frutose livres pré-existentes no tempo zero (T<sub>0</sub>) para se obter a quantidade total de ambos os monossacarídeos livres no meio de cultura em cada tempo. Em seguida, estes valores foram subtraídos das quantidades de glicose e frutose livres que restaram no meio de cultura ao final de cada tempo de fermentação. Os números finais corresponderam às quantidades de glicose e frutose consumidas no meio de cultura em cada tempo avaliado.

Os meios de cultura preparados a partir das fontes de carboidrato supracitadas e suas respectivas bebidas fermentadas tiveram os valores de seus pHs determinados à temperatura ambiente, utilizando-se pHmetro digital (Tecnopon Equipamentos Especiais, modelo mPA-210).

Os meios de cultura preparados a partir das fontes de carboidrato supracitadas e suas respectivas bebidas fermentadas também tiveram suas concentrações de carboidratos totais (sacarose, glicose e frutose), bem como suas concentrações de etanol e ácido acético quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O cromatógrafo utilizado foi da marca Shimadzu, modelo LC-20AT (Shimadzu Corp., Japão), equipado com sistema de detecção por índice de refração. Sua coluna de exclusão de íons (Rezex ROA-H<sup>+</sup> Phenomenex, 300 x 7,8 mm) foi operada a 30°C usando-se ácido sulfúrico 5 mM como fase móvel com vazão de 0,7 mL/min. Cada variável foi identificada pela comparação dos seus tempos de retenção com os tempos de retenção de seus respectivos padrões da marca Sigma-Aldrich de grau HPLC. A quantificação das variáveis também foi realizada usando-se curvas de calibração obtidas com seus respectivos padrões da marca Sigma-Aldrich de grau HPLC.

#### 4.3. Contagem de leveduras

A contagem de células viáveis de leveduras foi realizada pela técnica de plaqueamento em superfície (*spread plate*), conforme descrito por Oliveria et al. (2013). Uma alíquota de 0,1 mL de cada bebida foi diluída em triplicata em 0,9 mL de solução fosfato-salino (PBS) para produzir a primeira diluição ( $10^{-1}$ ), seguindo de diluições decimais até  $10^{-18}$ . Uma alíquota de 0,1 mL de cada diluição foi inoculada na superfície do meio BDA (Batata Dextrose Ágar) acidificado com solução de ácido tartárico (10%) e espalhada pela superfície com o auxílio de uma alça de Drigalski até que o excesso do líquido fosse absorvido. As placas de Petri foram invertidas e incubadas a 25°C em estufa do tipo B.O.D. por três a cinco dias. A contagem de células viáveis de leveduras foi realizada em contador de colônias da marca Phoenix, modelo CP 600 Plus.

#### 4.4. Estudos de otimização

##### 4.4.1. Teste preliminar

A análise estatística univariada envolve descrever a distribuição de uma única variável, consistindo na maneira mais simples de se analisar a informação e de fazer a estimativa estatística. Neste estudo, quatro fontes de carboidrato foram avaliadas univariavelmente (Tabela 1) para se definir aquela que leva à menor produção de etanol e ácido acético na bebida, bem como à menor concentração de carboidratos residuais. As quantidades de açúcar mascavo orgânico, caldo de cana e mel silvestre usadas para preparar seus respectivos meios de cultura corresponderam àquela necessária para se obter a mesma concentração de carboidratos totais presentes em um meio preparado com açúcar mascavo não orgânico a 5% (p/v). Todas as amostras foram preparadas em triplicata.

**Tabela 1. Níveis da variável fonte de carboidrato analisada no teste preliminar**

Tipo de Experimento	nº condições	Variáveis	Siglas	Q (%)
Análise univariável	4	1 Açúcar mascavo não orgânico	AMN	5,0 (p/v)
		2 Açúcar mascavo orgânico	AMO	5,4 (p/v)
		3 Caldo de cana	CCA	28,1 (v/v)
		4 Mel silvestre	MEL	6,0 (p/v)

Q = quantidade. Os meios foram acrescidos de 10% dos grãos do quefir de água e incubados a 28°C sem agitação por 24, 48 e 72 h

##### 4.4.2. Placket-Burman

O delineamento por Plackett-Burman é usado para estudar os fatores importantes que afetam uma resposta polinomial de primeira ordem. Este delineamento foi usado neste estudo para estabelecer as variáveis que exercem efeito significativo sobre a fermentação da fonte de carboidrato selecionada no teste preliminar.

Seis variáveis independentes (concentração da fonte de carboidrato e dos grãos do quefir de água, temperatura, tempo de fermentação, pH inicial e velocidade de agitação do meio) foram testadas quanto às suas influências sobre os seguintes parâmetros da bebida fermentada pelo quefir de água: concentração de etanol, ácido acético e carboidratos residuais (sacarose, glicose e frutose) (Tabela 2).

Foi necessário realizar quatro delineamentos fatoriais para encontrar a melhor faixa de temperatura e os níveis estreitos das variáveis independentes que influenciam significativamente os parâmetros estudados para a produção da nova bebida do quefir de água.

O software Minitab Release 15 foi usado para a análise dos dados coletados nos delineamentos. O número de ensaios foi  $n+1$  conforme o delineamento experimental Plackett-Burman, em que  $n$  é o número de variáveis. O ponto central foi repetido cinco vezes para se estimar o erro. Na Tabela 2 podem ser observados os delineamentos experimentais realizados para esta etapa. Cada linha representa um experimento e cada coluna representa uma variável independente.

**Tabela 2.** Níveis das variáveis analisadas em cada uma das etapas de delineamento

Tipo de Experimento	n° condições	Variáveis	Limites	
			Mín.	Máx.
<b>Primeiro Delineamento</b> <b>Temperatura entre 10 a 30°C</b>				
Plackett-Burman	12	1 Conc. açúcar mascavo não orgânico (%)	3	30
		2 Conc. grãos do quefir de água (%)	3	15
		3 Temperatura (°C)	10	30
		4 Tempo (h)	24	72
		5 pH inicial	3,0	8,0
		6 Velocidade de agitação (rpm)	0	120
<b>Segundo Delineamento: Ajustado</b> <b>Temperatura entre 10 a 30°C</b>				
Plackett-Burman	13	1 Conc. açúcar mascavo não orgânico (%)	1	5
		2 Conc. grãos do quefir de água (%)	3	15
		3 Temperatura (°C)	10	30
		4 Tempo (h)	12	36
		5 pH inicial	3,0	5,0
		6 Velocidade de agitação (rpm)	0	120
<b>Superfície de Resposta</b>				
Central Composite*	20	1 Temperatura (°C)	10	30
		2 pH inicial	3,0	5,0
<b>Terceiro Delineamento</b> <b>Temperatura entre 28 a 38°C</b>				
Plackett-Burman	13	1 Conc. açúcar mascavo não orgânico (%)	1	5
		2 Conc. grãos do quefir de água (%)	3	15
		3 Temperatura (°C)	28	38
		4 Tempo (h)	12	36
		5 pH inicial	4,0	7,0
		6 Velocidade de agitação (rpm)	0	120
<b>Superfície de Resposta</b>				
Central Composite**	20	1 Conc. açúcar mascavo não orgânico (%)	1	5
		2 Tempo (h)	12	36
		3 pH inicial	4,0	7,0
<b>Quarto Delineamento: Estreitado</b> <b>Temperatura entre 28 a 38°C</b>				
<b>Superfície de Resposta</b> Central Composite**	20	1 Conc. açúcar mascavo não orgânico (%)	2	4
		2 Tempo (h)	20	28
		3 pH inicial	5,0	6,0

\*A concentração do açúcar mascavo não orgânico foi fixada em 5% (p/v), a concentração dos grãos do quefir de água foi fixada em 3% (p/p) e o tempo de fermentação foi fixado em 24 horas. \*\*A temperatura foi fixada em 28°C e a concentração dos grãos do quefir de água foi fixada em 3% (p/v).

#### 4.5. Análise estatística

No teste preliminar, os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão e a análise estatística univariada foi realizada com ANOVA seguida do teste de Tukey. Os resultados dos dois primeiros delineamentos Plackett-Burman foram expressos a partir do valor obtido de somente uma amostra de cada condição de fermentação. Os resultados do terceiro e quarto delineamento Plackett-Burman foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão de amostras produzidas em triplicata. Todos os delineamentos foram realizados utilizando-se o software Minitab 15. Este software também foi utilizado para as análises multivariadas dos dados experimentais, as quais foram realizadas com o teste *t* de Student não pareado. O software Design Expert 7.0 foi usado para plotar os gráficos de superfície de resposta. A qualidade do ajuste do modelo de equação polinomial de segunda ordem foi expressa pelo coeficiente de determinação ( $R^2$ ). Em todos os testes estatísticos, o nível de significância foi estabelecido em 5%.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Teste Preliminar

No teste preliminar nós avaliamos a influência de quatro fontes de carboidrato (açúcar mascavo não orgânico, açúcar mascavo orgânico, caldo de cana e mel silvestre) sobre a concentração de etanol, ácido acético e carboidratos residuais (sacarose, glicose e frutose) na bebida fermentada em três tempos diferentes (24, 48 e 72 horas). A partir desta análise, nós identificamos a fonte de carboidrato que leva à produção das menores concentrações desses parâmetros na bebida.

Os dados mostram que as reduções nas concentrações de sacarose foram acompanhadas pela rápida redução dos valores de pH nas bebidas em 24 horas, seguida por uma redução mais lenta nas 48 e 72 horas seguintes (Tabela 3). Assim, o pH final reduziu com o aumento do tempo de fermentação e as bebidas menos ácidas foram registradas em 24 horas.

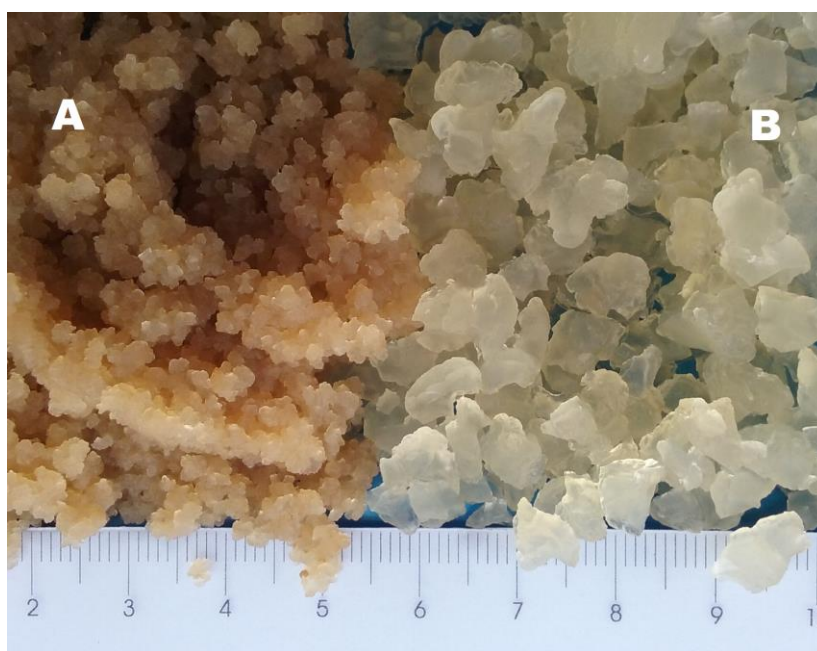
O meio de cultura fermentado com açúcar mascavo não orgânico apresentou os valores de pH final mais elevados nos tempos de 24 e 48 horas e o meio com mel silvestre, os valores de pH mais baixos nos três tempos. Os meios de cultura fermentados com açúcar mascavo orgânico, caldo de cana e mel silvestre exibiram valores finais de pH próximos de 3,30, valor que está associado ao baixo crescimento dos grãos do quefir de água, de acordo com Laureys et al. (2017). Segundo os autores, esses valores devem ser evitados porque podem prejudicar a manutenção da amostra dos grãos do quefir a longo prazo, comprometendo seu reaproveitamento (*backslopping*) em lotes sucessivos da bebida e, conseqüentemente, o seu controle de qualidade.

É importante mencionar que os valores de pH registrados pela nossa equipe estavam abaixo daqueles descritos por outros autores nos três tempos estudados (Reib et al., 1990; Magalhães et al., 2010; Laureys et al., 2017; Fiorda et al., 2017). Isto pode ter sido devido à amostra do quefir de água utilizado no presente estudo, cujos grânulos apresentaram dimensões menores do que a média descrita na literatura (Figura 1) (Moinas et al., 1980; Reib et al., 1990; Diniz et al., 2003; Bergmann et al., 2010; Waldherr et al., 2010; Laureys et al., 2017). Encontram-se na literatura relatos de que as dimensões dos grãos

**Tabela 3:** Médias das concentrações de carboidratos residuais (sacarose, glicose e frutose) e pH final em função do tempo de fermentação do quefir de água.

Fontes de carboidrato	Tempo (h)	Sacarose (g/L)	Glicose (g/L)	Frutose (g/L)	CR	P	pH Final
AMN	T0	44,90 ± 0,63 <sup>b</sup>	0,38 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,41 ± 0,06 <sup>a</sup>	45,69 ± 0,69	100 %	5,87 ± 0,02 <sup>Aa</sup>
	24 h	22,77 ± 1,21 <sup>b</sup>	3,61 ± 0,15 <sup>a</sup>	7,14 ± 0,25 <sup>a</sup>	33,52 ± 1,52	27 %	3,66 ± 0,01 <sup>Ba</sup>
	48 h	18,82 ± 0,26 <sup>b</sup>	3,62 ± 0,07 <sup>a</sup>	10,83 ± 0,41 <sup>b</sup>	33,27 ± 0,50	27 %	3,16 ± 0,03 <sup>Ca</sup>
	72 h	13,92 ± 1,38 <sup>b</sup>	1,92 ± 0,06 <sup>a</sup>	9,05 ± 0,68 <sup>a</sup>	24,89 ± 1,10	46 %	2,89 ± 0,06 <sup>Da</sup>
AMO	T0	50,36 ± 0,16 <sup>a</sup>	0,53 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,42 ± 0,07 <sup>a</sup>	51,31 ± 0,18	100 %	5,31 ± 0,01 <sup>Ab</sup>
	24 h	40,87 ± 1,83 <sup>c</sup>	4,40 ± 1,11 <sup>a</sup>	6,44 ± 0,89 <sup>a</sup>	51,71 ± 0,88	0 %	3,43 ± 0,02 <sup>Bb</sup>
	48 h	32,36 ± 1,83 <sup>c</sup>	4,40 ± 0,06 <sup>a</sup>	7,40 ± 0,004 <sup>a</sup>	44,16 ± 1,27	14 %	3,10 ± 0,01 <sup>Ca</sup>
	72 h	26,61 ± 1,77 <sup>c</sup>	4,94 ± 0,19 <sup>c</sup>	9,35 ± 1,04 <sup>a</sup>	40,90 ± 0,90	20 %	2,89 ± 0,08 <sup>Da</sup>
CCA	T0	40,14 ± 0,07 <sup>c</sup>	3,92 ± 0,39 <sup>b</sup>	7,90 ± 0,05 <sup>b</sup>	51,96 ± 0,50	100 %	5,28 ± 0,02 <sup>Ab</sup>
	24 h	1,63 ± 0,22 <sup>a</sup>	5,44 ± 0,95 <sup>a</sup>	19,70 ± 1,22 <sup>b</sup>	26,77 ± 1,22	49 %	3,33 ± 0,07 <sup>Bb</sup>
	48 h	1,07 ± 0,55 <sup>a</sup>	0,46 ± 0,32 <sup>b</sup>	8,92 ± 1,05 <sup>ab</sup>	10,45 ± 1,91	80%	2,97 ± 0,04 <sup>Cb</sup>
	72 h	0,48 ± 0,40 <sup>a</sup>	ND <sup>b</sup>	6,18 ± 1,07 <sup>b</sup>	6,66 ± 1,11	87 %	2,91 ± 0,05 <sup>Ca</sup>
MEL	T0	3,67 ± 0,15 <sup>d</sup>	16,95 ± 0,40 <sup>c</sup>	22,96 ± 0,49 <sup>c</sup>	43,58 ± 1,04	100 %	4,08 ± 0,02 <sup>Ac</sup>
	24 h	5,18 ± 0,14 <sup>a</sup>	13,12 ± 0,68 <sup>b</sup>	19,08 ± 1,02 <sup>b</sup>	37,38 ± 0,34	14 %	2,96 ± 0,08 <sup>Bc</sup>
	48 h	4,64 ± 1,56 <sup>a</sup>	6,45 ± 0,91 <sup>c</sup>	16,59 ± 2,64 <sup>c</sup>	27,68 ± 1,81	37 %	2,51 ± 0,06 <sup>Cc</sup>
	72 h	4,26 ± 0,42 <sup>a</sup>	2,57 ± 0,93 <sup>a</sup>	16,72 ± 0,63 <sup>c</sup>	23,55 ± 1,07	46 %	2,29 ± 0,05 <sup>Db</sup>

CR = carboidratos residuais (g/L). P = percentagem de CR calculada a partir de T0. ND = não detectado. Os meios foram preparados com 5,0% de AMN, 5,4% de AMO, 28,1% de CCA e 6,0% de MEL e as fermentações foram realizadas com 3% dos grãos a 28°C. Os dados foram expressos como média ± desvio-padrão. <sup>A-D</sup>Diferenças significativas entre tempos para os mesmos grupos. <sup>a-c</sup>Diferenças significativas entre grupos para os mesmos tempos. ANOVA seguida de teste de Tukey (p<0,05).



**Figura 1:** Grãos do quefir de água utilizados para a realização deste estudo de otimização (A) comparados com aqueles obtidos de uma fermentação caseira de referência (B)

do quefir de água variam de 3 a 35mm (Reib, 1990; Diniz et al., 2003; Bergmann et al., 2010; Waldherr et al., 2010), porém os grãos utilizados no presente estudo variaram de 1 a 2 mm. Apesar destes grãos terem sido mantidos pela nossa equipe sob as condições descritas no item 5.1 (*Grãos do quefir e manutenção da cultura*), suas dimensões permaneceram menores do que aquelas relatadas na literatura ao longo de todo o estudo.

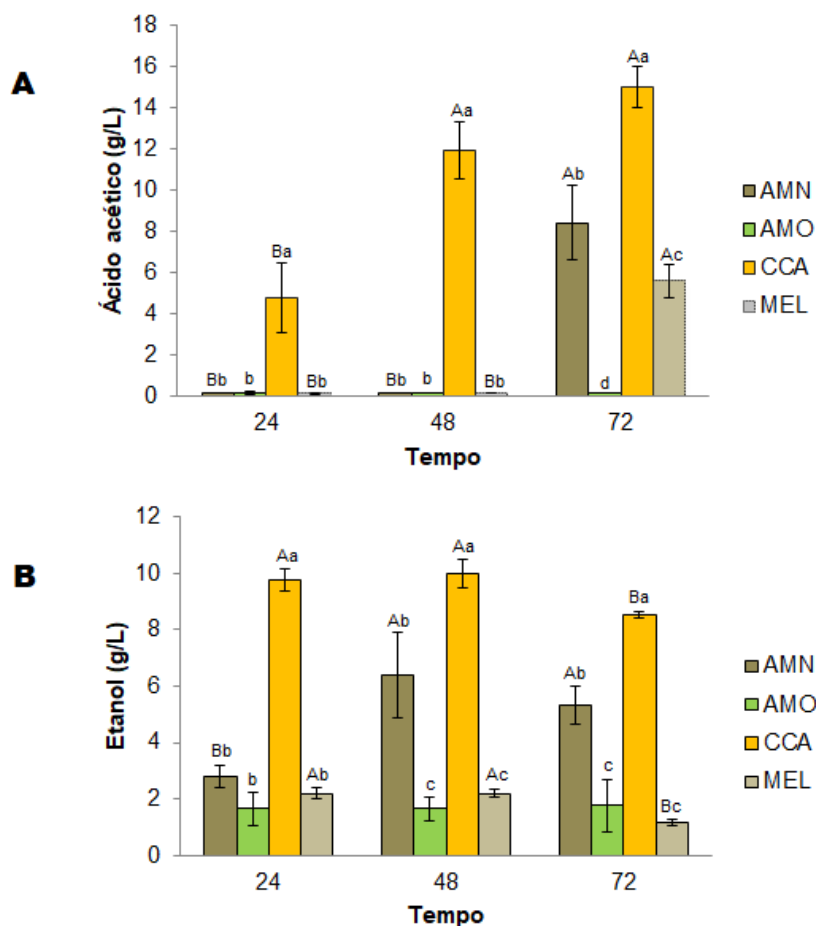
Moinas et al. (1980) encontraram que o rompimento dos grânulos é determinado pela pressão de CO<sub>2</sub> advindo da fermentação alcoólica no seu interior. Fermentações do quefir de água mantidas por períodos extensos, como 72 horas ou mais (Moinas et al., 1980), favorecem a proliferação das cepas de Micro-organismos mais resistentes aos meios ácidos, particularmente as leveduras. O maior número de leveduras no interior dos grânulos pode levar a uma taxa de fermentação acima do normal e ao rompimento excessivo dos exopolissacarídeos, resultando em grânulos de tamanhos inferiores àqueles relatados na literatura (Moinas et al., 1980). Assim sendo, a maior taxa de fermentação possível de ocorrer nos grãos do quefir de água de menor dimensão pode levar à maior liberação de CO<sub>2</sub>, acidificando o meio e podendo

explicar os valores de pH final mais baixos registrados no nosso estudo. É importante considerar que a temperatura de incubação aplicada nesta fase preliminar (28°C) também pode ter contribuído com esses valores mais baixos de pH final, visto que, nos outros estudos, as temperaturas de incubação variaram entre 21 a 25°C (Reib et al., 1990; Magalhães et al., 2010; Laureys et al., 2017; Fiorda et al., 2017). Além disto, o meio mais acidificado pode ter estimulado as bactérias lácticas a liberarem mais ácidos orgânicos (Stadie et al., 2013), o que pode ter contribuído para reduzir os valores de pH final no nosso estudo.

Na bebida fermentada a partir do açúcar mascavo não orgânico, o aumento na concentração de etanol atingiu seu pico em 48 horas, reduzindo concomitantemente com aumento acentuado de ácido acético em 72 horas (Figuras 2A e 2B). Isto pode ser explicado pela ação das bactérias acéticas que convertem etanol em ácido acético, já que essas espécies são capazes de crescer em valores de pH entre 3,0 e 4,0 (Sengun e Karabiyikli, 2011).

A bebida preparada a partir do açúcar mascavo não orgânico apresentou concentrações mais elevadas de etanol no tempo de 24 horas em comparação com aquelas registradas por Magalhães et al. (2010), que também realizaram um estudo físico-químico da bebida do quefir de água em 24 horas. Os autores dissolveram 5% de açúcar mascavo em água destilada, inocularam o meio de cultura com 11% dos grãos do quefir de água e fermentaram-na a 25°C por 24 horas. A bebida final apresentou ~1,1 g/L de etanol (Magalhães et al., 2010) em contraste com ~2,8 g/L encontrados pela nossa equipe. A maior fermentação provável de ocorrer com grãos do quefir de água atipicamente menores utilizados neste estudo e a diferença entre as temperaturas de incubação, maior no nosso teste preliminar (28°C) do que no estudo de Magalhães et al. (2010), podem explicar as diferenças mencionadas no conteúdo de etanol.

A bebida fermentada a partir do caldo de cana exibiu concentrações significativamente maiores de etanol e ácido acético entre todas as fontes de carboidrato. O conteúdo de etanol foi quase 10 vezes maior do que aquele encontrado na bebida fermentada a partir do açúcar mascavo não orgânico no



**Figura 2:** Concentrações de (A) ácido acético e (B) etanol no meio fermentado pelo quefir de água com quatro fontes de carboidrato diferentes

Os meios foram preparados com 5,0% de AMN, 5,4% de AMO, 28,1% de CCA e 6,0% de MEL e as fermentações foram realizadas com 10% dos grãos do quefir de água a 28°C. Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio-padrão. <sup>A-B</sup>Diferenças significativas entre tempos para os mesmos grupos. <sup>a-</sup>Diferenças significativas entre grupos nos mesmos tempos. ANOVA seguida de teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

tempo de 24 horas. Não houve diferença significativa entre os valores de etanol registrados em 24 e 48 horas de fermentação no meio com o caldo de cana, mas o valor diminuiu em 72 horas. Este perfil também pode ser explicado pela ação das bactérias acéticas que são capazes de produzir elevadas concentrações de ácido acético a partir de um meio com elevado conteúdo de etanol (Sengun e Karabiyikli, 2011).

Ainda no tempo de 24 horas, o conteúdo de ácido acético foi quase 5 vezes maior na bebida fermentada a partir do caldo de cana do que aquele registrado para as bebidas fermentadas a partir do açúcar mascavo não orgânico, açúcar mascavo orgânico e mel silvestre. Em 72 horas, o valor desse metabólito quase triplicou. A explicação para este fenômeno pode estar no teor

de sais minerais no caldo de cana. Vários minerais são importantes para o metabolismo e o crescimento apropriados das leveduras. Entre os sais minerais mais abundantes no caldo de cana, o fósforo e o magnésio se destacam. O fósforo catiônico monovalente ( $P^+$ ) é essencial para a produção de energia celular e a síntese de ácidos nucleicos. Também é essencial para a absorção de carboidratos e a produção de etanol e ATP advindos da glicólise (Souza et al., 2015). O magnésio, por sua vez, é o cátion divalente ( $Mg^{2+}$ ) mais abundante no ambiente intracelular. Ele é o cofator mais importante para mais de 300 enzimas envolvidas em diferentes reações metabólicas, como a síntese de ATP e DNA (Souza et al., 2015). Na fermentação, o magnésio é necessário para a ativação de diversas enzimas glicolíticas e para proteger as leveduras do estresse causado por fatores como etanol, temperatura alta e elevada pressão osmótica. Acredita-se que a sua disponibilidade no meio de cultura seja um pré-requisito para as leveduras alcançarem a máxima atividade fermentativa, sendo que o monitoramento da sua concentração no mosto é recomendado na produção industrial de etanol a partir da fermentação do caldo de cana (Souza et al., 2015).

O caldo de cana pode conter 0,032% (g/mL) de fósforo e 0,096% (g/mL) de magnésio (Souza et al., 2015) em contraste com 0,005% (g/g) de fósforo e 0,004% (g/g) de magnésio no açúcar mascavo (Laboratório do Instituto Ambroisse da França apud Oliveira et al., 2007) e 0,002% (g/g) de fósforo e 0,007% (g/g) de magnésio no mel silvestre (Marchini, 2005). No nosso estudo, ao analisar as diluições realizadas para o preparo de cada meio de cultura (Tabela 1), nota-se que o caldo de cana foi diluído somente 3,5 vezes, ao passo que os açúcares mascavos foram diluídos aproximadamente 20 vezes e o mel silvestre, 16 vezes. Considerando que o caldo de cana continha quase 8 e 18 vezes mais cinzas do que os açúcares mascavos e o mel silvestre (Tabela 4), respectivamente, o meio com o caldo de cana pode ter favorecido o

**Tabela 4:** Médias dos conteúdos de proteína e de cinzas em cada fonte de carboidrato

<b>Fontes de carboidrato</b>	<b>Proteína (%)</b>	<b>Cinzas (%)</b>
<b>AMN</b>	0,82±0,27 <sup>ac</sup>	0,86±0,01 <sup>a</sup>
<b>AMO</b>	0,22±0,01 <sup>b</sup>	0,67±0,04 <sup>b</sup>
<b>CCA</b>	1,17±0,11 <sup>c</sup>	1,16±0,04 <sup>c</sup>
<b>MEL</b>	0,59±0,30 <sup>ab</sup>	0,03±0,01 <sup>d</sup>

Os dados foram expressos como média ± desvio-padrão. <sup>a-c</sup>Diferenças significativas entre grupos nos mesmos tempos. ANOVA seguida de teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

metabolismo das leveduras com um conteúdo muito mais elevado de sais minerais com importantes atuações na glicólise. Isto pode explicar a diferença na atividade metabólica dos grãos do quefir de água no meio de cultura com caldo de cana em relação às outras fontes de carboidrato, que resultou em um rendimento muito maior de etanol no meio em todos os tempos avaliados e, conseqüentemente, de ácido acético.

Quanto ao teor de proteína, o caldo de cana continha até 5 vezes o teor de proteína registrado para as outras fontes de carboidrato (Tabela 4), que também pode ter favorecido o crescimento dos Micro-organismos e a produção de etanol e ácido acético muito além dos açúcares mascavos e do mel silvestre.

Todos estes fatores reunidos podem explicar as razões que levaram as leveduras a produzirem muito mais etanol na bebida fermentada a partir do caldo de cana nos três tempos avaliados e, conseqüentemente, mais ácido acético convertido pelas bactérias acéticas.

As menores concentrações de etanol e ácido acético foram produzidas pelos meios de cultura preparados com açúcar mascavo orgânico e mel silvestre em todos os tempos de fermentação, sem diferenças significativas entre ambos. A única exceção foi no período de 72 horas em que os grãos produziram muito mais ácido acético no meio com mel silvestre. A análise do consumo de açúcares redutores mostra que o menor consumo de glicose e frutose foi registrado para o meio fermentado com o açúcar mascavo orgânico (Tabela 5). Isto implica em fraca atividade fermentativa por parte das leveduras que, por sua vez, reflete na atividade metabólica das outras espécies, resultando na baixa produção de metabólitos que conferem as características

físico-químicas da bebida final, bem como o seu potencial nutricional e funcional. A explicação para este fenômeno pode estar associada ao teor de sais minerais e proteína mencionada anteriormente (Blateyron e Sabalayrolles, 2001). O açúcar mascavo orgânico foi a fonte de carboidrato que apresentou a menor percentagem de proteína (Tabela 4), quase quatro vezes menor do que a do açúcar mascavo não orgânico. A menor disponibilidade de nitrogênio no meio pode ter dificultado a síntese de proteína e o crescimento celular (Blateyron e Sabalayrolles, 2001), afetando o desempenho da microbiota e levando à baixa produção de etanol e ácido acético nos três tempos de fermentação, apesar do teor de sais minerais não ter se apresentado tão baixo.

Já o consumo de açúcares redutores no meio com mel silvestre não apresentou diferença significativa em relação ao meio com açúcar mascavo não orgânico ao final de 72 horas de fermentação. A produção de etanol, no entanto, foi quase 2,5 vezes menor. O teor de proteína sozinho não pode explicar esse fenômeno no meio com mel silvestre visto que não houve diferença significativa entre os teores de proteína entre o mel silvestre e o açúcar mascavo não orgânico. E o teor de cinzas foi o menor para o mel silvestre entre as quatro fontes de carboidrato estudadas, o que não explicaria o fenômeno observado para o mel silvestre, da mesma forma. Todavia, os dados mostram que o meio fermentado com mel silvestre exibiu as mais elevadas concentrações de glicose livre desde o início da fermentação, cujo consumo foi o principal responsável pela redução no conteúdo de carboidratos residuais (Tabela 3 e 4). A maior disponibilidade de glicose livre pode ter criado competição entre bactérias e leveduras pelo mesmo substrato, resultando em menor produção de etanol no meio (Leroi e Pidoux, 1993). De fato, Leroi e Pidoux (1993) encontraram que a produção de etanol pela *S. florentinus*, extraída dos grãos do quefir de água, é fortemente afetada pelo *Lactobacillus hilgardii*, extraído dos mesmos grãos (Leroi e Pidoux, 1993). Este fenômeno foi igualmente constatado por outros autores que atribuíram a causa não somente

**Tabela 5:** Consumo de glicose e frutose do açúcar mascavo não orgânico, açúcar mascavo orgânico, caldo de cana e mel silvestre durante a fermentação do quefir de água

Fontes de carboidrato	Tempo (h)	Glicose (g/L)	Frutose (g/L)	Total (g/L)
<b>AMN</b>	24 h	8,39±0,76	4,90±0,83	<b>13,29±1,58<sup>a</sup></b>
	48 h	10,45±0,13	3,27±0,41	<b>13,72±0,51<sup>a</sup></b>
	72 h	14,73±0,52	7,62±0,92	<b>22,35±1,36<sup>a</sup></b>
<b>AMO</b>	24 h	1,11±1,04	0	<b>1,11±1,04<sup>b</sup></b>
	48 h	5,60±0,65	2,27±0,68	<b>8,07±1,33<sup>b</sup></b>
	72 h	8,06±0,74	3,54±0,57	<b>11,60±0,98<sup>b</sup></b>
<b>CCA</b>	24 h	18,70±1,06	9,91±2,83	<b>28,61±3,89<sup>c</sup></b>
	48 h	23,98±0,61	19,50±1,33	<b>43,47±1,93<sup>c</sup></b>
	72 h	24,74±0,21	23,66±2,25	<b>48,40±2,41<sup>c</sup></b>
<b>MEL</b>	24 h	3,85±0,45	3,90±0,75	<b>7,74±0,30<sup>d</sup></b>
	48 h	10,88±1,07	6,75±2,30	<b>17,64±3,38<sup>d</sup></b>
	72 h	14,87±0,91	6,73±0,83	<b>21,59±1,08<sup>d</sup></b>

Os meios foram preparados com 5,0% de AMN, 5,4% de AMO, 28,1% de CCA e 6,0% de MEL e as fermentações foram realizadas com 10% dos grãos do quefir de água a 28°C. Os dados foram expressos como média ± desvio-padrão. <sup>A-B</sup>Diferenças significativas entre tempos para os mesmos grupos. <sup>a-</sup>Diferenças significativas entre grupos nos mesmos tempos. ANOVA seguida de teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

à competição das espécies por glicose (Boidron, 1969<sup>a</sup>, 1969b citados por Leroi e Pidoux, 1993) mas também à presença de ácido lático ou acético no meio de cultura (Noda et al., 1980 apud Leroi e Pidoux, 1993; Essia Ngang et al., 1990) ou à lise acelerada da parede celular da levedura por enzimas bacterianas (Lonvaud-Funel et al., 1988). Isto também pode explicar o maior consumo de frutose pelas leveduras em 48 horas, sugerindo que as leveduras possam ter desviado a produção de energia para a frutose na ausência de glicose (Fiorda et al., 2017).

A interferência da extrema acidez do meio com mel silvestre nos três tempos de fermentação também deve ser destacada. Entre todos os meios, aquele preparado com o mel silvestre exibiu os valores mais baixos de pH a partir do ponto zero (T0) (Tabela 3). As primeiras 24 horas registraram uma rápida queda de 4,1 ao valor de 2,9, que seguiu reduzindo lentamente nas 48 e 72 horas seguintes a valores abaixo de 2,6. De acordo com Steinkraus e Morse (1966), o pH é um dos fatores mais influentes na taxa de fermentação dos hidroméis, cuja faixa ideal se estende de 3,7 a 4,6. Segundo os autores, a

fermentação de uma amostra de hidromel com pH 2,9 é muito mais lenta do que outra com pH 3,7 (Steinkraus e Morse, 1966). No nosso estudo, a extrema acidez do meio de cultura ao longo dos três tempos pode ter prejudicado a atividade metabólica das bactérias e das leveduras, tornando o processo fermentativo lento e resultando em um conteúdo de metabólitos sem diferenças significativas com aquele do açúcar mascavo orgânico. A maior disponibilidade de glicose livre pode ter resultado na maior produção de ácidos orgânicos pelas bactérias lácticas, o que pode ter contribuído com a redução do pH ao longo do tempo (Sengun e Karabiyikli, 2011).

Ainda vale ressaltar que o mel é uma matéria-prima que pode apresentar considerável variação em suas atividades fermentativas, dependendo da sua qualidade, exibindo fermentação lenta ou nenhuma fermentação quando o meio de cultura não é suplementado com fatores de crescimento (Steinkraus e Morse, 1966). E isto pode ter contribuído com a menor taxa de fermentação do meio com mel silvestre em relação àquele com o caldo de cana. Além disto, o conteúdo variável de peróxido de hidrogênio endógeno tem uma forte correlação com a extensão de inibição do crescimento bacteriano do mel (Segundo Brudzynski et al., 2011). Mesmo em soluções altamente diluídas, as bactérias não conseguem responder normalmente aos sinais proliferativos quando o mel contém elevado conteúdo de peróxido de hidrogênio e permanecem coibidas. Além disto, o peróxido de hidrogênio no mel ainda é capaz de reagir com complexos de melanoidinas-polifenóis naturalmente formados no rico ambiente químico do mel. E os produtos advindos dessas reações podem aumentar ou diminuir a capacidade oxidativa do peróxido de hidrogênio (Brudzynski et al., 2011). A etapa de esterilização dos meios de cultura por autoclavação realizada no nosso estudo pode ter interferido nesse efeito do peróxido de hidrogênio.

O objetivo do teste preliminar foi o de selecionar a fonte de carboidrato que leva à produção de uma bebida do quefir de água com menores concentrações de etanol, ácido acético e carboidratos residuais. Visto que o açúcar mascavo orgânico resultou na menor taxa de fermentação e o caldo de cana na bebida com os maiores rendimentos de etanol e ácido acético, ambas as fontes de carboidrato foram descartadas da fase seguinte de delineamentos

fatoriais. O mel silvestre também foi descartado porque levou à produção de um meio com elevada acidez em todos os tempos de fermentação, que pode comprometer a manutenção e o reaproveitamento dos grãos do quefir em lotes sucessivos da bebida (*backslopping*).

A utilização do açúcar mascavo não orgânico resultou em uma bebida com baixa concentração de etanol e ácido acético em 24 horas e com o pH final mais elevado, acima do valor crítico para o bom crescimento dos grãos. Ainda vale mencionar que o menor tempo de fermentação (24 horas) associado ao baixo custo do açúcar mascavo não orgânico proporcionam a melhor relação custo/benefício para a fabricação da bebida do quefir de água em escala industrial. Desta forma, o açúcar mascavo não orgânico foi a fonte de carboidrato utilizada para os delineamentos fatoriais que se seguiram.

## *5.2. Delineamentos Fatoriais*

### *5.2.1. Primeiro Delineamento*

#### *Temperatura entre 10 a 30°C*

No primeiro experimento fatorial, nós avaliamos a influência de seis variáveis independentes (concentração do açúcar mascavo e dos grãos do quefir de água, temperatura, tempo de fermentação, pH inicial e velocidade de agitação do meio) sobre a concentração de etanol, ácido acético e carboidratos residuais (sacarose, glicose e frutose) da bebida fermentada na faixa de temperatura entre 10 a 30°C. As condições de fermentação foram estabelecidas de acordo com o planejamento Plackett-Burman e Superfície de Resposta. O modelo de regressão teve sua significância estatística testada pelo teste F e os resultados da regressão foram submetidos à análise de variância (ANOVA).

Devido à amplitude dos intervalos mínimos e máximos estabelecidos neste primeiro delineamento (Tabela 2), não foi possível obter uma equação que explicasse a variação do ácido acético no meio, o que tornou este delineamento fatorial inconclusivo. Desta forma, foi realizado um segundo experimento fatorial em que se ajustou os níveis mínimos e máximos de três das seis variáveis independentes para possibilitar o ajuste de uma equação para todos os parâmetros avaliados.

### *5.2.2. Segundo Delineamento: Ajustado*

#### *Temperatura entre 10 a 30°C*

O segundo experimento consistiu na repetição do primeiro com os níveis mínimos e máximos das seguintes variáveis independentes ajustados: concentração do açúcar mascavo, tempo e pH inicial. Os resultados foram obtidos a partir do resultado de uma única amostra produzida sob cada condição de fermentação. As condições de fermentação foram estabelecidas de acordo com o planejamento Plackett-Burman e Superfície de Resposta. O modelo de regressão teve sua significância estatística testada pelo teste F e os resultados da regressão foram submetidos à análise de variância (ANOVA).

Dentre os parâmetros avaliados, a contagem de células viáveis de leveduras também foi realizada sob as mesmas condições de fermentação apresentadas pelo planejamento de Superfície de Resposta.

Os resultados mostram que a temperatura exerceu efeito significativo ( $p < 0,05$ ) sobre a concentração de etanol na bebida (Tabela 6), ao passo que nenhuma variável exerceu influência significativa sobre a concentração de ácido acético (Tabela 7). As concentrações de sacarose, glicose e frutose foram significativamente influenciadas ( $p < 0,05$ ) pela concentração do açúcar mascavo, como era esperado, e pelo valor do pH inicial (Tabelas 8, 9 e 10). Mas, a concentração dos carboidratos residuais somente foi significativamente influenciada ( $p < 0,05$ ) pela concentração do açúcar mascavo (Tabela 11).

**Tabela 6.** Análise dos fatores estudados no planejamento estatístico Plackett-Burman sobre a concentração de etanol

	Efeito	Teste t	P> t
Açúcar (%)	0,08417	0,51	0,634
Grãos (%)	0,28753	1,73	0,144
Temperatura (°C)	0,63228	3,81	0,013
Tempo (h)	0,26680	1,61	0,169
pH inicial	0,06631	0,40	0,706
rpm	-0,17184	-1,03	0,348
Constante		1,51	0,193

Teste t: é o valor das variáveis determinado pelo teste t de Student com 5% de probabilidade do nível do P-valor.  $R^2$ : 0,81

**Tabela 7.** Análise dos fatores estudados no planejamento estatístico Plackett-Burman sobre a concentração de ácido acético

	<b>Efeito</b>	<b>Teste t</b>	<b>P&gt; t </b>
Açúcar (%)	0,2115	1,91	0,115
Grãos (%)	0,1695	1,53	0,187
Temperatura (°C)	0,2804	2,53	0,053
Tempo (h)	0,1481	1,33	0,240
pH inicial	0,0699	0,63	0,556
rpm	-0,1250	-1,13	0,311
Constante		-2,32	0,068

Teste t: é o valor das variáveis determinado pelo teste t de Student com 5% de probabilidade do nível do P-valor.  $R^2$ : 0,76

**Tabela 8.** Análise dos fatores estudados no planejamento estatístico Plackett-Burman sobre a concentração de sacarose

	<b>Efeito</b>	<b>Teste t</b>	<b>P&gt; t </b>
Açúcar (%)	24,269	3,19	0,024
Grãos (%)	7,046	0,92	0,397
Temperatura (°C)	-9,861	-1,29	0,252
Tempo (h)	-5,631	-0,74	0,493
pH inicial	30,647	4,02	0,010
rpm	3,695	0,49	0,648
Constante		4,88	0,005

Teste t: é o valor das variáveis determinado pelo teste t de Student com 5% de probabilidade do nível do P-valor.  $R^2$ : 0,86

**Tabela 9.** Análise dos fatores estudados no planejamento estatístico Plackett-Burman sobre a concentração de glicose

	<b>Efeito</b>	<b>Teste t</b>	<b>P&gt; t </b>
Açúcar (%)	11,339	3,12	0,026
Grãos (%)	-3,686	-1,02	0,357
Temperatura (°C)	4,526	1,25	0,268
Tempo	1,106	0,30	0,773
pH inicial	-12,188	-3,36	0,020
rpm	-5,431	-1,50	0,195
Constante		4,35	0,007

*Teste t: é o valor das variáveis determinado pelo teste t de Student com 5% de probabilidade do nível do P-valor. R<sup>2</sup>: 0,84*

**Tabela 10.** Análise dos fatores estudados no planejamento estatístico Plackett-Burman sobre a concentração de frutose

	<b>Efeito</b>	<b>Teste t</b>	<b>P&gt; t </b>
Açúcar (%)	12,836	3,06	0,028
Grãos (%)	-4,506	-1,08	0,331
Temperatura (°C)	7,794	1,86	0,122
Tempo (h)	2,067	0,49	0,643
pH inicial	-13,670	-3,26	0,022
rpm	-7,057	-1,68	0,153
Constante		5,32	0,003

*Teste t: é o valor das variáveis determinado pelo teste t de Student com 5% de probabilidade do nível do P-valor. R<sup>2</sup>: 0,85*

**Tabela 11.** Análise dos fatores estudados no planejamento estatístico Plackett-Burman sobre a concentração de carboidratos totais nas amostras

	Efeito	Teste t	P> t
Açúcar (%)	48,172	12,50	0,000
Grãos (%)	-0,873	-0,23	0,830
Temperatura (°C)	2,185	0,57	0,595
Tempo (h)	-2,185	-0,57	0,595
pH inicial	5,061	1,31	0,246
rpm	-8,521	-2,21	0,078
Constante		19,46	0,000

Teste t: é o valor das variáveis determinado pelo teste t de Student com 5% de probabilidade do nível do P-valor. R<sup>2</sup>: 0,97

A concentração dos grãos, o tempo de fermentação e a velocidade de agitação do meio de cultura não influenciaram significativamente ( $p > 0,05$ ) os parâmetros avaliados. Assim sendo, a quantidade de grãos utilizada na execução das 13 condições de fermentação seguintes foi fixada no mínimo determinado para essa variável neste experimento (3%), já que o menor volume dos grãos facilitaria sua manutenção e manuseio durante o processo de fabricação em alta escala. O tempo de fermentação foi fixado em 24 horas, visto que este é o tempo em que se obtém o crescimento máximo das leveduras e dos lactobacilos (Leroi e Pidoux, 1993; Magalhães et al., 2010; Stadie et al., 2013) associado à menor produção de etanol e ácido acético na bebida, conforme indicado pelo teste preliminar.

A Tabela 12 apresenta os resultados obtidos do segundo delineamento (Ajustado) realizado com 13 condições de fermentação, usadas para traçar as superfícies de resposta com a aplicação de duas variáveis (temperatura e pH inicial) entre as três determinadas pelo delineamento Plackett-Burmann. A terceira variável significativa, a concentração do açúcar mascavo, foi fixada na concentração máxima (5%) pelo fato do seu efeito ser diretamente proporcional ao peso da biomassa do quefir de água (Pidoux et al., 1989), para garantir o bom crescimento dos grãos.

**Tabela 12.** Segundo delineamento (Ajustado) com 13 corridas usadas para traçar as superfícies de resposta com a aplicação de duas variáveis (temperatura e pH inicial), cada uma com cinco níveis, e seus respectivos valores de etanol, ácido acético, carboidratos residuais (sacarose, glicose e frutose) e contagem de células viáveis de leveduras.

Condições	T (°C)	pH inicial	Etanol (g/L)	Ác. Acético (g/L)	Sacarose (g/L)	Glicose (g/L)	Frutose (g/L)	pH final	Leveduras (log UFC/mL)
1	10	3,0	1,92	0,26	5,49	17,66	21,85	3,03	8,91±0,01
2	30	3,0	2,10	0,34	30,50	6,33	8,17	2,86	6,34±0,04
3	10	5,0	11,20	0,76	2,59	15,81	26,61	2,88	7,62±0,01
4	30	5,0	11,57	0,82	13,51	11,30	20,19	3,32	12,09±0,03
5	6	4,0	4,34	0,36	0,13	18,92	25,96	2,82	8,98±0,02
6	34	4,0	5,29	0,69	23,39	8,61	13,02	3,64	11,02±0,01
7	20	2,6	1,44	0,24	26,07	7,82	11,11	2,53	7,54±0,02
8	20	5,4	15,83	1,01	10,35	11,40	23,24	3,07	7,90±0,02
9	20	4,0	4,34	0,14	21,12	9,67	14,21	3,34	8,22±0,01
10	20	4,0	3,78	0,15	21,10	9,66	14,24	3,38	7,64±0,04
11	20	4,0	4,64	0,00	19,63	10,25	15,11	3,37	8,12±0,01
12	20	4,0	4,85	0,00	20,28	10,00	14,71	3,39	7,76±0,02
13	20	4,0	4,67	0,00	20,46	9,90	14,65	3,41	7,96±0,02

*T = Temperatura. Os meios foram preparados com 5% de açúcar mascavo não orgânico, acrescidos de 3% dos grãos do quefir de água e fermentados por 24 horas.*

A análise de variância (ANOVA) para as equações-respostas estão apresentadas abaixo (Tabela 13). Os dados mostram que a concentração de etanol foi significativamente influenciada ( $p < 0,05$ ) pelo pH inicial e pela temperatura, ao passo que a concentração de ácido acético foi significativamente influenciada ( $p < 0,05$ ) pela temperatura e pelo pH inicial ao quadrado. O consumo de sacarose, glicose e frutose sofreu influência significativa ( $p < 0,05$ ) do pH inicial e do pH inicial ao quadrado. A temperatura influenciou significativamente ( $p < 0,05$ ) o consumo de sacarose e glicose, mas não o consumo de frutose. Foi a temperatura associada ao pH inicial que influenciou o consumo deste último.

**Tabela 13.** Análise de variância para a equação-resposta desenvolvida a partir das concentrações de etanol, ácido acético e carboidratos residuais (sacarose, glicose e frutose) no meio

Fonte	Etanol (g/L)	AA (g/L)	Sacarose (g/L)	Glicose (g/L)	Frutose (g/L)
pH inicial (pH)	0,003	0,309	0,004	0,000	0,000
Temperatura (T)	0,000	0,002	0,001	0,020	0,678
pH * T	0,094	0,673	0,288	0,002	0,004
pH <sup>2</sup>	0,297	0,000	0,000	0,001	0,000
T <sup>2</sup>	0,002	0,000	0,229	0,936	0,229
Constante	0,000	0,155	0,000	0,000	0,000

AA = ácido acético

A resposta final que fornece a concentração de etanol ( $R^2 = 0,99$ ) após a remoção dos termos relacionados com as variáveis não significativas ( $p > 0,05$ ) pode ser obtida pela função:

$$\text{Etanol} = -1,25 \cdot \text{pH} + 4,97 \cdot 10^{-3} \cdot \text{pH} \cdot T + 0,02 \cdot T^2$$

A resposta final que fornece a concentração de ácido acético ( $R^2 = 0,97$ ) após a remoção dos termos relacionados com as variáveis não significativas ( $p > 0,05$ ) pode ser obtida pela função:

$$\text{Ácido Acético} = -0,08 \cdot T + 0,23 \cdot \text{pH}^2 + 2,75 \cdot 10^{-3} \cdot T^2$$

A resposta final que fornece a concentração de sacarose ( $R^2 = 0,99$ ) após a remoção dos termos relacionados com as variáveis não significativas ( $p > 0,05$ ) pode ser obtida pela função:

$$\text{Sacarose} = -116,08 + 54,62 \cdot \text{pH} + 1,54 \cdot T - 4,87 \cdot \text{pH}^2$$

A resposta final que fornece a concentração de glicose ( $R^2 = 0,98$ ) após a remoção dos termos relacionados com as variáveis não significativas ( $p > 0,05$ ) pode ser obtida pela função:

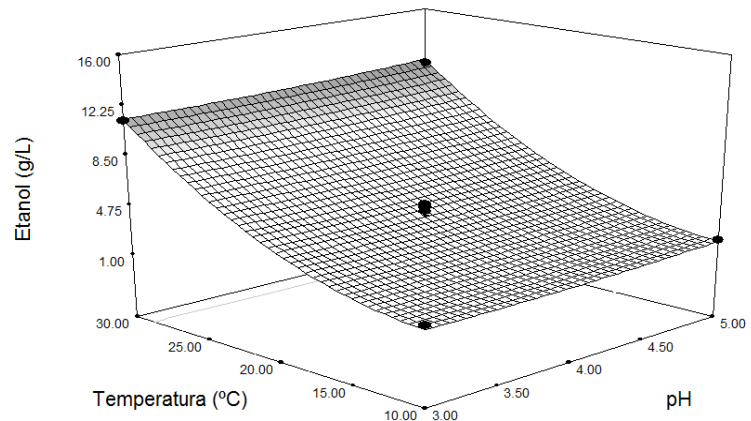
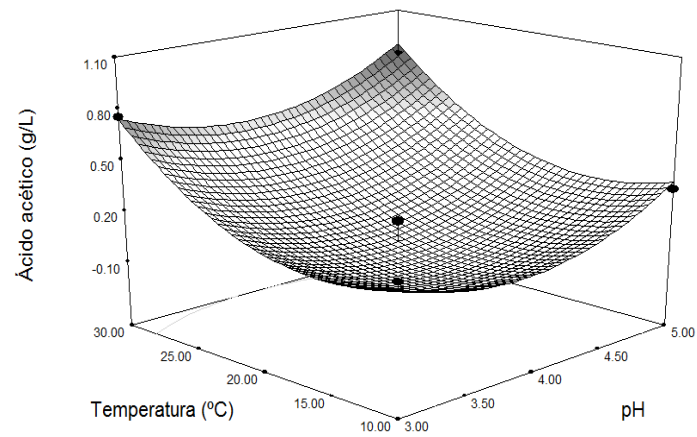
$$\text{Glicose} = 72,49 - 24,85 \cdot \text{pH} - 0,63 \cdot T + 0,17 \cdot \text{pH} \cdot T + 2,21 \cdot \text{pH}^2$$

A resposta final que fornece a concentração de frutose ( $R^2 = 0,99$ ) após a remoção dos termos relacionados com as variáveis não significativas ( $p > 0,05$ ) pode ser obtida pela função:

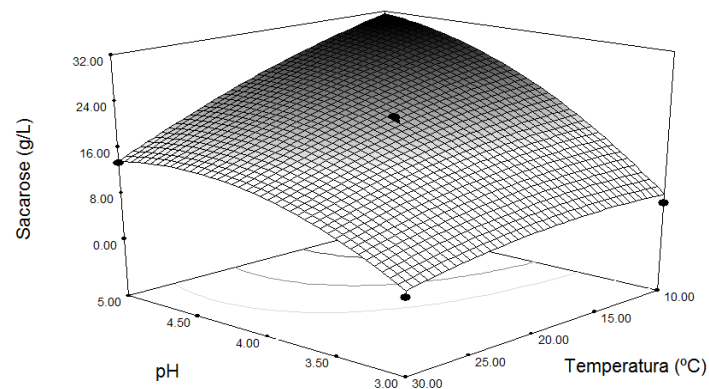
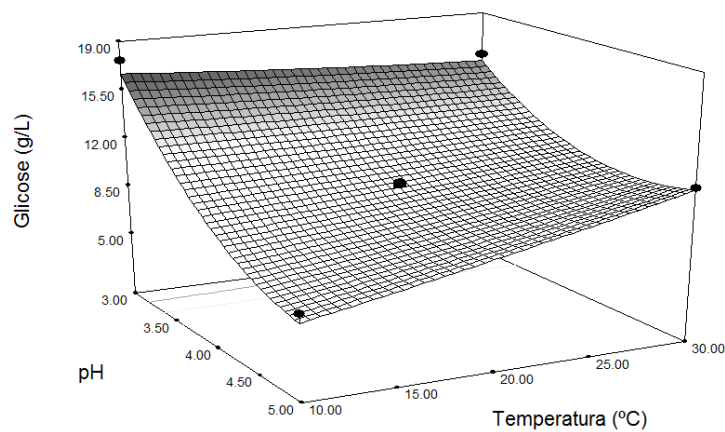
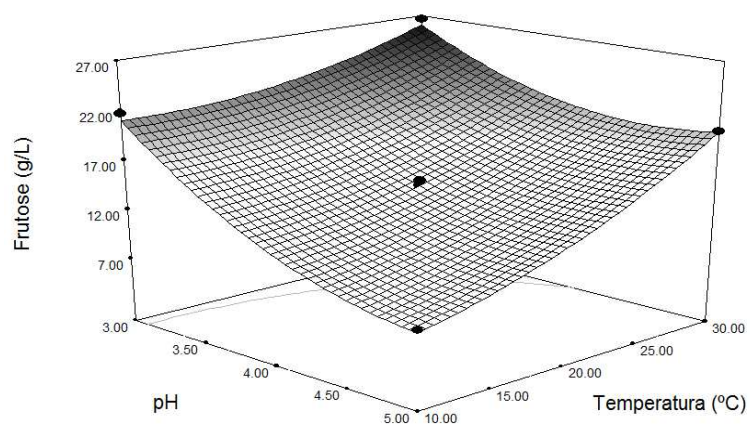
$$\text{Frutose} = 88,64 - 29,81 \cdot \text{pH} + 0,18 \cdot \text{pH} \cdot T + 2,67 \cdot \text{pH}^2$$

Não foi possível obter uma equação para explicar a variação do crescimento das leveduras na bebida.

As superfícies de resposta geradas a partir das concentrações de etanol, ácido acético e carboidratos residuais podem ser observadas nas Figuras 3 e 4. Os dados mostram que as temperaturas mais baixas estavam associadas aos maiores conteúdos de carboidratos residuais, indicando baixa atividade fermentativa nas faixas mais baixas de temperatura. Por outro lado, as temperaturas mais elevadas estavam associadas às maiores taxas de consumo dos carboidratos residuais, o que levou às maiores produções de etanol e ácido acético na bebida. Este achado corrobora com Puerari et al. (2012) que encontraram que o consumo dos carboidratos totais de uma bebida à base de polpa de cacau fermentada pelos grãos do quefir de água foi

**A****B**

**Figura 3.** Superfícies de resposta da produção de etanol (A) e ácido acético (B) no processo de fermentação do quefir de água em função da temperatura e do tempo

**A****B****C**

**Figura 4.** Superfícies de resposta da concentração de sacarose (A), glicose (B) e frutose (C) durante o processo de fermentação do quefir de água em função do pH inicial e temperatura.

incompleto a 10°C até mesmo nos períodos mais prolongados de fermentação (72 horas).

Temperatura é um fator que exerce influência importante sobre a produção de etanol porque as temperaturas mais baixas desaceleram a atividade metabólica das leveduras, que crescem e proliferam rapidamente entre 19 e 25°C (Zajsek e Gorsek, 2010). De fato, um estudo recente mostrou que fermentações prolongadas do quefir de água a temperaturas baixas, aplicadas somente durante um intervalo de repouso na fabricação da bebida, podem induzir uma fase lag no início da fermentação subsequente e impedir o funcionamento normal da microbiota (Laureys et al., 2017). Schneedorf (2012) afirma que a temperatura e o tempo de fermentação são variáveis capazes de modificar a relação bactéria/levedura e até mesmo as cepas microbianas nos grãos do quefir de água. No nosso estudo, os meios de cultura submetidos a temperaturas  $\leq 20^\circ\text{C}$  apresentaram contagens de células viáveis de leveduras  $10^4$  a  $10^5$  vezes menores do que os meios mantidos a temperaturas mais elevadas (Tabela 12). A única exceção foi a da corrida 2, que submeteu a microbiota a um valor de pH inicial extremo (3,0). Já foi dito que valores de pH próximos de 3,3 estão associados ao baixo crescimento dos grãos do quefir de água. Este fenômeno, por sua vez, está associado a elevadas contagens de células viáveis nos grãos (Laureys et al., 2017). Pode ter ocorrido que as espécies mais resistentes a ambientes ácidos, como leveduras e bactérias acéticas, tenham proliferado bem a 30°C na condição 2, mas em virtude do pH extremo permaneceram retidas nos grãos (Laureys et al., 2017), levando a baixas contagens de células viáveis na bebida.

Os dados mostram que o consumo da sacarose aumentou a partir de 25°C e que as maiores contagens de células viáveis (condições 4 e 6) foram registradas para os meios preparados com os valores mais elevados de pH inicial (5,0 e 4,0, respectivamente) associado às temperaturas mais elevadas (30 e 34°C, respectivamente). Isto indicou a necessidade da nossa equipe analisar o efeito dos valores de pH inicial e temperatura acima daqueles estabelecidos neste experimento.

### *5.2.3. Terceiro Experimento*

#### *Temperatura entre 28 a 38°C*

O terceiro delineamento foi realizado com o intuito de avaliar a influência dos mesmos níveis mínimos e máximos da concentração do açúcar mascavo e dos grãos, tempo de fermentação e velocidade de agitação sobre os parâmetros da bebida do quefir de água agora submetida a novos níveis de pH inicial (4,0 a 7,0) e temperatura (28 a 38°C). Os resultados foram obtidos a partir de triplicatas produzidas sob cada condição de fermentação, as quais foram estabelecidas de acordo com o programa de planejamento Plackett-Burman e Superfície de Resposta. O modelo de regressão teve sua significância estatística testada pelo teste F e os resultados da regressão foram submetidos à análise de variância (ANOVA).

Curiosamente, os resultados mostram que a temperatura não foi um fator significativo no processo de fermentação do quefir de água na faixa de 28 a 38°C (Tabelas 14, 15 e 16). Entretanto, este mesmo intervalo de temperatura levou ao consumo total do conteúdo de sacarose nas 20 condições de fermentação realizadas. Isto reforça o nosso achado, no experimento anterior, de que a atividade metabólica dos Micro-organismos nos grãos do quefir de água é estimulada por temperaturas altas.

Tanto a concentração do açúcar mascavo quanto o tempo de fermentação exerceram efeito significativo ( $p < 0,05$ ) sobre o consumo da glicose e do etanol (Tabelas 14 e 15). Mas, a concentração de ácido acético somente foi influenciada significativamente ( $p < 0,05$ ) pelo tempo (Tabela 16).

**Tabela 14.** Análise dos fatores estudados no planejamento estatístico Plackett-Burman sobre a concentração de glicose

	<b>Efeito</b>	<b>t-test</b>	<b>P&gt; t </b>
Açúcar (%)	25,313	11,72	0,000
Grãos (%)	-2,493	-1,15	0,300
Temperatura (°C)	0,680	0,31	0,766
Tempo (h)	-6,640	-3,08	0,028
pH inicial	3,847	1,78	0,135
rpm	1,353	0,63	0,558
Constante		13,69	0,000

*teste t: é o valor das variáveis determinadas pelo teste t de Student com 5% de probabilidade do p-valor. R<sup>2</sup>: 0,97*

**Tabela 15.** Análise dos fatores estudados no planejamento estatístico Plackett-Burman sobre a concentração de etanol

	<b>Efeito</b>	<b>t-test</b>	<b>P&gt; t </b>
Açúcar (%)	23,896	3,55	0,016
Grãos (%)	7,903	1,17	0,293
Temperatura (°C)	1,629	0,24	0,818
Tempo (h)	16,181	2,40	0,061
pH	-8,631	-1,28	0,256
rpm	-1,207	-0,18	0,865
Constante		5,06	0,004

*teste t: é o valor das variáveis determinadas pelo teste t de Student com 5% de probabilidade do p-valor. R<sup>2</sup>: 0,81*

**Tabela 16.** Análise dos fatores estudados no planejamento estatístico Plackett-Burman sobre a concentração de ácido acético

	<b>Efeito</b>	<b>t-test</b>	<b>P&gt; t </b>
Açúcar (%)	-2,604	-1,42	0,214
Grãos (%)	1,076	0,59	0,582
Temperatura (°C)	-1,022	-0,56	0,601
Tempo (h)	4,719	2,58	0,050
pH inicial	4,641	2,53	0,052
rpm	-1,059	-0,58	0,588
Constante		4,01	0,010

*teste t: é o valor das variáveis determinadas pelo teste t de Student com 5% de probabilidade do p-valor. R<sup>2</sup>: 0,76*

Novamente, a concentração dos grãos do quefir e a velocidade de agitação do meio não exerceram influência significativa ( $p > 0,05$ ) sobre os parâmetros da bebida nos novos níveis avaliados. A quantidade de grãos aplicada nas 20 condições de fermentação seguintes foi fixada no mínimo estabelecido neste experimento (3%). As fermentações foram realizadas sem agitação do meio.

Os resultados obtidos neste terceiro delineamento (28 a 38°C) são apresentados na Tabela 17. Estes dados foram usados para traçar as superfícies de resposta com a aplicação de três variáveis (concentração do açúcar mascavo, tempo e pH inicial) (Figura 4, 5, 6 e 7).

**Tabela 17:** Terceiro delineamento (28 a 38°C) com 20 condições de fermentação usadas para traçar as superfícies de resposta com a aplicação de três variáveis (açúcar mascavo, tempo e pH inicial), cada uma com cinco níveis, e seus respectivos valores de etanol, ácido acético, glicose, frutose e contagem de células viáveis de leveduras.

Condições	Tempo (h)	Açúcar (%)	pH inicial	Etanol (g/L)	Ác. Acético (g/L)	Glicose (g/L)	Frutose (g/L)	pH final	Leveduras (log UFC/mL)
1	12	1,0	4,0	1,03±0,18	0,00±0,05	9,04±0,91	3,71±0,37	3,76±0,15	10,18±0,22
2	36	1,0	4,0	1,03±0,43	0,33±0,28	7,77±1,06	3,42±0,41	3,25±0,02	10,30±0,27
3	12	5,0	4,0	1,82±0,07	0,00±0,00	29,14±1,88	11,92±0,52	4,07±0,02	9,86±0,48
4	36	5,0	4,0	1,69±1,32	0,99±1,46	8,62±1,50	3,85±0,66	3,14±0,02	10,15±0,18
5	12	1,0	7,0	1,06±0,14	0,00±0,08	16,65±0,30	6,43±0,43	3,89±0,03	7,82±0,01
6	36	1,0	7,0	1,17±0,12	0,16±0,06	2,59±0,12	2,10±0,08	3,40±0,06	8,55±0,30
7	12	5,0	7,0	1,39±0,21	0,00±0,04	15,35±0,36	9,79±0,95	4,19±0,12	8,18±0,01
8	36	5,0	7,0	3,59±0,84	1,57±0,23	15,22±0,26	9,70±0,15	3,60±0,08	12,44±0,28
9	4	3,0	5,5	1,18±0,30	0,00±0,01	10,68±0,82	7,24±0,14	5,62±0,02	6,23±0,02
10	44	3,0	5,5	1,67±0,08	1,00±1,12	9,49±0,49	7,55±0,30	3,57±0,04	16,36±0,25
11	24	0,0	5,5	0,81±0,02	0,00±0,00	0,52±0,01	0,58±0,01	3,53±0,11	5,43±0,01
12	24	6,4	5,5	2,96±0,15	0,69±0,04	25,56±0,14	8,01±0,07	3,91±0,01	9,69±0,03
13	24	3,0	3,0	2,58±0,12	0,32±0,06	12,26±0,11	9,03±0,30	3,11±0,17	6,05±0,37
14	24	3,0	8,0	1,90±0,16	0,22±0,08	11,48±0,35	7,14±0,30	3,96±0,24	6,68±0,22
15	24	3,0	5,5	2,29±0,47	0,03±0,21	13,23±0,79	7,49±0,43	3,74±0,26	15,03±0,06
16	24	3,0	5,5	1,65±0,32	0,23±0,04	13,68±0,94	7,34±0,23	3,76±0,24	15,66±0,37
17	24	3,0	5,5	2,14±0,04	0,08±0,24	14,36±0,98	7,91±0,45	3,89±0,28	16,30±0,05
18	24	3,0	5,5	1,52±0,19	0,24±0,01	9,60±0,25	7,33±0,27	3,71±0,29	16,14±0,16
19	24	3,0	5,5	1,72±0,22	0,08±0,20	8,83±0,29	7,19±0,52	3,61±0,06	16,23±0,07
20	24	3,0	5,5	1,78±0,10	0,05±0,12	12,86±0,13	7,38±0,27	3,94±0,08	16,25±0,07
M	24	5,0	-	2,80±0,39	0,13±0,00	3,61±0,15	7,14±0,25	3,66±0,01	11,64±0,05

*M = manutenção. Os meios foram preparados com 5% de açúcar mascavo não orgânico, acrescidos de 3% dos grãos do quefir de água e fermentados por 24 horas. A sacarose foi totalmente consumida nos novos níveis aplicados. O meio de cultura da manutenção foi inoculado com 10% dos grãos e o pH inicial não foi ajustado. A manutenção apresentou 22,8 g/L de sacarose residual.*

A análise de variância (ANOVA) mostra que a concentração do açúcar mascavo influenciou significativamente ( $p < 0,05$ ) todos os parâmetros avaliados, como era esperado, e foi a única variável que influenciou significativamente ( $p < 0,05$ ) a concentração de etanol e frutose (Tabela 18). O tempo também exerceu efeito significativo ( $p < 0,05$ ) sobre o consumo de glicose. Já o ácido acético foi significativamente influenciado ( $p < 0,05$ ) por todas as variáveis citadas na tabela abaixo.

**Tabela 18.** Análise de variância para as equações-respostas desenvolvida a partir das concentrações de etanol, ácido acético, glicose e frutose no meio.

Fonte	Etanol	Ác. Acético (g/L)	Glicose (g/L)	Frutose (g/L)
Tempo (T)	0,0914	<0,0001	0,0040	0,0924
Açúcar mascavo (AM)	0,0007	<0,0001	<0,0001	<0,0001
T*AM	0,1432	0,0002	0,6314	0,7534
T <sup>2</sup>	0,1086	0,0029	0,2116	0,9088
AM <sup>2</sup>	0,7355	0,0459	0,6694	0,0993
Constante	0,0167	<0,0001	0,0021	0,0017

A resposta final que fornece a concentração de etanol ( $R^2 = 0,79$ ) após a remoção dos termos relacionados com as variáveis não significativas ( $p > 0,05$ ) pode ser obtida pela função:

$$\text{Etanol} = 4,51 - 0,20 \text{ AM}$$

A resposta final que fornece a concentração de ácido acético ( $R^2 = 0,95$ ) após a remoção dos termos relacionados com as variáveis não significativas ( $p > 0,05$ ) pode ser obtida pela função:

$$\text{Ácido acético} = 2,11 - 0,06T - 0,43AM + 0,01 T AM + 9,29 \cdot 10^{-4}T^2 + 0,02 AM^2$$

A resposta final que fornece a concentração de glicose ( $R^2 = 0,87$ ) após a remoção dos termos relacionados com as variáveis não significativas ( $p > 0,05$ ) pode ser obtida pela função:

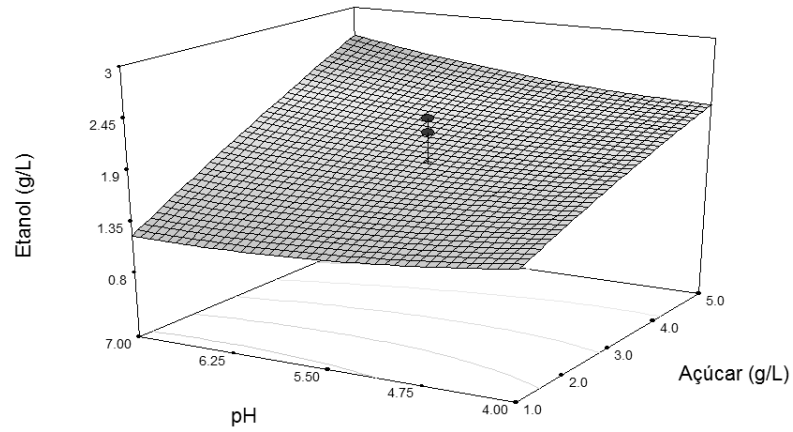
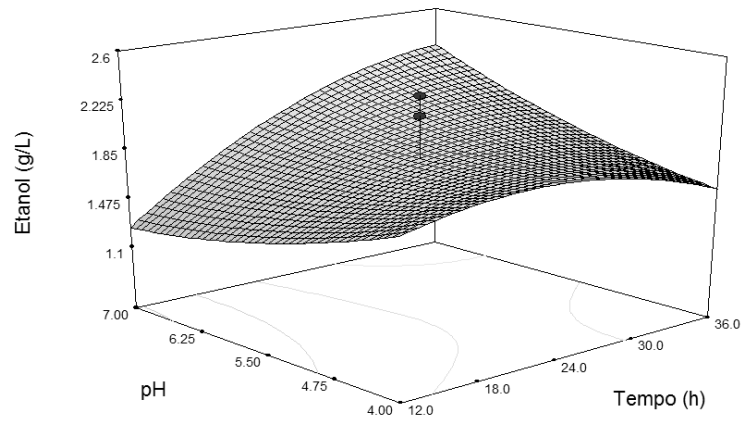
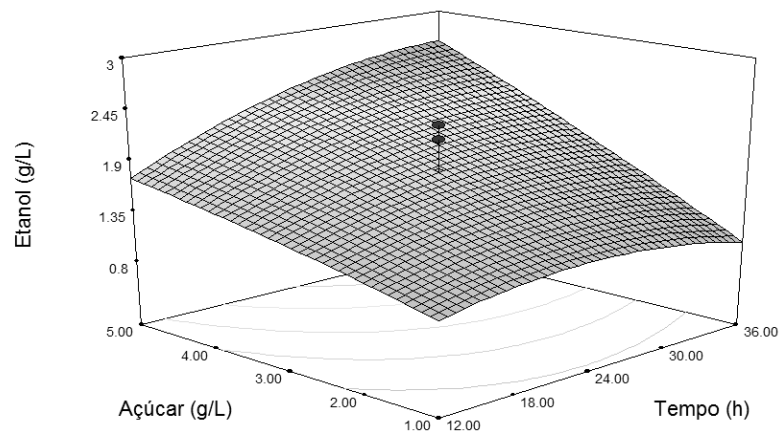
$$\text{Glicose} = 2,18 - 0,20 T + 4,57 AM^2$$

A resposta final que fornece a concentração de frutose ( $R^2 = 0,88$ ) após a remoção dos termos relacionados com as variáveis não significativas ( $p > 0,05$ ) pode ser obtida pela função:

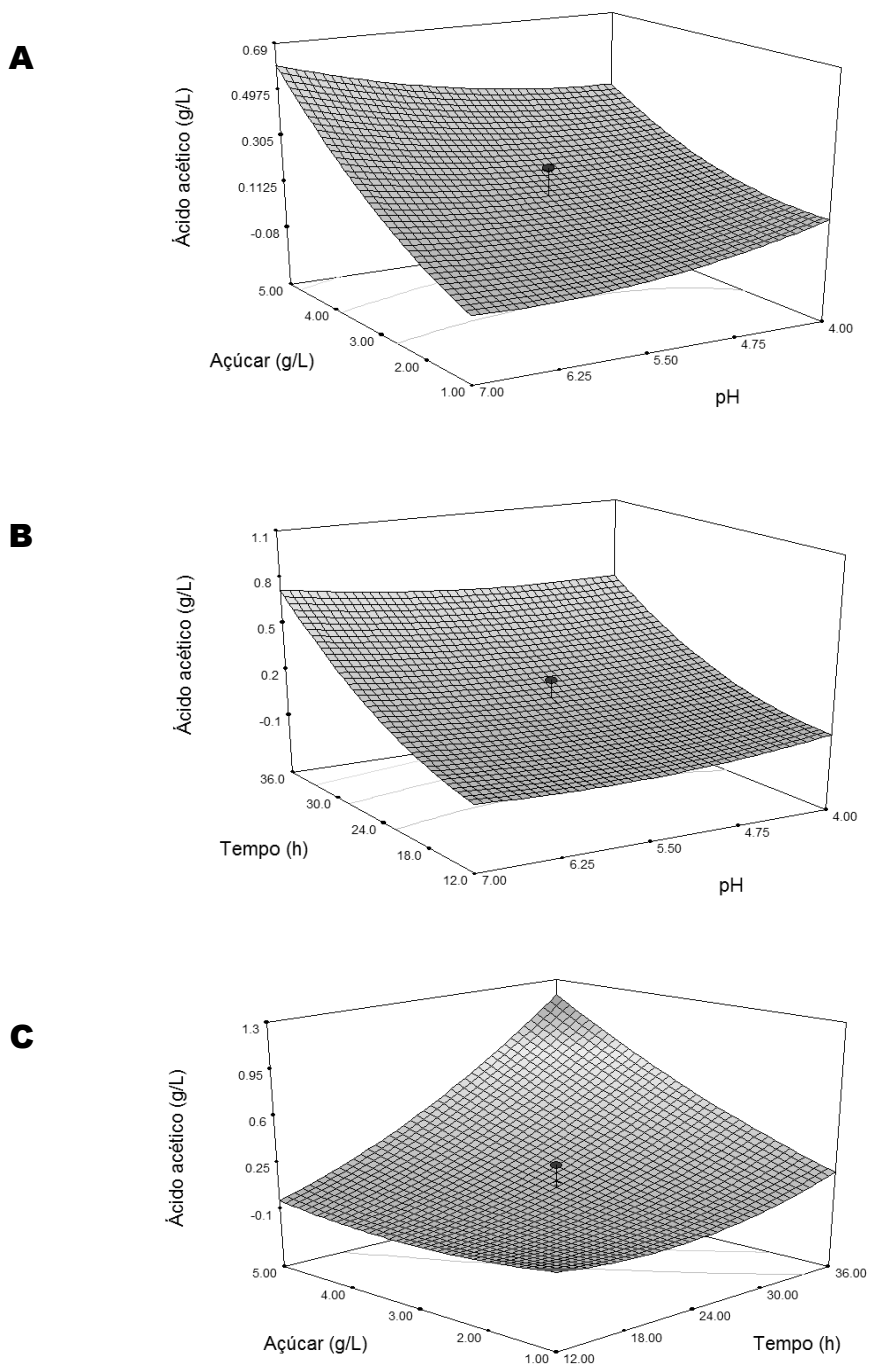
$$\text{Frutose} = 7,67 + 2,20 AM$$

Novamente, não foi possível obter uma equação para explicar a variação do crescimento das leveduras na bebida.

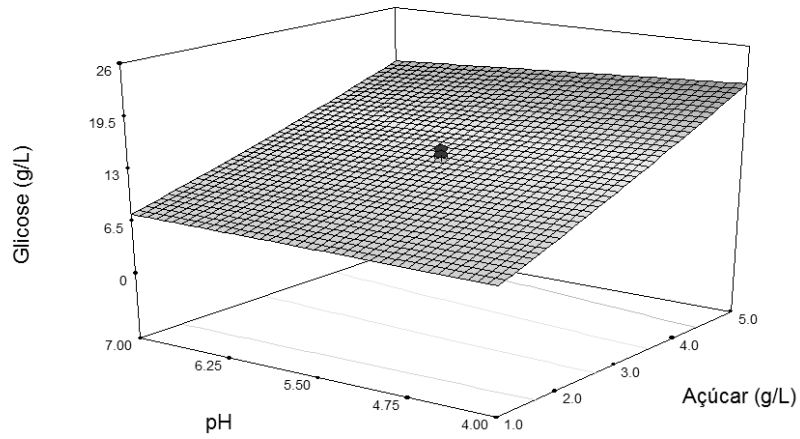
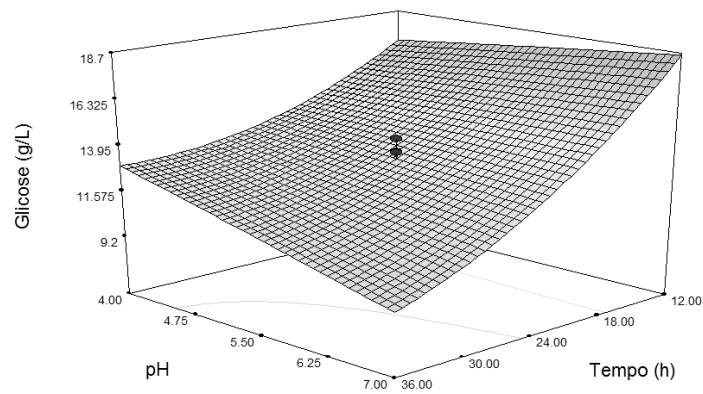
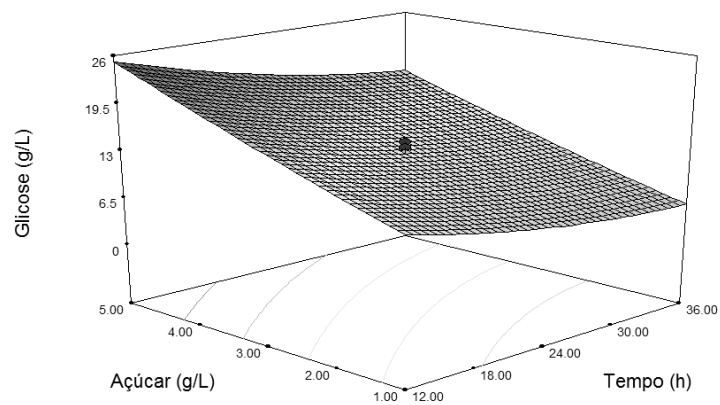
As superfícies de resposta geradas a partir das concentrações de etanol, ácido acético, glicose e frutose podem ser observadas nas Figuras 5, 6, 7 e 8, respectivamente. A sacarose foi totalmente consumida nos novos níveis avaliados.

**A****B****C**

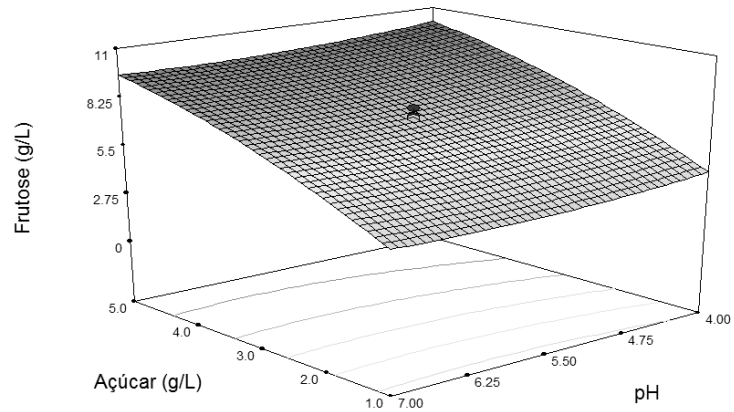
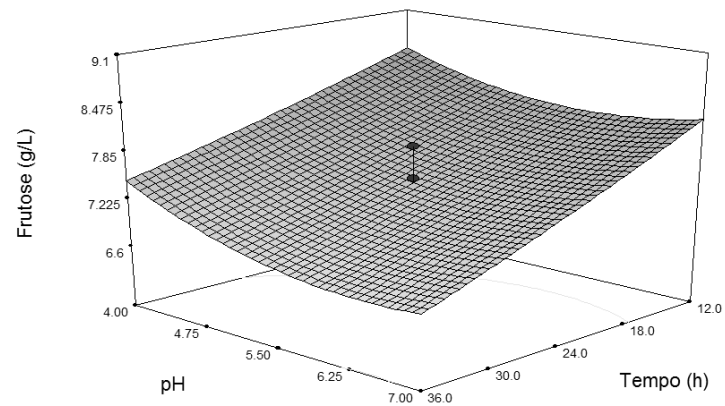
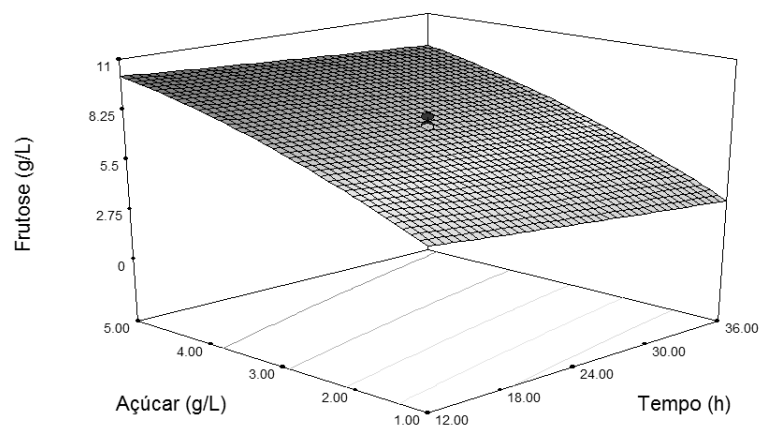
**Figura 5.** Superfícies de resposta da produção de etanol durante o processo de fermentação do quefir de água. (A) pH inicial vs açúcar mascavo. (B) pH inicial vs tempo. (C) açúcar mascavo vs tempo.



**Figura 6.** Superfícies de resposta da produção de ácido acético durante o processo de fermentação do quefir de água. (A) açúcar mascavo vs pH inicial. (B) tempo vs pH inicial. (C) açúcar mascavo vs tempo.

**A****B****C**

**Figura 7.** Superfícies de resposta da concentração de glicose durante o processo de fermentação do quefir de água. (A) pH inicial vs açúcar mascavo. (B) pH inicial vs tempo. (C) açúcar mascavo vs tempo.

**A****B****C**

**Figura 8.** Superfícies de resposta da concentração de frutose durante o processo de fermentação do quefir de água. (A) açúcar mascavo vs pH inicial. (B) pH inicial vs tempo. (C) açúcar mascavo vs tempo.

As superfícies de resposta mostram que as menores concentrações de etanol e ácido acético ocorreram nos menores tempos de fermentação associados aos maiores valores de pH inicial. Mas os menores consumos de glicose e frutose também ocorreram sob as mesmas condições, indicando baixa taxa fermentativa. Por outro lado, as condições que levaram aos maiores consumos de glicose e frutose também levaram às maiores concentrações de etanol e ácido acético na bebida. Isto sugere que as condições ótimas de fermentação podem se encontrar nos pontos medianos das curvas, visto que, nestes pontos, tanto as concentrações dos carboidratos residuais quanto a concentração de etanol e ácido acético permaneceram equilibradas.

Os valores de etanol reduziram em relação àqueles registrados no segundo delineamento (10 a 30°C), mas não diferiram daqueles registrados para a manutenção (Tabela 17) nem daqueles relatados por Magalhães et al. (2010). As concentrações de ácido acético e carboidratos residuais, no entanto, diminuiram neste experimento em relação à manutenção e ao estudo de Magalhães et al. (2010).

Embora não tivesse sido possível obter uma equação que explicasse a variação do número de células viáveis de leveduras, os dados mostram que algumas condições de fermentação (10 e 15 a 20) aumentaram o número de leveduras na bebida em relação ao experimento anterior (Tabela 17). Vale destacar que nenhuma das condições de fermentação realizadas com a menor (1,0%) e a maior (5,0%) concentração de açúcar mascavo resultou nas mais elevadas contagens de leveduras. As maiores contagens foram registradas para as condições que requereram açúcar mascavo a 3% e pH inicial 5,5. Dentre estas, a condição 10 produziu uma bebida com concentração de ácido acético muito maior do que a média do mesmo metabólito nos pontos centrais. Além disto, a condição 10 requereu um tempo de fermentação muito maior do que aquela requerida nas condições dos pontos centrais. E isto representa maior custo na produção da nova bebida do quefir de água.

A média de células viáveis nos meios dos pontos centrais (condições 15 a 20) foi  $10^5$  vezes maior do que aquela registrada para a manutenção e  $10^8$  vezes maior do que aquela encontrada pela equipe de Magalhães (2010), mas os valores de etanol do primeiro não diferiram dos dois últimos. É possível que

o aumento das leveduras na bebida sem o concomitante aumento de etanol seja consequência do ambiente mais propício que as condições dos pontos centrais geraram para a preservação das células viáveis, um ambiente que pode ter evitado a inibição ou a lise das leveduras antes do término da fermentação, resultando na maior contagem de UFC por mililitro. Embora as condições da manutenção e do estudo de Magalhães et al. (2010) possam ter favorecido a mesma taxa de fermentação alcoólica, o ambiente gerado em cada condição de fermentação pode não ter sido propício para preservar a maioria das células viáveis até o final do tempo de fermentação.

A maioria dos estudos que descreveram as diferentes espécies de bactérias e leveduras no quefir de água restringiram-se aos seus grãos, tendo sido poucos os que analisaram a bebida. Em geral, estes estudos utilizaram as técnicas modernas de identificação e quantificação das espécies microbianas. Embora as técnicas de cultura tradicionais sejam parcialmente seletivas, seu baixo custo permite monitorar a variação do perfil microbiano das diferentes condições de fermentação em um extenso estudo de otimização como este. Dentre os estudos que utilizaram técnicas de culturas convencionais, o de Magalhães et al. (2010) mostrou que uma solução de açúcar mascavo a 5% inoculada com 11% dos grãos do quefir de água e incubada a 25°C por 24 horas apresentou, no tempo zero (T0), uma quantidade de lactobacilos e leveduras na ordem de  $10^6$  e  $10^5$  UFC/g da bebida, respectivamente. Doze horas depois, os números aumentaram para  $10^7$  e  $10^6$  UFC/g de lactobacilos e leveduras, respectivamente, e, 24 horas depois, aumentaram para  $10^8$  e  $10^7$ , respectivamente. Dentre as espécies isoladas, o *Lactobacillus paracasei* (24%) foi o maior representante dos lactobacilos na bebida, seguido pelas espécies *Lactobacillus parabuchneri* (12%) e *Lactobacillus kefir* (10%). Existem relatos de que a última espécie prevalece entre as bactérias lácticas do quefir de leite (Garrote et al. 2001; Chen et al. 2008). Quanto às leveduras, a técnica do PCR-DGGE revelou que as cepas lactose-negativas prevaleceram na bebida, sendo que a *S. cerevisiae* (54%) dominou e mostrou ser o maior representante das leveduras. A mesma técnica mostrou que a espécie fermentadora de lactose *Kluyveromyces lactis* (20%) e a espécie não fermentadora de lactose *Kazachstania aerobia* (15%) também se destacaram na bebida (Magalhães et

al., 2010). Embora a *S. cerevisiae* seja conhecida como sendo superior às espécies não *Saccharomyces* no processo de fermentação alcoólica (Schwan et al., 2001 apud Magalhães et al., 2010), Schwan et al. (2001) descobriram que a utilização de misturas de cepas de ambos os tipos de leveduras na produção de vinho melhorou suas propriedades sensoriais (Minnaar et al., 2017). Além disto, no estudo de Minnaar et al. (2017), algumas misturas de bactérias lácticas e leveduras produziram vinhos com conteúdo de etanol ligeiramente menor do que o vinho fermentado com a *S. cerevisiae* sozinha.

A possibilidade do quefir de água possuir múltiplas origens (Leroi e Pidoux, 1993; Stadie et al., 2013; Fiorda et al., 2017) torna necessário a análise molecular dos fermentados produzidos no presente estudo para levantar as diferentes hipóteses advindas das interações possíveis de ocorrerem entre os Micro-organismos dominantes e explicar as elevadas contagens de células viáveis de leveduras sob algumas condições de fermentação deste terceiro delineamento (28 a 38°C). Leroi e Pidoux (1993) acreditam que a interrelação entre lactobacilos e leveduras influencie significativamente a atividade de diferentes cepas de diversos modos. Os autores mostraram que o aumento do ácido láctico em uma co-cultura envolvendo *Lactobacillus hilgardii* e *S. florentinus* - ambos retirados dos mesmos grãos do quefir - reduziu em 65% o crescimento e a produção de álcool pela *S. florentinus*. Por outro lado, a *S. florentinus* foi capaz de estimular a sobrevivência do *Lactobacillus hilgardii* em um meio pobre em nutrientes, aumentando a produção de ácido láctico em 60%. Os autores acreditam que o estímulo pode ter ocorrido como resultado da disponibilização de glicose e frutose no meio a partir da hidrólise da sacarose pelas leveduras. Compostos liberados pelas leveduras, como CO<sub>2</sub>, piruvato, succinato, propionato e acetato, também podem ter favorecido o *Lactobacillus hilgardii*, segundo Leroi e Pidoux (1993).

Leroi e Pidoux (1993) registraram máximo estímulo dos lactobacilos quando a sacarose foi utilizada como fonte de carbono em comparação com a glicose e a frutose. Estímulos sobre o *Lactobacillus hilgardii* foram observados sob as mais baixas taxas de fermentação e nenhuma inibição da bactéria foi observada até mesmo sob as mais elevadas concentrações de leveduras no meio (Leroi e Pidoux, 1993). Vale notar, no entanto, que outros autores

encontraram inibições causadas por competição por nutrientes (Boidron, 1969) ou por excreção de substâncias inibidoras (King, Beelman, 1986; Lonvaud-Funel, 1986; Lemaesquier, 1987). No nosso estudo, a sacarose foi totalmente consumida em todas as condições de fermentação do terceiro delineamento (28 a 28°C), sugerindo que não somente as leveduras, mas também os lactobacilos aumentaram na bebida como consequência da disponibilização de glicose livre no meio a partir da sacarose. Isto explicaria os valores finais de pH mais ácidos registrados para todas as bebidas produzidas neste delineamento, supostamente advindos do aumento da produção de ácido lático pelos lactobacilos.

Por outro lado, as elevadas contagens de leveduras podem ter ocorrido devido a um crescimento mais acelerado dessas espécies no início da fermentação, quando a sacarose se encontrava em maior concentração no meio e o ácido lático em menor concentração. No estudo de Essia Ngang et al. (1989), o efeito inibitório do ácido lático sobre a *S. cerevisiae* foi parcialmente eliminado quando o inóculo inicial das leveduras foi incrementado. Este achado foi corroborado por Leroi e Pidoux (1993) que encontraram que a inibição da *S. florentinus* pela *Lactobacillus hilgardii* só ocorreu quando a concentração da levedura não excedeu 1%.

Já a equipe de Marsh (2013), que analisou quatro amostras do quefir de água de diferentes países, a saber, uma do Canadá, uma da Inglaterra e duas dos Estados Unidos, encontrou por pirosequenciamento que o gênero mais abundante nos meios fermentados não foi o das *Saccharomyces*, mas o das *Zymomonas*, um gênero que, até então, havia sido encontrado somente nos grãos do quefir de leite em níveis mais baixos (Hsieh et al., 2012; Marsh et al., 2013). *Zymomonas* é um Micro-organismo tradicionalmente associado à fermentação e compõe a população microbiana de várias bebidas fermentadas a partir de plantas tropicais da região da América, África e Ásia (Marsh et al., 2013). É um gênero capaz de produzir etanol em quantidades tão elevadas que compete com as *Saccharomyces* (Panesar et al., 2006). As condições de fermentação do estudo de Marsh et al. (2013) foram as seguintes: uma solução contendo sacarose a 10% e um figo orgânico inteiro foi fermentada com 6% dos grãos do quefir de água a 25°C por 24 horas.

As proporções de *Zymomonas* variaram de 87,0% nos grãos a 49,5% nas bebidas. Já as *Saccharomyces* foram detectadas em níveis tão baixos nos grãos e nas bebidas que foram incluídas no grupo designado “Outros”. Somente o quefir de água originado da Inglaterra revelou a presença da espécie *S. cerevisiae* em uma proporção de 1,3% na bebida (Marsh et al., 2013). Waldherr et al. (2010) também encontraram esta espécie em quantidades bem abaixo do esperado na amostra do quefir de água estudada pela equipe. Isto levou a equipe de Marsh (2013) a levantar a hipótese de que a *S. cerevisiae* pode ter sido sobrestimada nas análises anteriores (Pidoux, 1989; Neve e Heller, 2002; Gulitz et al., 2011). Além disto, ao considerar que a espécie *S. florentinus* não foi detectada no seu estudo e que o gênero *Lactobacillus* se apresentou como maioria (12,0 a 25,4% nos grãos e 23,4 a 38,8% nas bebidas) entre as espécies não *Zymomonas*, Marsh et al. (2013) ainda sugeriram que a *S. cerevisiae* pode não exercer o impacto positivo sobre o crescimento dos lactobacilos segundo foi sugerido nos estudos anteriores (Leroi e Pidoux, 1993; Stadie et al., 2013). Os autores acreditam que outra espécie de levedura possa ter desempenhado essa função nas amostras analisadas por eles (Marsh et al., 2013).

A possibilidade das *Zymomonas* ocorrerem em proporções significativas na bebida do quefir de água torna as espécies desse gênero importantes a serem consideradas no seu potencial probiótico. Estudos mostraram que as espécies desse gênero produzem levana, um polissacarídeo usado como agente espessante com efeito antitumoral (Calazans et al., 1997 apud Marsh et al., 2013; Lyon et al., 2004 apud Marsh et al., 2013), atividade imunoestimulante (Xu et al., 2006 apud Marsh et al., 2013), efeito sobre o metabolismo lipídico (Yamamoto et al., 1999 apud Marsh et al., 2013) e atividade prebiótica (Dal Bello et al., 2001 apud Marsh et al., 2013; Jang et al., 2003 apud Marsh et al., 2013). As *Zymomonas* mostraram ser seguras para o consumo (Azeredo et al., 2010 = marsh) e demonstraram efeito imunomodulador benéfico na proteção de camundongos contra septicemia (Campos et al., 2013 = marsh).

Ainda é importante ressaltar que a *S. cerevisiae* var. *boulardii* é uma das espécies de leveduras sobre a qual se encontra mais informação referente à

sua atividade probiótica, especialmente em animais de criação (Suarez e Guevara, 2018). O fato dessa espécie ser uma cepa da *S. cerevisiae* leva ao questionamento sobre o potencial probiótico de outras cepas da *S. cerevisiae* comumente encontradas em alimentos e bebidas fermentadas (Kuhle et al., 2005). Isto abre a possibilidade de se encontrar, em estudos futuros, efeito probiótico para a nova bebida do quefir de água com maiores contagens de células viáveis de leveduras.

Os dados apresentados no presente estudo mostram que as condições dos pontos centrais propiciam a fabricação de uma nova bebida do quefir de água com baixo conteúdo de ácido acético e carboidratos residuais e elevadas contagens de células viáveis de leveduras em relação àquela estudada pela equipe de Magalhães (2010). Nos pontos centrais, a quantidade de açúcar mascavo utilizada no preparo do meio e o tempo de fermentação ocupam uma posição mediana nos gráficos, resultando em uma relação custo/benefício vantajosa para a produção da nova bebida em alta escala.

O fato de algumas condições terem rendido elevadas contagens de leveduras neste experimento (terceiro delineamento realizado entre 28 e 38°C) em relação ao anterior (segundo delineamento realizado entre 10 a 30°C) sugere que possa haver um intervalo estreito de combinações das três variáveis significativas que possa determinar com maior precisão a região ótima de fabricação da nova bebida do quefir de água com contagens ainda maiores de UFC por mililitro. Assim sendo, nós executamos um quarto delineamento fatorial com o intuito de avaliar os efeitos de níveis mais estreitos das variáveis significativas sobre os parâmetros da bebida.

#### *5.2.4. Quarto Experimento: Estreito*

##### *Temperatura entre 28 a 38°C*

Este experimento consistiu na análise do efeito dos níveis estreitados das variáveis significativas encontradas no terceiro delineamento (28 a 38°C). A concentração do açúcar mascavo foi fixada entre 2 a 4%, o tempo de fermentação, entre 12 a 36 horas, e o valor do pH inicial, entre 5,0 a 6,0. Os resultados obtidos deste último delineamento (Estreitado) são apresentados na Tabela 19. Estes dados foram usados para traçar as superfícies de resposta

com a aplicação das três variáveis supracitadas (Figuras 8, 9, 10 e 11). Os resultados foram obtidos a partir de triplicatas produzidas sob cada condição de fermentação. As condições de fermentação foram estabelecidas de acordo com o programa de planejamento Plackett-Burman e Superfície de Resposta. O modelo de regressão teve sua significância estatística testada pelo teste F e os resultados da regressão foram submetidos à análise de variância (ANOVA).

**Tabela 19:** Quarto delineamento (Estreitado) com 20 condições de fermentação usadas para traçar as superfícies de resposta com a aplicação de três variáveis (açúcar mascavo, tempo e pH inicial), cada uma com cinco níveis, e seus respectivos valores de etanol, ácido acético, glicose, frutose e contagem de células viáveis de leveduras.

Condições	Tempo (h)	pH inicial	Açúcar (%)	Etanol (g/L)	Ác. Acético (g/L)	Glicose (g/L)	Frutose (g/L)	pH final	Leveduras (log UFC/mL)
1	20	5,0	2,0	1,16±0,09	0,13±0,00	5,01±0,34	2,97±0,24	3,61±0,03	14,43±0,03
2	28	5,0	2,0	1,08±0,50	0,36±0,07	3,53±0,91	2,86±0,43	3,28±0,02	14,52±0,03
3	20	6,0	2,0	1,99±0,71	0,17±0,04	18,01±1,09	7,50±0,17	3,72±0,09	11,10±0,07
4	28	6,0	2,0	0,41±0,03	0,18±0,01	6,79±0,91	3,14±0,37	5,54±0,07	15,27±0,04
5	20	5,0	4,0	0,59±0,19	0,25±0,05	15,49±0,48	7,58±0,01	4,05±0,03	14,52±0,09
6	28	5,0	4,0	3,06±0,81	0,33±0,06	9,07±0,04	6,23±0,15	3,62±0,05	14,14±0,17
7	20	6,0	4,0	1,59±0,23	0,25±0,02	14,34±0,35	10,77±0,67	3,70±0,02	13,84±0,19
8	28	6,0	4,0	2,10±0,36	0,63±0,20	11,14±1,29	6,37±0,55	3,21±0,03	19,61±0,11
9	17	5,5	3,0	0,55±0,24	0,12±0,03	10,24±4,15	4,07±1,56	4,35±0,20	12,99±0,52
10	31	5,5	3,0	2,69±0,5	0,68±0,21	6,17±0,55	8,52±0,98	3,26±0,03	16,67±0,12
11	24	4,7	3,0	3,14±0,35	0,18±0,01	13,12±0,54	7,54±0,18	3,46±0,04	14,59±0,07
12	24	6,3	3,0	1,95±0,14	0,45±0,02	9,06±0,50	7,92±0,41	3,66±0,04	15,32±0,11
13	24	5,5	1,3	0,87±0,48	0,16±0,01	7,15±0,51	3,69±0,38	3,65±0,13	13,04±0,11
14	24	5,5	4,7	3,98±0,70	0,32±0,08	19,57±0,59	10,94±0,25	5,54±0,11	10,98±0,41
15	24	5,5	3,0	2,06±0,23	0,36±0,09	13,26±0,37	7,53±0,18	3,43±0,08	15,46±0,02
16	24	5,5	3,0	1,79±0,33	0,33±0,05	13,20±0,47	7,75±0,25	3,45±0,16	16,02±0,08
17	24	5,5	3,0	1,87±0,31	0,34±0,03	13,15±0,46	7,51±0,54	3,48±0,15	15,45±0,01
18	24	5,5	3,0	1,94±0,10	0,36±0,09	13,57±0,15	7,67±0,28	3,48±0,20	15,92±0,52
19	24	5,5	3,0	1,74±0,41	0,31±0,05	13,87±0,70	7,78±0,11	3,52±0,16	15,39±0,10
20	24	5,5	3,0	1,73±0,27	0,28±0,00	13,40±0,31	7,82±0,26	3,58±0,10	15,45±0,22

*Todas as condições de fermentação foram realizadas com 3% dos grãos do quefir de água à 28°C. A sacarose foi totalmente consumida neste experimento.*

A análise de variância (ANOVA) para as equações-respostas estão apresentadas abaixo (Tabela 20). Como era esperado, o conteúdo da sacarose foi totalmente consumido em todas as condições de fermentação geradas no intervalo mais estreito. Neste experimento, foi o valor do pH inicial que exerceu influência significativa ( $p < 0,05$ ) sobre todos os parâmetros da bebida, ao passo que a concentração do açúcar mascavo influenciou a concentração da glicose e do etanol. O tempo de fermentação permaneceu significativo para as concentrações de etanol, ácido acético e glicose.

**Tabela 20.** Análise de variância para as equações-respostas desenvolvidas a partir das concentrações de etanol, ácido acético, glicose e frutose no meio.

<b>Fonte</b>	<b>Etanol (g/L)</b>	<b>Ác. Acético (g/L)</b>	<b>Glicose (g/L)</b>	<b>Frutose (g/L)</b>
Tempo (T)	0,0061	0,0006	0,0031	0,2301
Açúcar mascavo (AM)	0,0225	0,0867	0,0757	0,1146
pH inicial (pH)	0,0021	0,0213	<0,0001	<0,0001
T*AM	0,0164	0,7683	0,3675	0,1057
AM*pH	0,4998	0,1237	0,0203	0,0862
Constante	0,0061	0,0112	0,0020	0,0013

A resposta final que fornece a concentração de etanol ( $R^2 = 0,84$ ) após a remoção dos termos relacionados com as variáveis não significativas ( $p > 0,05$ ) pode ser obtida pela função:

$$\text{Etanol} = -13,41 + 1,84 T - 1,28 \text{ pH} - 2,24 \text{ AM} + 0,06 T \text{ AM}$$

A resposta final que fornece a concentração de ácido acético ( $R^2 = 0,81$ ) após a remoção dos termos relacionados com as variáveis não significativas ( $p > 0,05$ ) pode ser obtida pela função:

$$\text{Ácido acético} = +0,72 - 0,07 T + 0,17 \text{ pH}$$

A resposta final que fornece a concentração de glicose ( $R^2 = 0,87$ ) após a remoção dos termos relacionados com as variáveis não significativas ( $p > 0,05$ ) pode ser obtida pela função:

$$\text{Glicose} = - 83,52 - 0,91 T + 20,72 \text{ pH} - 5,39 \text{ pH AM}$$

A resposta final que fornece a concentração de frutose ( $R^2 = 0,88$ ) após a remoção dos termos relacionados com as variáveis não significativas ( $p > 0,05$ ) pode ser obtida pela função:

$$\text{Frutose} = - 69,34 + 15,58 \text{ pH}$$

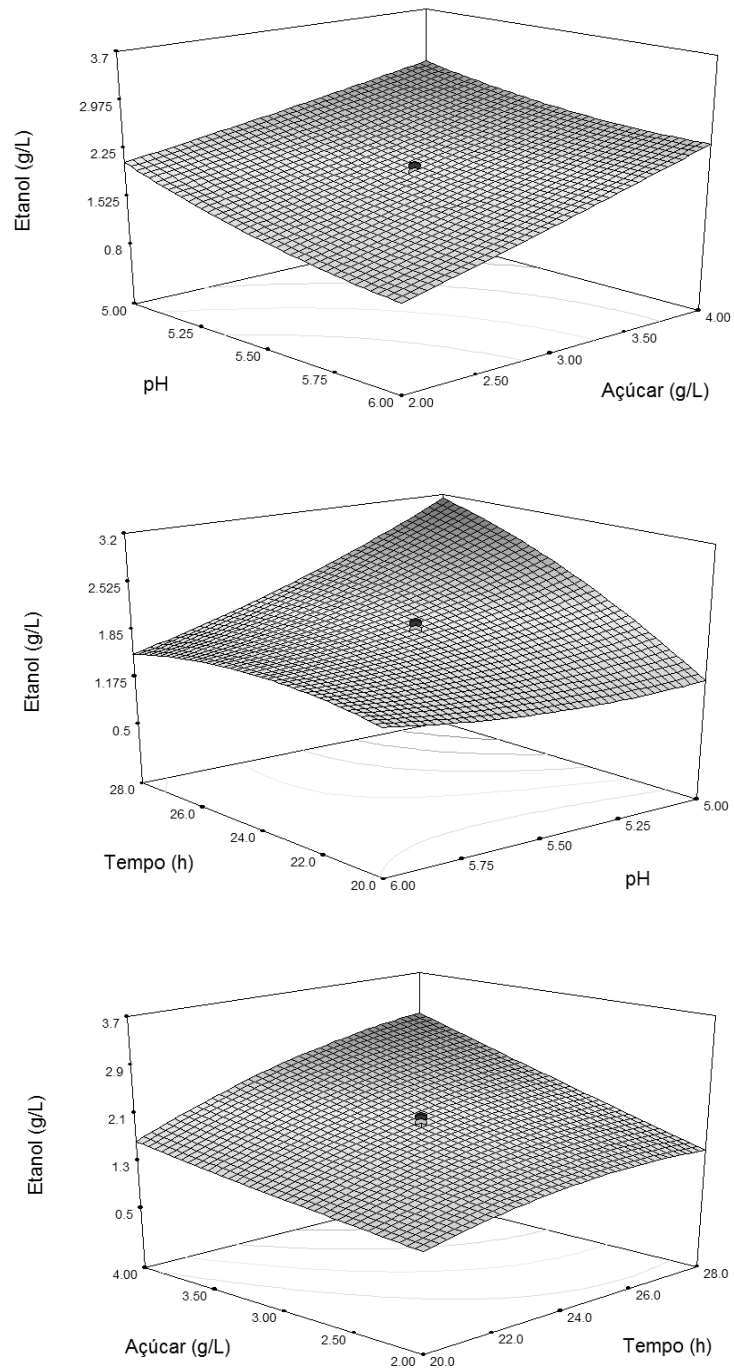
As superfícies de resposta mostram que, nos níveis estreitos, as menores concentrações de etanol e ácido acético foram registradas nas condições com os menores tempos associados aos maiores valores de pH inicial (Figuras 9 e 10). Mas, isto foi resultado do menor consumo de glicose e frutose nas mesmas condições de fermentação (Figuras 11 e 12).

Os valores registrados para o etanol e o ácido acético neste quarto delineamento (entre 28 a 38°C, Estreito) não diferiram daqueles registrados no terceiro delineamento (28 a 38°C), como era esperado. A média da concentração de etanol também não diferiu daquela encontrada por Magalhães et al. (2010). As leveduras são fundamentais na fermentação do quefir de água porque disponibilizam açúcares redutores para os Micro-organismos nos grãos (Leroi e Pidoux, 1993; Stadie et al., 2013). Sua atividade metabólica prevalece na fabricação do meio (Laureys e Vuyst, 2014), o que torna a fermentação alcoólica um processo biológico inevitável. Portanto, tal como os dados sugerem, a redução do etanol abaixo das concentrações registradas neste estudo é um desafio a ser alcançado na produção da nova bebida do quefir de água com maior contagem de células viáveis de leveduras. Sendo assim, mais estudos são necessários para se compreender quais são as variáveis independentes que influenciam exclusivamente os lactobacilos e as leveduras da microbiota do quefir de água e quais são as combinações de ditas variáveis

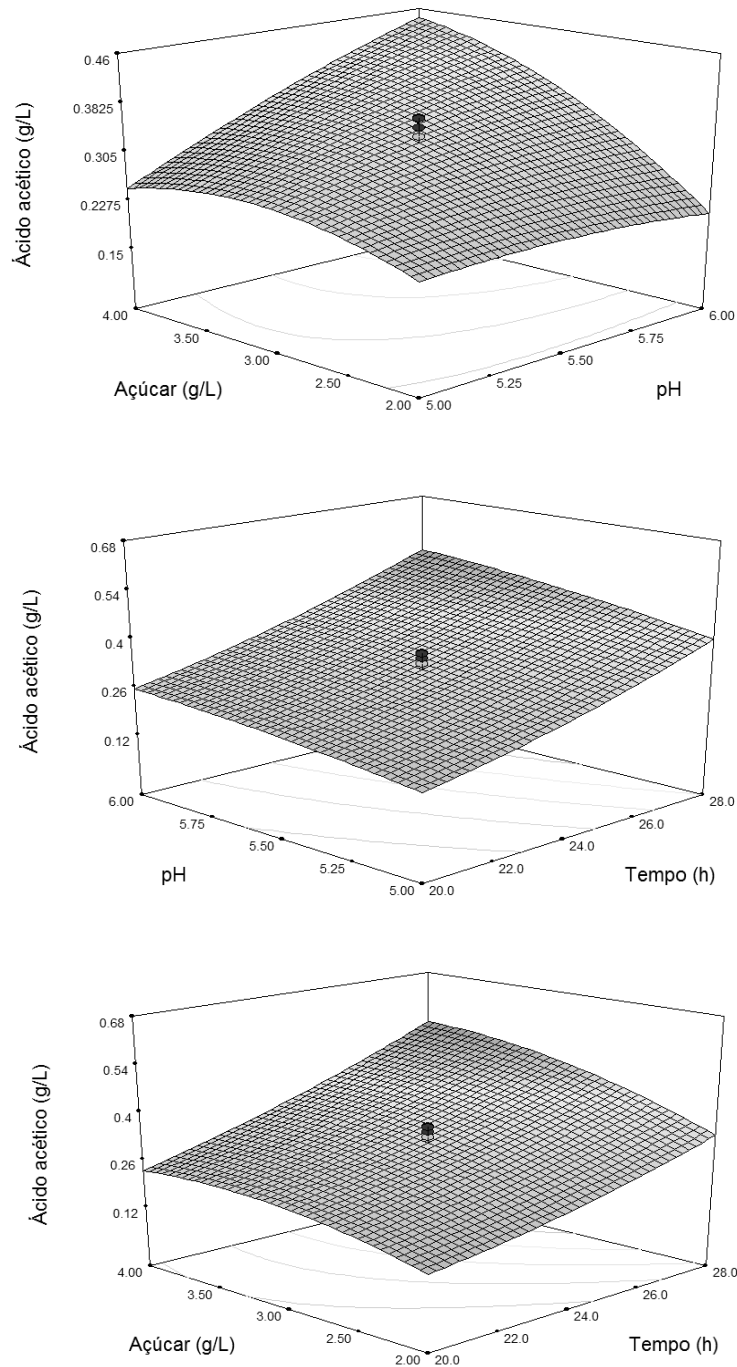
que levam à redução da produção de etanol com o concomitante crescimento dos lactobacilos e das leveduras.

Dentre as condições de fermentação que utilizaram as menores concentrações de açúcar mascavo (condições 1, 2, 3, 4 e 13), a condição 4 produziu uma bebida com contagem de leveduras na mesma ordem que a média dos pontos centrais, mas com menores concentrações de etanol e ácido acético em relação às respectivas médias desses metabólitos nos pontos centrais. No entanto, o tempo de fermentação da condição 4 é maior do que aquele dos pontos centrais, o que pode levar ao maior custo de fabricação da nova bebida do quefir de água. Por outro lado, dentre as condições de fermentação que utilizaram as maiores concentrações de açúcar mascavo (condições 5, 6, 7, 8 e 14), somente a condição 8 resultou em uma contagem de leveduras maior do que a média dos pontos centrais. No entanto, além da condição 8 ter requerido um maior tempo de fermentação, o pH final da bebida foi mais ácido do que aqueles dos pontos centrais, cujo valor estava abaixo do valor crítico (3,3) para o bom crescimento dos grãos (Laureys et al., 2017). Dentre as condições de fermentação que utilizaram o açúcar mascavo na concentração de 3% (condições 9 a 12 e 15 a 20), as condições 10 e 12 apresentaram contagens de leveduras igual ou maior ( $10^{16}$  e  $10^{15}$ , respectivamente) do que a média dos pontos centrais. No entanto, ambas as condições produziram bebidas com concentrações de ácido acético maiores do que a média do mesmo metabólito nos pontos centrais. Além disto, a condição 10 requereu um tempo muito maior de fermentação do que os pontos centrais e a bebida da condição 12 apresentou maior concentração de carboidratos residuais.

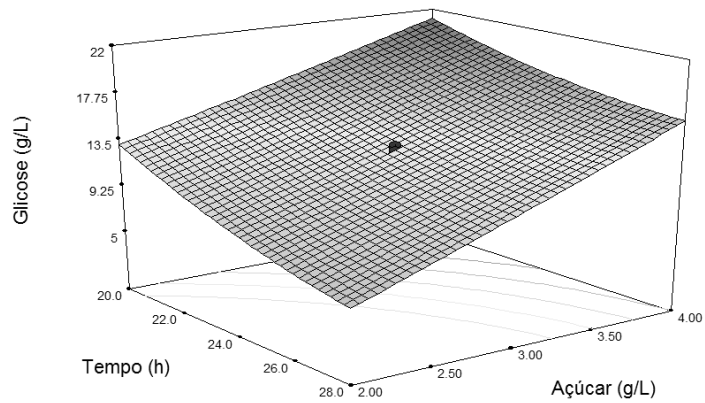
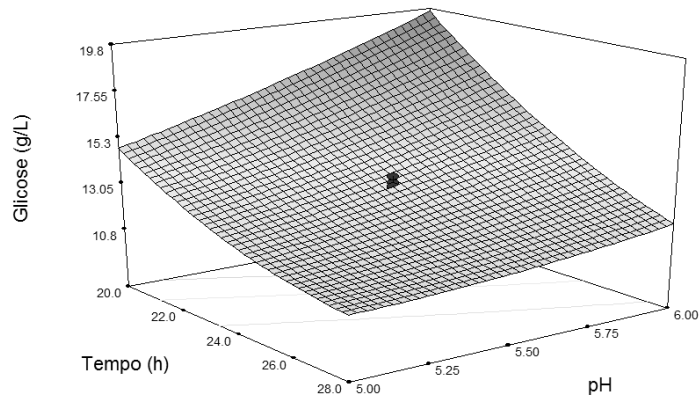
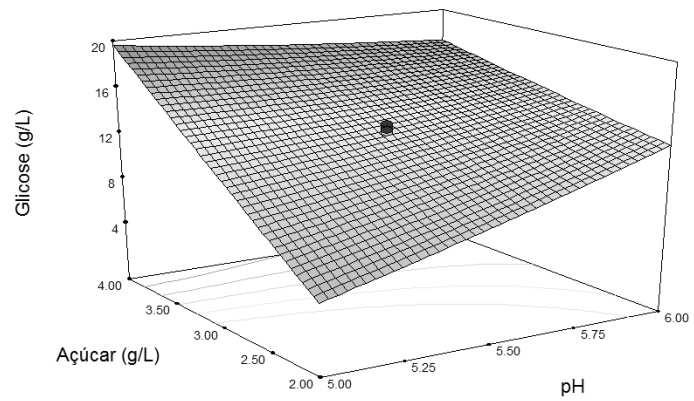
Com base no exposto, os dados obtidos desta experimentação com os limites estreitos das variáveis significativas reforçam os achados do experimento anterior (terceiro delineamento realizado entre 28 a 38°C), de que a região mediana dos gráficos é a região ótima para a produção da nova bebida do quefir de água. Pois é nos pontos centrais que as concentrações de etanol, ácido acético e carboidratos residuais estão equilibradas.



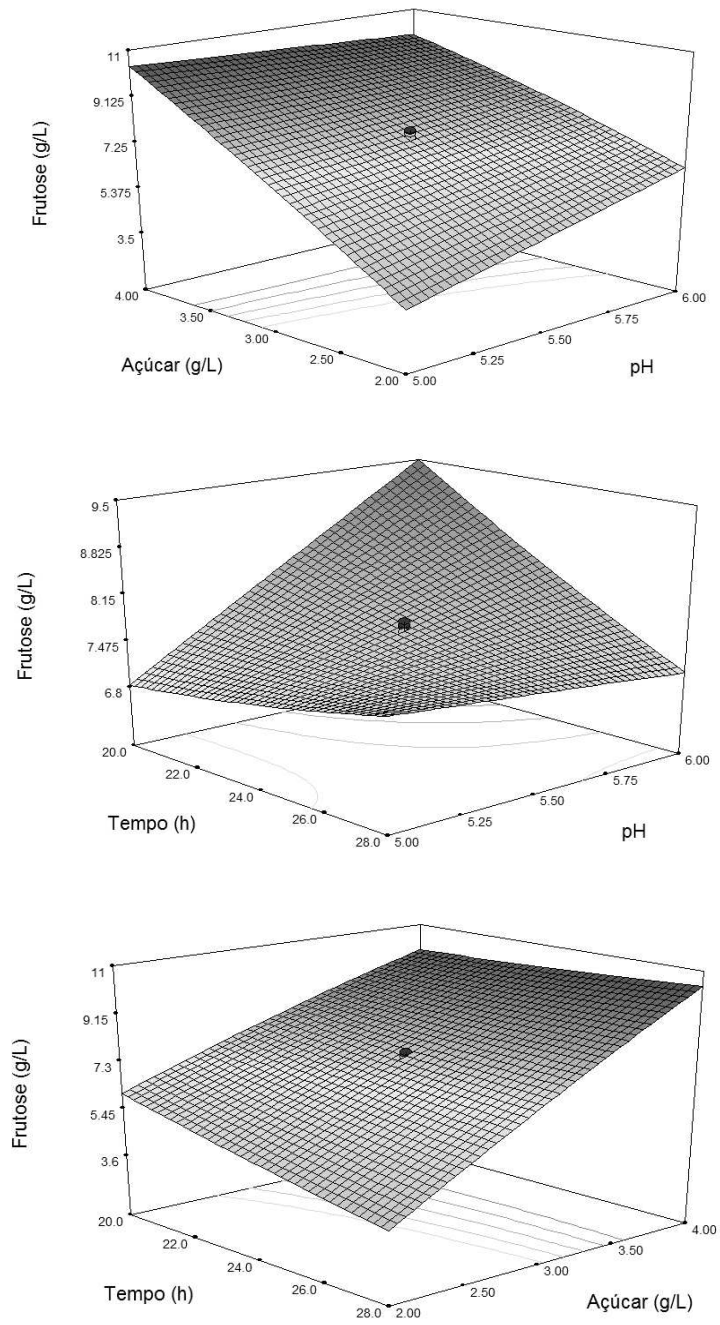
**Figura 9.** Superfícies de resposta da produção de etanol no processo de fermentação do quefir de água. (A) pH inicial vs açúcar mascavo. (B) tempo vs pH inicial. (C) açúcar mascavo vs tempo.



**Figura 10.** Superfícies de resposta da produção de ácido acético no processo de fermentação do quefir de água. (A) açúcar mascavo vs pH inicial. (B) pH inicial vs tempo. (C) açúcar mascavo vs tempo.



**Figura 11.** Superfícies de resposta da concentração de glicose durante o processo de fermentação do quefir de água. (A) açúcar mascavo vs pH inicial. (B) tempo vs pH inicial. (C) tempo vs açúcar mascavo.



**Figura 12.** Superfícies de resposta da concentração de frutose durante o processo de fermentação do quefir de água. (A) açúcar mascavo vs pH inicial. (B) tempo vs pH inicial. (C) tempo vs açúcar mascavo.

Mesmo restringindo os níveis das variáveis, não foi possível obter uma equação para explicar a variação do crescimento das leveduras na fermentação do quefir de água. Todavia, a aplicação dos níveis estreitados proporcionou bebidas com elevadas contagens de células viáveis em todas as condições de fermentação (Tabela 20).

## 6. CONCLUSÕES

Dentre as fontes de carboidrato estudadas, o açúcar mascavo não orgânico é a fonte de carboidrato com a melhor relação custo/benefício para a produção de uma nova bebida do quefir de água com as menores concentrações de ácido acético e carboidratos residuais.

As concentrações de ácido acético e carboidratos residuais podem ser reguladas na bebida do quefir de água por meio das seguintes variáveis independentes: tipo e concentração do açúcar mascavo, temperatura, tempo de fermentação e valor de pH inicial. O etanol não variou sob nenhuma das condições de fermentação realizadas neste estudo.

As diferentes combinações das variáveis que influenciam significativamente as concentrações de ácido acético e carboidratos residuais também levam à maior contagem de células microbianas viáveis na bebida, sendo que as seguintes condições levam à maior contagem de leveduras combinada com as menores concentrações de ácido acético e carboidratos residuais: 2 a 4% de açúcar mascavo em água destilada, valor de pH inicial ajustado entre 5,0 e 6,0 e tempos de fermentação entre 20 a 28 horas à temperatura de 28°C.

Os resultados encontrados neste estudo possibilitaram a criação de um pedido de patente (BR 10 2018 003540 1) que descreve a nova técnica de produção e a nova bebida do quefir de água com menor valor calórico, maior potencial probiótico e maior possibilidade de aceitação pelo consumidor.

Será necessário a realização da análise genômica da comunidade microbiana que prevalece na nova bebida do quefir de água, assim como uma análise mais aprofundada da capacidade probiótica da(s) levedura(s) que a compõe(m). A realização de testes referentes à reprodutibilidade da bebida com grãos de quefir de água de diferentes origens também é *sine qua non*. Além disto, será necessário a realização de teste de segurança do consumo da nova bebida, seguido de teste sensorial para confirmar a sua maior aceitação.

Os passos complementares a este estudo de otimização incluem a análise de transposição de escala para identificar possíveis fatores operacionais que possam afetar o scale-up do produto e apontar as

adaptações necessárias para tornar possível a produção industrial da nova bebida do quefir de água.

## REFERÊNCIAS

1. Alsayadi, M., Al Jawfi, Y., Belarbi, M. Sabri, F.Z. Antioxidant Potency of Water Kefir. *J. Microbiol. Biotech. Food Sci.* 2013. 2 (6) 2444-2447.
2. Beijerinck, M.W. Sur le kefir. *Archives Nierlandaises des Sciences Exactes et Naturelles.* Haarlem. Volume 23. 1889. Pages: 248-258.
3. Bergmann, R.S.O., Pereira, M.A., Veiga, S.M.O.M., Schneedorf, J.M., Oliveira, N.M.S., Fiorini, J.E. Microbial profile of a kefir sample preparations: grains in natura and lyophilized and fermented suspension. *Ciência e Tecnologia de Alimentos.* 2010. 30 (4) 1022–1026.
4. Beshkova, D.M., Simova, E.D.; Frengova, G.I.; Simov, Z.I.; Dimitrov, Z.H.O. 2003. Production of volatile aroma compounds by kefir starter cultures. *Int Dairy J.* Volume 13. Pages 529–535.
5. Blateryon, L.; Sabalayrolles, J.M. Stuck and slow fermentations in enology: statistical study of causes and effectiveness of combined additions of oxygen and diammonium phosphate. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 2001. 91 (2) 184-189.
6. Boidron, A.M. Contribution a l'étude de l'antagonisme entre les levures et les bactéries lactiques du vin. These de 3eme cycle, Universitk de Bordeaux, France. 1969b.
7. Boidron, A.M. Etude de l'antagonisme entre les levures et la bactiries lactiques du vin. *Connaissance Vigne Vin.* 1969b. 3(2), 315- 378.
8. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 46 de 23 de outubro de 2007.
9. Cassanego, D.N., Richards, N.S.P.S., Mazutti, M.A., Ramírez-Castrillón, M. Leveduras: diversidade em kefir, potencial probiótico e possível aplicação em sorvete. *Ciência e Natura, Santa Maria, v.37, Ed. Especial-Nano e Microencapsulação de compostos bioativos e probióticos em alimentos.* 2015. Pages: 175 – 186.

10. Daker, W.D.; Stacey, M. Investigation of a polysaccharide produce from sucrose by *Betabacterium vermforme* (Ward-Meyer). Journal of Biochemistry. Volume 32. 1938. Pages: 1946-1948.
11. Diniz, R.O., Perazzo, F.F., Carvalho, J.C.T., Schneedorf, J.M. Atividade antiinflamatória de quefir, um probiótico da medicina popular. Revista Brasileira de Farmacognosia. Volume 13. 2003. Pages 19–21.
12. Diosma, G., Romanin, D.E., Rey-Burusco, M.F., Londero, A., Garrote, G.L. Yeasts from kefir grains: isolation, identification, and probiotic characterization. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2013.
13. Essia Ngang, J.J., Letourneau, F., Wolniewicz, E., Villa, P. Inhibition of beet molasses alcoholic fermentation by lactobacilli. Applied Microbiology and Biotechnology. Volume 33. 1990. Pages 49G 493.
14. Farnworth, E., 2005. Kefir is a complex probiotic. Food Science and Technology. Volume 2. 2005. Pages 1-17.
15. Feuillat, M., Bidan, P.; Rosier, Y. Croissance des bactiries lactiques i partir des principaux constituants azotes du vin. Annales de Technologie Agricole. Volume 26. 1977. Pages 435-444.
16. Fiorda, F.A., Pereira, G.V.M., Thomaz-Soccol, V., Rakshit, S.K., Soccol, C.R. Evaluation of a potentially probiotic non-dairy beverage developed with honey and kefir grains: Fermentation kinetics and storage study. Food Science and Technology International. 16 May. 2016a. 0 (0) 1-11.
17. Fiorda, F.A., Melob, G.V., Thomaz-Soccolb, V., Medeirosb, A.P., Rakshitc, S.K., Soccol, C.R. Development of kefir-based probiotic beverages with DNA protection and antioxidant activities using soybean hydrolyzed extract, colostrum and honey. LWT-Food Science and Technology. 2016b.
18. Fiorda, F.A., Pereira, G.V.M., Thomaz, V. Microbiological, biochemical, and functional aspects of sugary kefir fermentation - A review. Food Microbiology. 7 April. 2017.

19. Fleet, G.H., Balia, R. Yeasts in Food and Beverages: The Public Health and Probiotic Significance of Yeasts in Foods and Beverages. Germany: Springer, 2006. 381 p.
20. Franzetti, L., Galli, A., Pagani, M.A., De Noni I. Microbiological and chemical investigations on "sugar kefir" drink. *Ann. Microbiol. Enzimol.* Volume 48. 1998. Pages: 76-80.
21. Garrote, G.L., Abraham, A.G., Antoni, G.L. Chemical and microbiological characterization of kefir grains. *Journal of Dairy Research.* Volume 68. 2001. Pages: 639-652.
22. Granato, D., Branco, G.F., Nazzaro, F., Cruz, A.G., Faria, J.A.F. Functional Foods and Nondairy Probiotic Food Development: Trends, Concepts, and Products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.* Volume 9. 2010.
23. Gultiz, A., Stadie, J., Wenning, M., Wenningb, M., Ehrmanna, M.A., Vogelaet, R.F. The microbial diversity of water kefir. *International J. Food Microbiol.* Volume 151. 2011. Pages: 284–288.
24. Hsieh, H.H., Wang, S.Y., Chen, T.L., Huang, Y.L., Chen, M.J. Effects of cow's and goat's milk as fermentation media on the microbial ecology of sugary kefir grains. *International Journal of Food Microbiology.* Volume 157. 2012. Pages 73-81.
25. Ikram-UI-Haq, A.S. Kinetics of invertase production by *Saccharomyces cerevisiae* in batch cultures. *Pakistan Journal of Botany.* Volume 39. 2007. Pages 907–912.
26. Kandylis, P., Pissaridi, K., Bekatorou, A., Kanellaki, M., Koutinas, A.A. Dairy and non-dairy probiotic beverages. *Current Opinion in Food Science.* Volume 7. 2016. Pages: 58-63.
27. Kleber, L.F. California bees (gingerbeer plant). *Journal of American Pharmaceutical Association.* Volume 12. 1921. Pages: 939-940.
28. Kuhle, A.A, Skovgaard, K., Jespersen, L. In vitro screening of probiotic

- properties of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* and food-borne *Saccharomyces cerevisiae* strains. International Journal of Food Microbiology. Volume 101. 2005. Pages 29-39.
- 29.Kumar, B.V., Vijayendra, S.V.N., Reddy, O.V.S. Trends in dairy and non-dairy probiotic products – a review. 13 March. 2015.
- 30.Laureys, D., De Vuyst, L. Microbial Species Diversity, Community Dynamics, and Metabolite Kinetics of Water Kefir Fermentation. Applied and Environmental Microbiology. 2014a. 80 (8) 2564–2572.
- 31.Laureys, D., Jean, A.V., Dumont, J., De Vuyst, L. Investigation of the instability and low water kefir grain growth during an industrial water kefir fermentation process. Appl Microbiol Biotechnol, 9 January. 2017.
- 32.Leroi, F.; Pidoux, M. Detection of interactions between yeasts and lactic acid bacteria isolated from sugary kefir grains. Journal of Applied Bacteriology. Volume 74. 1993. Pages: 40-53.
- 33.Lonvaud-Funel, A., Mascler, J.P., Joyeux, A., Paraskevopoulos, Y. Etudes des interacciones entre levures et bactéries lactiques dans le mount de raisin. Connaissance Vigne Vin. 1988. 22 (1) 11-24.
- 34.Lutz, L. Recherches biologiques sur la constitution du Tibi. Bulletin de la Sociiti Mycologique de France. Volume 15. 1899. Pages: 68-72.
- 35.Magalhães, K.T., Pereira, G.V.M., Dias, D.R.; Schwan, R.F. Microbial communities and chemical changes during fermentation of sugary Brazilian kefir. World J. Microbiol. Biotechnol. Volume 26. 2010. Pages: 1241–1250.
- 36.Makinen, O.E., Wanhalinnab, V., Zannini, E., Arendt, E.K. Foods for Special Dietary Needs: Non-Dairy Plant Based Milk Substitutes and Fermented Dairy Type Products. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 19 Januray. 2015.
- 37.Marchini, L.C., Moretti, A.C.C.C., Otsuk, I.P. Análise de agrupamento, com base na composição físico-química, de amostras de méis

- produzidos por *Apis 72elífera* L. no Estado de São Paulo. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 2005. 25 (1) 8-17.
- 38.Marsh, A.J., O'sullivan, O., Hill, C. Sequence-based analysis of the microbial composition of water kefir from multiple sources. *FEMS Microbiol. Lett.* 2013. Pages: 1–7.
- 39.Miguel, MG.C.P., Cardoso, P.G, Magalhães, K.T. Profile of microbial communities present in tibico (sugary kefir) grains from different Brazilian States. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2011. 27 (8) 1875-1884.
- 40.Minaar, P.P., Plessis, H.W., Paulsen, V., Ntushelo, N., Jolly, N.P., Toit, M. *Saccharomyces cerevisiae*, Non-*Saccharomyces* Yeasts and Lactic Acid Bacteria in Sequential Fermentations: Effect on Phenolics and Sensory Attributes of South African Syrah Wines. *South African Journal for Enology. And Viticulture*. 2017. 38 (2).
- 41.Moinas, M., Horisberger, M., Bauer, H. The Structural Organization of the Tibi Grain as Revealed by Light, Scanning and Transmission Microscopy. *Arch. Microbiol.* Volume 128. 1980. Pages: 157-161.
- 42.Morrissey, W.F., Davenport, B., Querol, A., Dobson, A.D.W. The role of indigenous yeasts in traditional Irish cider fermentations. *Journal of Applied Microbiology*. 2004. 97 (3) 647–655.
- 43.Noda, F., Hayashi, K. and Mizunuma, T. Antagonism between osmophilic lactic acid bacteria and yeasts in brine fermentation of soy sauce. *Applied and Environmental Microbiology*. Volume 40. 1980. Pages 452-457.
- 44.Oliveira, F.M., Lyra, I.N., Esteves, G.S.G. Avaliação microbiológica e físico-química de iogurtes de morango industrializados e comercializados no município de Linhares. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*. 2013. 15 (2) 147-155.
- 45.Paiva, I.M., Steinberg, R.S., Lula, I. S., Souza-Fagundes, E.M., Mendes,

- T.O., Bell, M.J.V., Nicoli, J.R., Nunes, A.C., Neumann, E. *Lactobacillus kefiranofaciens* and *Lactobacillus satsumensis* isolated from Brazilian kefir grains produce alpha-glucans that are potentially suitable for food application. *Food Science and Technology*. Volume 72. 2016. Pages: 390-398.
46. Pidoux, M. The microbial flora of sugary kefir grain (the gingerbeer plant): biosynthesis of the grain from *Lactobacillus hilgardii* producing a polysaccharide gel. *MIRCEN Journal*. Volume 5. 1989. Pages: 223-238.
47. Puerari, C., Magalhães, K.T., Schwan, R.F. New cocoa pulp-based kefir beverages: Microbiological, chemical composition and sensory analysis. *Food Research International*. Volume 48. 2012. Pages: 634-640.
48. Querol, A.; Fleet, G. *Yeasts in food and Beverages*. Springer. 2006.
49. Randazzo, W., Corona, O., Guarcello, R., Francesca, N., Germanà, M. A., Erten, H., Moschetti, G., Settanni, L. Development of new non-dairy beverages from Mediterranean fruit juice fermented with water kefir microorganisms. *Food Microbiology*. Volume 54. 2016. Pages: 40-51.
50. Reib, J. Metabolic activity of Tibi grains. *Z Lebensm Unters Forsch*. Volume 191. 1990. Pages: 462-465.
51. Rubio, M.T., Lappe, P., Wachter, C., Ulloa, M. Microbial and biochemical studies of the fermentation of sugary solutions inoculated with tibi grains. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. Volume 35. 1993. Pages 19-31.
52. Schneedorf, J.M. Kefir D'Aqua and Its Probiotic Properties, *Probiotic in Animals*, Prof. Everlon Rigobelo (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/50053. 2012. Available from: <https://www.intechopen.com/books/probiotic-in-animals/kefir-d-aqua-and-its-probiotic-properties>
53. Sengun, I.Y., Karabiyikli, S. Importance of acetic acid bacteria in food industry. *Food Control*. 2011 22 (5) 647–656.
54. Soarez, C., Guevara, C.A. Probiotic Use of Yeast *Saccharomyces*

- Cerevisiae in Animal Feed. Research Journal of Zoology. 2018 1 (1).
- 55.Souza, R.B., Menezes, J.A.S., Souza, R.F.R., Dutra, E.D., Moraes, M.A. Mineral Composition of the Sugarcane Juice and Its Influence on the Ethanol Fermentation. Applied Biochemistry and Biotechnology. Volume 175. 2015. Pages 209-222.
- 56.Stadie, J., Gulitz, A., Ehrmann, A. Voguel, R.F. Metabolic activity and symbiotic interactions of lactic acid bacteria and yeasts isolated from water kefir. Food Microbiol. Volume 35. 2013. Pages: 92-98.
- 57.Stamer, J.R. The lactic acid bacteria: microbes of diversity. Food Technology. Volume 33. 1979. Pages: 60-65.
- 58.Steinkraus, K.H., Morse, R.A. Factors influencing the fermentation of honey in mead production. Journal of Apicultural Research. 1966. 5 (1) 17-26.
- 59.Swings, J., Ley, J. The Biology of *Zymomonas*. American Society for Microbiology. Bacteriological Reviews. 1977. Pages 1-46.
- 60.Vuyst, L., Neysens, P. The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. Trends in Food Science & Technology. 2005. 16 (1-3) 43-56.
- 61.Waldherr, F.W., Doll, V.M., Meibner, D. Identification and characterization of a glucan-producing enzyme from *Lactobacillus hilgardii* TMW 1.828 involved in granule formation of water kefir. Food Microbiology. Volume 27. 2010. Pages: 672-678.
- 62.Wood, B.J.B., Hodge, M.M. Yeast-lactic acid bacteria interaction and their contribution to fermented foodstuffs. In Microbiology of Fermented Foods. Ed. Wood, B.J.B. Vol. I. 1985. Pp. 263-293. London: Elsevier Applied Science.
- 63.XIII Congresso Brasileiro de Custos. 2006. Belo Horizonte. Disponível em < <https://anaiscbc.emnuvens.com.br/anais/article/view/1726> >. Acesso em 25 de abril de 2018.

64. Zajsek, K., Gorsek, A. Mathematical modeling of ethanol production by mixed kefir grains yeast population as a function of temperature variations. *Biochemical Engineering Journal*. 2010. 49 (1) 7-12.

## ANEXO

**Tabela 21:** Micro-organismos isolados dos grãos do quefir de água e leite

Grupo microbiológico	Gênero	Quefir de água	Quefir de leite	Referências
<b>Bactérias</b>	<i>Acetobacter</i>	<i>A. fabarium</i> , <i>A. orientalis</i> , <i>A. lovaniensis</i>	<i>A. fabarium</i> , <i>A. orientalis</i> , <i>A. lovaniensis</i> , <i>Acetobacter aceti</i> , <i>A. rasens</i>	Laureys et al. (2016); Gulitz et al. (2013); Gulitz et al. (2011); Garofalo et al. (2015); Magalhães et al. (2010)
	<i>Lactobacillus</i>	<i>L. brevis</i> , <i>L. buchneri</i> , <i>L. casei subsp. casei</i> , <i>L. casei subsp. rhamnosus</i> , <i>L. diolivorans</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. harbinensis</i> , <i>L. hilgardii</i> , <i>L. hordeii</i> , <i>L. kefiranofaciens</i> , <i>L. kefiri</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. mali</i> , <i>L. nagelli</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. parafarraginis</i> , <i>L. perolens</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. satsumensis</i>	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. buchneri</i> , <i>L. casei subsp. pseudopantarum</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. kefiranofaciens</i> , <i>L. kefiri</i> , <i>L. otakiensis</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. parabuchneri</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. sake</i> , <i>L. sunkii</i>	Moinas et al. (1980); Pidoux (1989); Galli et al. (1995); Garrote et al. (2001); Simova et al. (2002); Witthuhn et al. (2005); Chen et al. (2008); Magalhães et al. (2010); Sabir et al. (2010); Gulitz et al. (2011); Kesmen and Kacmaz (2011); Gulitz et al. (2013); Garofalo et al. (2015); Zanirati et al. (2015); Fiorda et al. (2016 <sup>a</sup> ); Laureys et al. (2016)

	<i>Leuconostoc</i>	<i>L. citreum, L. mesenteroides</i>	<i>L. mesenteroides</i>	Garrote et al. (2001); Magalhães et al. (2010); Sabir et al. (2010); Waldherr (2010); Gulitz et al (2011); Kesmen and Kacmaz (2011); Gulitz et al. (2013); Fiorda et al. (2016 <sup>a</sup> )
	<i>Lactococcus</i>	nd	<i>L. cremoris, L. lactis, L. raffinolactis</i>	Yuksekdag et al. (2004); Kesmen and Kacmaz (2011); Magalhaes et al. (2011a); Sabir et al. (2010); Garofalo et al. (2015)
	<i>Pediococcus</i>	nd	<i>P. acidilactici, P. dextrinicus, P. pentosaceus</i>	Sabir et al. (2010)
	<i>Streptococcus</i>	nd	<i>S. durans, S. thermophilu</i>	Simova et al. (2002); Yuksekdag et al. (2004); Chen et al. (2008); Kesmen and Kacmaz (2011); Garofalo et al. (2015)
	Outras espécies	<i>Lysinibacillus sphaericus, Oenococcus kitaharae, Bifidobacterium psychraerophilum</i>	nd	Gulitz et al, 2013; Fiorda et al. (2016 <sup>a</sup> ); Zanirati et al. (2015)
<b>Leveduras</b>	<i>Candida</i>	nd	<i>C. inconspicua, C. kefir, C. krusei, C. lambica, C. maris, C. humilis</i>	Simova et al. (2002); Witthuhn et al. (2005); Garofalo et al. (2015)

	<i>Saccharomyces</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae, S. turicensis</i>	Simova et al. (2002); Wang et al (2008); Magalhães et al. (2010); Puerari et al. (2012); Gulitz et al. (2013); Garofalo et al. (2015); Fiorda et al. (2016 <sup>a</sup> ), Laureys et al. (2016)
	<i>Pichia</i>	<i>P. membranifaciens, P. kudriavzevii</i>	<i>P. fermentans</i>	Wang et al. (2008); Fiorda et al. (2016 <sup>a</sup> )
	<i>Lanchancea</i>	<i>L. fermentati, L. meyericii</i>	<i>L. meyericii</i>	Magalhães et al. (2011 <sup>a</sup> ); Magalhães et al. (2010); Gulitz et al. (2011); Fiorda et al. (2016 <sup>a</sup> )
	<i>Kluyveromyces</i>	<i>K. lactis, K. marxianus</i>	<i>K. lactis</i>	Garrote et al. (2001); Wang et al. (2008); Magalhães et al. (2010); Magalhaes et al. (2011 <sup>a</sup> ); Puerari et al. (2012)
	<i>Kazachstania</i>	<i>K. aerobia, K. unispora</i>	<i>K. unispora, K. servazzii, K. aerobia, K. solicola</i>	Magalhães et al. (2010); Puerari et al. (2012); Garofalo et al. (2015)
	<i>Hanseniaspora</i>	<i>H. valbyensis, H. uvarum</i>	<i>H. guillermondi</i>	Gulitz et al. (2011); Garofalo et al. (2015); Fiorda et al. (2016 <sup>a</sup> )
	Outras espécies	<i>Zygotrulaspora florentina, Issatchenkia orientalis, Zygosaccharomyces fermentati, Dekkera bruxellensis</i>	<i>Cryptococcus humicolus, Geotrichum candidium, Zygosaccharomyces fermentati</i>	Witthuhn et al. (2005); Gulitz et al. (2011); Fiorda et al. (2016 <sup>a</sup> ), Laureys et al. (2016)

Fonte: Fiorda, F.A., Pereira, G.V.M., Thomaz, V. Microbiological, biochemical, and functional aspects of sugary kefir fermentation - A review. Food Microbiology. 7 April. 2017.