UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS DE LARANJEIRAS DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PPGCTAL

VANESSA ALVES

DESENVOLVIMENTO DE BEBIDA FERMENTADA COM KEFIR DE ÁGUA EM EXTRATO VEGETAL HIDROSSOLÚVEL DE COCO (*Cocos nucifera* L.) COM ADIÇÃO DE INULINA

LARANJEIRAS DO SUL - PR
2020

VANESSA ALVES

DESENVOLVIMENTO DE BEBIDA FERMENTADA COM KEFIR DE ÁGUA EM EXTRATO VEGETAL HIDROSSOLÚVEL DE COCO (*Cocos nucifera* L.) COM ADIÇÃO DE INULINA

Dissertação apresentada a Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, *Stricto sensu*, como requisito à obtenção do título de Mestra em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador (a): Prof.ª Dr.ª Helen Treichel
Coorientador (a): Prof.ª Dr.ª Larissa Canhadas Bertan
Coorientador: Prof. Dr. Rafael Resende Maldonado

LARANJEIRAS DO SUL - PR
2020

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Alves, Vanessa
DESENVOLVIMENTO DE BEBIDA FERMENTADA COM KEFIR DE ÁGUA EM EXTRATO VEGETAL HIDROSSOLÚVEL DE COCO (Cocos Nucifera L.) COM ADIÇÃO DE INULINA / Vanessa Alves. -- 2020.
87 f.:il.

Orientadora: Dr.ª Helen Treichel
Coorientadores: Dr.ª Larissa Canhadas Bertan, Dr. Rafael Resende Maldonado
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Laranjeiras do Sul, PR, 2020.

I. Treichel, Helen, orient. II. Bertan, Larissa Canhadas, co-orient. III. Maldonado, Rafael Resende, co-orient. IV. Universidade Federal da Fronteira Sul. V. Título.

Elaborada pelo sistema de Geração Automática de Ficha de Identificação da Obra pela UFFS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

VANESSA ALVES

DESENVOLVIMENTO DE BEBIDA FERMENTADA COM KEFIR DE ÁGUA EM EXTRATO VEGETAL HIDROSSOLÚVEL DE COCO (*Cocos nucifera L.*) COM ADIÇÃO DE INULINA

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação *Stricto sensu,* da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS, para obtenção do título de Mestra em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Esta Dissertação de Mestrado foi defendida e aprovada pela banca em:

10/09/2020

BANCA EXAMINADORA

Prof.ª Dra. Helen Treichel
(UFFS/*Campus* Erechim-RS – presidente/orientadora)

Prof. Dr. Rafael Resende Maldonado
(COTUCA/UNICAMP/Campinas-SP – coorientador)

Prof.ª Dra. Larissa Canhadas Bertan
(UFFS/*Campus* Laranjeiras do Sul-PR – coorientadora

Prof.ª Dra. Eliana Setsuko Kamimura
(USP/*Campus* Pirassununga-SP – 1º membro)

Prof. Dr. João Paulo Bender
(UFFS/*Campus* Chapecó-SC (UFFS – 2º membro)

Prof.ª Dra. Cátia Tavares dos Passos Francisco
(UFFS/*Campus* Laranjeiras do Sul-PR – suplente)

"Em função da Pandemia do Coronavírus e as medidas de afastamento tomadas pela UFFS, esta Folha de Aprovação foi assinada pelo Presidente da Banca, como representante dos demais membros".

“Você sabe como é viver “dois, mas não dois”.
A não dualidade. Tem a ver com unidade, com
coisas que parecem separadas, mas que na
verdade sempre estiveram interligadas”.
Sara Pennypacker - Pax.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Miroslava Onyszko Alves e Jonas Salvador Alves, por todo o apoio em minha jornada, ensinando-me a persistir em meus sonhos e objetivos.

Aos meus irmãos Vandressa Alves e Edivando Alves pelo incentivo, companheirismo e força. Vocês são meus exemplos de persistência e dedicação.

À Prof.ª Dr.ª Helen Treichel pela orientação, apoio, dedicação, ensinamentos e suporte para a realização deste trabalho.

À Prof.ª Dr.ª Larissa Canhadas Bertan pela oportunidade de realizar este trabalho e pelo incentivo às mudanças.

Ao Prof. Dr. Rafael Resende Maldonado que se dispôs a transmitir seus conhecimentos e dar suporte ao longo deste trabalho.

À Larissa De Bona Gambin, Jéssica de Sales Silva e Rubia Viana Batista pela amizade, carinho e apoio durante o Mestrado.

À toda equipe do Laboratório de Microbiologia e Bioprocessos (LAMIBI) de Erechim-RS, pelo acolhimento e disposição na realização deste trabalho.

Aos alunos de Iniciação Cientifica Eliane Pompeu de Jesus e Luan Gabriel Techi Diniz, pela ajuda e disposição no desenvolvimento deste trabalho.

À CAPES pela bolsa concedida.

Por fim, agradeço a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO

A utilização de extratos hidrossolúveis de vegetais (“leites vegetais”), tem se tornado uma opção viável de substrato não lácteo para o desenvolvimento de novos produtos alimentícios, como na produção de bebidas fermentadas de kefir. Além de se destacarem por não conterem ingredientes de origem animal, auxiliam em fatores fisiológicos como a intolerância a lactose e/ou alergia à proteína do leite e, também como opção alimentar para vegetarianos e/ou veganos. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de uma bebida vegana fermentada com grãos de kefir de água no substrato de extrato vegetal hidrossolúvel de coco (EVHC), com adição de inulina. Os grãos de kefir de água (5% m/m) foram adaptados no substrato do EVHC com diferentes concentrações de inulina, goma xantana e açúcar de coco em temperatura de 25 ± 1 °C. As formulações das bebidas fermentadas foram determinadas por meio de um delineamento composto central (DCC) 2^3, totalizando 11 ensaios (F1 a F11). As variáveis independentes do DCC foram concentrações de açúcar de coco (2,0; 6,0 e 10,0%); inulina (2,0; 2,5 e 3,0%) e goma xantana (0,0; 0,13 e 0,26%) e as variáveis dependentes foram crescimento celular dos grãos de kefir, rendimento da bebida fermentada e produção de ácido láctico. As formulações também foram analisadas quanto aos valores de pH, sólidos solúveis (SS) e produção de CO_2 nos tempos 0, 24 e 48 horas de fermentação. A partir da aplicação de uma análise de componentes principais (ACP) foi observado que as F3 e F6 foram as formulações que mais se correlacionaram inversamente entre si e em relação as demais, com acidez de 0,68 e 0,88g/100mL de ácido láctico, pH entre 4,5 e 4,8, produção de CO_2 de 8,2 a 16,81% e SS de 6,69 e 7,40 ºBrix, em 24 horas de fermentação. Assim, estas foram analisadas de forma independente quanto à caracterização físico-química, composição de açúcares, compostos orgânicos e atividade enzimática. Quanto ao delineamento fatorial a adição de açúcar de coco, inulina e goma xantana apresentaram resultados estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$) quando analisadas como variáveis independentes ou com interações entre si, na bebida fermentada de kefir no EVHC. Ainda, a partir dos dados da Análise de Variância (ANOVA), pôde-se observar que o modelo de regressão, para o crescimento celular dos grãos de kefir, rendimento da bebida fermentada e produção de ácido láctico, foi estatisticamente significativo em um nível de confiança de 95%, com coeficientes de determinação (R^2) iguais a 98,46%, 91,68% e 83,00%, respectivamente. A taxa de crescimento celular dos grãos foi maior quando as concentrações de inulina ficaram próximas a 2,8 e 3,0% e com concentrações de até 0,15% de goma xantana, obtendo taxa de crescimento de até 90%. O rendimento e a produção de ácido láctico da bebida fermentada de kefir ficaram entre 80 a 82,5% e 1,2 a 1,25%, respectivamente, quando as concentrações de goma xantana e açúcar de coco aumentaram entre 0,26% e 10,0%. Conforme a identificação dos microrganismos, houve maior prevalência das leveduras em relação as bactérias, isso pode ter ocorrido devido às altas concentrações de açúcares disponíveis no substrato de EVHC e pela adição de inulina. Referente às concentrações de açúcares e compostos orgânicos, nas F3 e F6, a metabolização dos açúcares foi direcionada principalmente para a produção de etanol e ácido acético. Ainda, foi possível observar maior atividade enzimática de amilase e peroxidase para a F6 e de inulinase para a F3, devido ao fato desta formulação conter maiores concentrações de inulina. Referente à composição centesimal, as F3 e F6 fermentadas com o kefir apresentaram maiores teores de lipídeos (2,84 e 3,26 g/100g) e proteínas (0,95 e 0,84 g/100g) e menores valores energéticos (50,54 e 79,00 kcal), quando comparadas ao EVHC sem fermentar, indicando que o processo fermentativo teve efeito significativo quanto aos valores nutricionais. Todas as formulações avaliadas apresentaram altos teores de umidade e baixos valores de carboidratos. Tanto as F3 e F6 fermentadas com kefir, e sem fermentar apresentaram coloração branca amarelada acinzentada. Assim, pôde-se constatar que os grãos de kefir de água apresentaram um grande potencial de adaptação no EVHC em até 24 horas de fermentação. Adicionalmente, favoreceu o desenvolvimento de uma bebida fermentada não láctea que pode vir a ser uma alternativa de produto alimentar para pessoas com intolerância à lactose, alérgicas a laticínios e veganas.

Palavras-chave: Kefir de açúcar; fibras; leite vegetal; bioprocessos; vegano.

ABSTRACT

The use of water-soluble vegetables extracts ("plant-based milk") has become a viable option of non-dairy substrate for the development of new food products, such as the production of fermented kefir beverages. In addition to not containing ingredients of animal origin, its help with physiological factors such as lactose intolerance and / or allergic to milk protein and is a food option for vegetarians and / or vegans. In this context, the objective of this study was the development of a vegan fermented beverage with water kefir grains on the substrate of water-soluble coconut extract (WSCE), with addition of inulin. The water kefir grains (5% w / w) were adapted to the WSCE substrate with different concentrations of inulin, xanthan gum and coconut sugar at a temperature of 25 ± 1 ° C. Formulations of fermented beverages were determined by means of a central composite design (CCD) 2^3, with 11 tests (F1 to F11). The CCD independent variables were concentrations of coconut sugar (2.0, 6.0 and 10.0%); inulin (2.0, 2.5 and 3.0%) and xanthan gum (0.0; 0.13 and 0.26%) and the dependent variables were cell growth of kefir grains, fermented beverage yield and production of lactic acid. Formulations were analyzed for pH values, soluble solids (SS) and CO_2 production at 0, 24 and 48 hours of fermentation. Through the application of a principal component analysis (PCA) was observed that F3 and F6 were the formulations that inversely correlated with each other and in relation to the others, with acidity of 0.68 and 0.88g / 100mL lactic acid, pH between 4.5 and 4.8, CO_2 production from 8.2 to 16.81% and SS of 6.69 and 7.40 ºBrix, in 24 hours of fermentation. Thus, these formulations were independently analyzed for physical-chemical characterization, sugar composition, organic compounds and enzymatic activity. As for the factorial design, the addition of coconut sugar, inulin and xanthan gum showed statistically significant results ($p \leq 0.05$) when analyzed as independent variables or with interactions, in the fermented kefir beverages at WSCE. In addition, through the data of the Analysis of Variance (ANOVA), was observed that the regression model, for the cell growth of kefir grains, fermented beverage yield and production of lactic acid, was statistically significant at a level of 95% confidence, with determination coefficients (R^2) of 98.46%, 91.68% and 83.00%, respectively. Cell growth rate of the grains was higher when the concentrations of inulin were close to 2.8 and 3.0% and with concentrations of approximate to 0.15% of xanthan gum, obtaining a growth rate of the 90%. Beverage yield and production of lactic acid were between 80 to 82.5% and 1.2 to 1.25%, respectively, when concentrations of xanthan gum and coconut sugar increased between 0.26% and 10.0%. According to the microorganism's identification, there was a higher prevalence of yeasts in relation to bacteria, this may have occurred due to the high concentrations of sugars available in the WSCE substrate and the addition of inulin. Regarding sugars concentrations and organic compounds, in F3 and F6, the metabolization of sugars was mainly directed towards the production of ethanol and acetic acid. In addition, was possible to observe greater enzymatic activity of amylase and peroxidase for F6 and inulinase for F3, due to the fact this formulation contains higher concentrations of inulin. Regarding centesimal composition, F3 and F6 fermented with kefir showed higher levels of lipids (2.84 and 3.26 g / 100g) and proteins (0.95 and 0.84 g / 100g) and lower energetic values (50.54 and 79.00 kcal), when compared to WSCE without fermentation, indicating that the fermentation process had a significant effect on nutritional values. All formulations evaluated showed high levels of moisture and low carbohydrates values. F3 and F6 fermented with kefir, and without fermenting, showed a yellowish grayish white color. Thus, was found that the water kefir grains showed a great potential for adaptation to the WSCE at 24 hours of fermentation. Therefore, it favored the development of a non-dairy fermented beverage that may become an alternative food product for people with lactose intolerance, allergic to dairy products and vegans.

Keywords: Sugary kefir; fibers; plant-based milk; bioprocess; vegan.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 12

2. OBJETIVOS 14

2.1 OBJETIVO GERAL 14

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 14

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA 15

3.1 VEGETARIANISMO E VEGANISMO 15

3.2 EXTRATOS VEGETAIS HIDROSSOLÚVEIS 16

3.3 AÇÚCAR DE COCO 19

3.4 INULINA 21

3.5 BEBIDA FERMENTADA DE KEFIR DE ÁGUA 23

3.6 ATIVIDADE ENZIMÁTICA NA FERMENTAÇÃO DE KEFIR 27

4. MATERIAL E MÉTODOS 29

4.1 MATERIAIS 29

4.1.1 Matérias-primas 29

4.1.2 Equipamentos 29

4.1.3 Reagentes 30

4.2 MÉTODOS 30

4.2.1 Preparo do extrato vegetal hidrossolúvel de coco (EVHC) 30

4.2.2 Manutenção e fermentação da cultura de Kefir de água 31

4.2.3 Delineamento Composto Central para produção da bebida fermentada 31

4.2.4 Crescimento celular dos grãos de kefir no EVHC 33

4.2.5 Rendimento da bebida fermentada de kefir no EVHC 34

4.2.6 Produção de dióxido de carbono (CO_2) na fermentação de kefir no EVHC 34

4.2.7 Determinação de ácido láctico por acidez titulável 34

4.2.8 Determinação da atividade enzimática de amilases 35

4.2.9 Determinação da atividade enzimática de peroxidases 35

4.2.10 Determinação da atividade enzimática de inulinase 36

4.2.11 Análise de compostos orgânicos 36

4.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA 37
4.3.1 Umidade 37
4.3.2 Cinzas 37
4.3.3 Sólidos solúveis (SS) 37
4.3.4 Lipídeos 38
4.3.5 Proteínas 38
4.3.6 Carboidratos 38
4.3.7 Análise de cor 38

4.4 IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS 39

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA 39

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 40

5.1 DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL (DCC) 40

5.2 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (ACP) 50

5.3 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS 54

5.5 ATIVIDADE ENZIMÁTICA NA FERMENTAÇÃO DE KEFIR 60

5.6 IDENTIFICAÇÃO E VARIEDADE DOS MICRORGANISMOS 61

5.7 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL 63

5.8 ANÁLISE DE COR 66

6. CONCLUSÃO 67

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS 68

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 69

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Microrganismos comumente encontrados nos grãos de kefir de água..... 25
TABELA 2. Níveis das variáveis independentes do planejamento experimental. 31
TABELA 3. Concentrações de açúcar de coco, inulina e goma xantana, definidas por DCC para as formulações da bebida fermentada no EVHC 32
TABELA 4. Ensaios e variáveis respostas do delineamento fatorial das formulações das bebidas fermentadas com kefir em EVHC adicionadas de açúcar de coco, inulina e goma xantana. 40
TABELA 5. Análise de regressão para as variáveis açúcar de coco, inulina e goma xantana e suas interações quanto ao crescimento celular, rendimento da bebida fermentada e produção de ácido láctico 42
TABELA 6. Análise de ANOVA para o modelo codificado com nível de 95% de confiança para o crescimento celular dos grãos de kefir, rendimento da bebida fermentada e produção de ácido láctico 45
TABELA 7. ACP correlacionada com as cargas marcadas para cada variável em relação aos valores médios de crescimento celular dos grãos, rendimento da bebida, pH, sólidos solúveis, produção de ácido láctico e CO_2 na bebida fermentada de kefir no EVHC. 51
TABELA 8. Concentrações de açúcares e compostos orgânicos nas F3 e F6 da bebida fermentada de kefir no EVHC em 24 horas de fermentação. 58
TABELA 9. Determinação da atividade enzimática nas F3 e F6 da bebida fermentada de kefir no EVHC em 24 horas de fermentação. 60
TABELA 10. Composição centesimal das F3 e F6 da bebida fermentada de kefir no EVHC em 0 e 24 horas de fermentação 64
TABELA 11. Parâmetros de cor L*, H° e C* das F3 e F6 da bebida fermentada de kefir no EVHC em 0 e 24 horas de fermentação. 66

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Flor de coco (a); Açúcar de coco (b) 20
FIGURA 2. Estrutura molecular da inulina..... 22
FIGURA 3. Grãos de kefir de água 26
FIGURA 4. Esquema do processo de desenvolvimento das bebidas fermentadas de kefir no EVHC 33
FIGURA 5. Gráficos de Pareto quanto a significância nas variáveis das formulações de kefir no EVHC pela adição de açúcar de coco, inulina e goma xantana (x) sobre (y) (a) crescimento dos grãos de kefir; (b) rendimento da bebida e (c) produção de ácido láctico 41
FIGURA 6. Relação linear das respostas (a) crescimento celular dos grãos de kefir (Y_1); (b) rendimento da bebida fermentada (Y_2) e (c) produção de ácido láctico (Y_3) através dos valores experimentais e preditos..... 44
FIGURA 7. Gráfico de curvas de contorno da interação entre as variáveis inulina (X_2) e goma xantana (X_3) no crescimento celular dos grãos de kefir (Y_1) no EVHC..... 46
FIGURA 8. Gráficos de curvas de contorno das interações entre as variáveis (a) açúcar de coco (X_1) e inulina (X_2) e (b) inulina (X_2) e goma xantana (X_3) no rendimento da bebida fermentada de kefir (Y_2) no EVHC..... 47
FIGURA 9. Gráficos de curvas de contorno das interações entre as variáveis (a) açúcar de coco (x_1) e goma xantana (X_3) e (b) inulina (X_2) e açúcar de coco (X_1) na produção de ácido láctico (Y_3)..... 48
FIGURA 10. Gráfico ScreePlot dos percentuais das variâncias obtidos pelas componentes principais quanto ao crescimento celular dos grãos, rendimento da bebida, pH, sólidos solúveis, produção de ácido láctico e CO_2 na bebida fermentada de kefir no EVHC 51
FIGURA 11. Gráfico de pesos das variáveis obtido pela análise dos valores médios de crescimento celular dos grãos (m), rendimento da bebida (R), pH, sólidos solúveis (Brix), produção de ácido láctico e CO_2 na bebida fermentada de kefir no EVHC..... 52
FIGURA 12. Gráfico de escores da correlação entre a variação das 11 formulações da bebida fermentada de kefir no EVHC em relação aos parâmetros fermentativos 53
FIGURA 13. Escala temporal de (a) pH e (b) sólidos solúveis (SS) nas F3 e F6 da bebida fermentada de kefir no EVHC nos tempos 0, 24 e 48 horas de fermentação..... 54
FIGURA 14. Escala temporal da produção de ácido láctico nas F3 e F6 da bebida fermentada de kefir no EVHC nos tempos 0, 24 e 48 horas de fermentação 56
FIGURA 15. Escala temporal da produção de dióxido de carbono (CO_2) nas F3 e F6 da bebida fermentada de kefir no EVHC nos tempos 0, 24 e 48 horas de fermentação..... 57
FIGURA 16. Identificação de microrganismos presentes em grãos de kefir de água cultivados em substrato de extrato vegetal hidrossolúvel de coco suplementado com inulina 62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EVHC	Extrato vegetal hidrossolúv4el de coco
TACO	Tabela Brasileira de Composição de Alimentos
SVB	Sociedade Vegetariana do Brasil
IBOPE	Instituto Brasileiro de Opinião Pública e Estatística
ABRAS	Associação Brasileira de supermercados
FIESP	Fundação das Indústrias do Estado de São Paulo
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
DCV	Doença cardiovascular
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
AVC	Acidente Vascular Cerebral
DCNT	Doenças Crônicas não Transmissíveis
PCA	*Philippine Coconut Authority*
BAFPS	*Bureau of Agriculture and Fisheries Product Standards*
FOS	Fruto-Oligossacarídeos
BAL	Bactérias Ácido Lácticas
BAA	Bactérias Ácido Acéticas
EPS	Exopolissacarídeos de Dextrano
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
TGI	Trato Gastrointestinal
IAL	Instituto Adolf Lutz
AOAC	*Association of Official Analytical Chemists*
DCC	Delineamento Composto Central
UV-VIS	Ultravioleta-Visível
DNS	Ácido Dinitrosalicílico
ABS	Absorção
AE	Atividade enzimática
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
UTOs	Unidades Taxonômicas Operacionais
ANOVA	Análise de Variância
ACP	Análise de Componentes Principais
SS	Sólidos Solúveis

1. INTRODUÇÃO

O mercado alimentício para consumidores vegetarianos e/ou veganos tem apresentado um crescimento significativo em vários países (VÄKEVÄINEN et al., 2020). Em 2019 as vendas globais destes produtos alimentícios obtiveram valores de aproximadamente 55 bilhões de dólares, com perspectiva de atingir 60 bilhões de dólares até 2023 (CONWAY, 2019). Ainda conforme a Euromonitor International (2019), aproximadamente 20% dos consumidores dos principais mercados mundiais declararam ter a intenção de aumentar o consumo de alimentos de origem vegetal e reduzir os de origem animal. Esta busca por novos produtos à base de vegetais também pode estar associada à fatores como problemas fisiológicos como a intolerância a lactose e/ou alergia à proteína do leite (VANGA; RAGHAVAN, 2018).

A partir disso, a indústria de alimentos tem buscado e aprimorado pesquisas e tecnologias que auxiliem no desenvolvimento de novos produtos, ingredientes e métodos de produção que atendam a estes fatores e a demanda de consumidores vegetarianos/veganos (BALLCO; GRACIA, 2020). Em virtude disso, a utilização de frutas, vegetais, sementes, nozes, cereais e pseudocereais tem se tornado uma alternativa na produção de alimentos sem ingredientes de origem animal (RINCON; BRAZ ASSUNÇÃO BOTELHO; DE ALENCAR, 2020), tais como os extratos vegetais hidrossolúveis, também chamados de “leites vegetais”, sendo estes uma opção viável de substrato não lácteo para o desenvolvimento de novos produtos alimentares como, por exemplo, na elaboração de bebidas fermentadas de kefir (FIORDA et al., 2016; ESTRELA et al, 2017).

O extrato vegetal hidrossolúvel mais utilizado pela indústria alimentícia é o de soja, por ser considerado como fonte de proteínas e possuir baixo custo (NORBERTO et al., 2018). Entretanto, uma das características da soja é possuir propriedades alergênicas, assim outros extratos vegetais têm sido explorados como alternativas a este (PAUL; KUMAR; SHARMA, 2019). Frente a isso, o extrato vegetal hidrossolúvel de coco (EVHC), que é obtido a partir da polpa (endosperma) do coco seco (*Cocos nucifera* L.) se torna uma opção interessante, uma vez que, apresenta coloração branca semelhante ao leite e aroma característico do coco que agrada aos consumidores, visto que a qualidade sensorial é um dos determinantes mais críticos na escolha de um produto (PATIL; BENIAKUL, 2018; RINCON; BRAZ ASSUNÇÃO BOTELHO; DE ALENCAR, 2020).

De acordo com a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO (2011), o coco

seco (*Cocos nucifera* L.) e, consecutivamente seu extrato vegetal, possuem elevado valor nutritivo, energético e lipídico (NEPA-UNICAMP, 2011). Contudo, a composição nutricional do EVHC dependerá da qualidade do coco e da eficiência dos métodos de obtenção do extrato vegetal hidrossolúvel (PATIL; BENIAKUL, 2018).

O kefir de água, também conhecido como kefir açucarado produz uma bebida fermentada a partir da adição dos seus grãos em uma solução aquosa de sacarose, os quais, durante o processo fermentativo produzem ácido láctico, CO_2, etanol, ácido acético e vários outros produtos, incluindo compostos aromáticos voláteis, formados pela associação simbiótica dos microrganismos presentes nestes (bactérias ácido lácticas e acéticas e as leveduras) (LAUREYS; DE VUYST, 2014; FELS et al., 2018). A fermentação geralmente é realizada em temperaturas entre 20 a 30 °C sob condições anaeróbicas entre 24 a 96 horas, resultando em uma bebida fermentada levemente adocicada, ácida e efervescente com aroma frutado (MALDONADO et al, 2020). Ressalta-se ainda, que o kefir possui meio de cultivo versátil uma vez que, seus grãos crescem em diferentes substratos como em soluções de sacarose, melado, mel, suco de frutas e vegetais, e extratos hidrossolúveis de vegetais, atuando assim, como uma cultura iniciadora (FIORDA et al., 2017). Desta forma, a utilização de novos substratos como meio de cultivo para o kefir, pode aumentar o valor nutricional e adicionar novos sabores e aromas a bebida obtida (LEITE et al., 2013a; NOGUEIRA et al., 2016). Assim, a utilização de ingredientes que preservem e acentuem as características sensoriais da bebida fermentada de kefir e garantam a durabilidade e qualidade do produto são imprescindíveis (MA et al., 2015).

Aliado as exigências do mercado, os consumidores também têm buscado por ingredientes que agreguem características sensoriais semelhantes aos dos produtos tradicionais (BEDIN et al, 2018). Com isso, a utilização da inulina associada ao açúcar de coco pode ser interessante, afinal garante textura, aroma e sabor atraentes a bebida fermentada, que é caracterizada principalmente pela acidez acentuada. A inulina é um carboidrato complexo, ou seja, é uma fibra alimentar solúvel, não sendo digerida no trato gastrointestinal pela enzima α-amilase, exercendo assim, ações benéficas nos processos fisiológicos e bioquímicos do organismo (GUPTA et al., 2019). Além disso, também pode ser utilizada na melhoria dos aspectos sensoriais dos alimentos uma vez que, possui capacidade de formação de géis e quando combinada com outros ingredientes, como gomas e surfactantes, pode vir a melhorar a textura do alimento (DAS et al., 2019). Já o açúcar de coco se caracteriza por conter aproximadamente 80% de sacarose, 3% de glicose e 7% de frutose, com baixo índice glicêmico (IG) entre 35 e

54 quando comparado aos açúcares refinados (cana-de-açúcar e/ou beterraba), além disso possui aroma característico de coco, sabor doce caramelizado e coloração marrom (BECK, 2018; WRAGE et al., 2019; MAMMEN et al., 2020).

Frente ao exposto, este trabalho teve como objetivo, a elaboração de uma bebida vegana fermentada com grãos de kefir de água, utilizando como substrato o EVHC com adição de inulina e açúcar de coco, a fim de se avaliar os parâmetros fermentativos e as características físico-químicas e enzimáticas.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Elaborar e caracterizar uma bebida fermentada vegana a partir de grãos de kefir de água adaptados no substrato de extrato vegetal hidrossolúvel de coco (EVHC) com adição de inulina, açúcar de coco e goma xantana.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Desenvolver uma bebida fermentada que atenda as exigências dos consumidores veganos utilizando grãos de kefir de água;
- ✓ Estudar a influência da concentração de açúcar de coco, inulina e goma xantana no substrato de EVHC aplicado para a fermentação com kefir de água nos tempos 0, 24 e 48 horas a partir de um delineamento fatorial;
- ✓ Estudar os efeitos da adição da inulina, quanto aos parâmetros fermentativos e composição físico-química, na bebida fermentada de kefir;
- ✓ Avaliar as atividades enzimáticas das enzimas inulinase, α-amilase e peroxidase na bebida fermentada de kefir;
- ✓ Identificar os microrganismos presentes nos grãos de kefir de água adaptados ao substrato do extrato vegetal hidrossolúvel de coco;
- ✓ Determinar a composição centesimal da bebida fermentada de kefir;

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 VEGETARIANISMO E VEGANISMO

O vegetarianismo se caracteriza por uma escolha alimentar que exclui alimentos de origem animal, principalmente a carne, entretanto alguns consumidores vegetarianos ainda aceitam em sua dieta a oferta de algumas fontes de proteína animal, como ovos e derivados lácteos. Já os veganos restringem totalmente o consumo de alimentos e produtos (cosméticos, roupas, entre outros) de origem animal (FREIRIA et al., 2017; RÉVILLION et al., 2020). Sendo classificados de quatro formas pela Sociedade Vegetariana do Brasil – SVB (2016: "(a) Ovolactovegetarianismo: consome leite, laticínios e ovos; (b) Lactovegetarianismo: consome leite e laticínios; (c) Ovovegetarianismo: consome ovos; (d) Vegetarianismo estrito e veganismo: não consome ou utiliza produtos de origem animal".

Dessa forma, a escolha de uma dieta vegetariana ou vegana, pode ter diferentes motivações para os consumidores, como por questões éticas, religiosas e socioeconômicas (QUEIROZ; SOLIGUETTI; MORETTI, 2018). Além disso, também há a preocupação com a sustentabilidade e os impactos ambientais dos sistemas produtivos e os impactos da alimentação no bem-estar animal (RUBY, 2012; DIAS et al., 2016). Ainda, os consumidores podem atribuir a dieta vegetariana como "mais saudável", uma vez que, alguns estudos evidenciam que hábitos alimentares baseados em frutas e vegetais minimamente processados ou *plant-based* trazem benefícios à saúde (ROSENFELD, 2019).

O mercado de alimentos para os consumidores vegetarianos e/ou veganos vem se apresentando como um nicho de forte crescimento mundial (VÄKEVÄINEN et al., 2020; RÉVILLION et al., 2020). Conforme Conway (2019), em 2019, as vendas globais de produtos veganos atingiram o valor de aproximadamente 55 bilhões de dólares, com perspectiva de chegar em mais de 60 bilhões de dólares em 2023. Ainda de acordo com a Euromonitor International (2019), aproximadamente 20% da população dos principais mercados mundiais tem a intenção de reduzir o consumo de alimentos de origem animal.

No Brasil em 2017, 14% da população se declarou como vegetariana (equivalente a 29,2 milhões de pessoas) e 63% gostaria de reduzir o consumo de carnes. Ainda segundo a pesquisa, 60% dos entrevistados têm a intenção de compra voltada para produtos veganos, no entanto o preço desses produtos foi considerado elevado em relação aos de origem animal (IBOPE, 2018).

Conforme a Associação Brasileira de Supermercados - ABRAS (2017), a oferta de produtos veganos ainda é menor que a demanda de consumidores. De acordo com os estudos realizados pela Federação das Indústrias do Estado de São Paulo – FIESP (2018), os produtos vegetarianos e/ou veganos têm se tornado mais atrativos aos consumidores brasileiros, por também atenderem às necessidades do público celíaco ou que possui alergia e/ou intolerância aos produtos lácteos, assim como aqueles interessados em produtos naturais, sem aditivos ou orgânicos e sustentáveis, que contenham selos de qualidade e informações sobre sua origem. Segundo Révillion et al. (2020), no Brasil ainda há poucas bebidas com selo de certificação vegana, diferente de outros países como o Canadá que possui selo em sucos, cafés, água e leite de coco, entre outros.

De acordo com a *Plant Based Foods Association* e *The Good Food Institute* (2017), entre 2016 e 2017 houve um aumento de 20% na procura de produtos veganos como alternativa à substituição aos lácteos e em 56% nas bebidas fermentadas veganas do tipo iogurte. Sendo que a soja é a principal matéria-prima utilizada no mercado destas bebidas (JESKE; ZANNINI; ARENDT, 2017a). Desta forma, a indústria alimentar tem investido em pesquisas e tecnologias que visem à viabilidade de outras matérias-primas para diversificar estes produtos e atender a demanda de consumidores alérgicos ao leite e à soja, como na utilização de extratos vegetais hidrossolúveis (“leites vegetais”) alternativos (RUBY, 2012; VÄKEVÄINEN et al., 2020). A partir disso, alguns estudos apresentam preparações e formulações de extratos vegetais hidrossolúveis, como o leite de avelã, quinoa, caju, baru, grão de bico, coco, entre outros (ATALAR, 2019; VÄKEVÄINEN et al., 2020; CO et al., 2020; SILVA et al., 2020; WANG et al., 2020; RINCON; BRAZ ASSUNÇÃO BOTELHO; DE ALENCAR, 2020).

3.2 EXTRATOS VEGETAIS HIDROSSOLÚVEIS

Os extratos vegetais hidrossolúveis, também conhecidos popularmente como “leites vegetais”, têm sido utilizados como uma alternativa em substituição ao leite (RUBY, 2012; RINCON; BRAZ ASSUNÇÃO BOTELHO; DE ALENCAR, 2020) O consumo deste tipo de bebida se tornou comum por consumidores que são intolerantes a lactose, alérgicos a proteína do leite ou, ainda, por adeptos ao vegetarianismo e/ou veganismo (FOURREAU et al., 2013; JESKE, ZANNINI e ARENDT, 2017b), pois além de ser uma alternativa viável pode se apresentar como uma boa fonte nutricional. Ressalta-se ainda que há alternativas como produtos

sem lactose e a enzima lactase para intolerantes à lactose, no entanto, para alérgicos e veganos, a única opção seria a utilização dos “leites vegetais” (VANGA e RAGHAVAN, 2018).

Os extratos vegetais hidrossolúveis podem ser obtidos à base de cereais, pseudocereais, sementes, nozes, frutas e vegetais, que podem se apresentar como extratos líquidos, suspensões coloidais ou emulsões (MAKINEN et al., 2016; JESKE et al., 2017a; RINCON; BRAZ ASSUNÇÃO BOTELHO; DE ALENCAR, 2020). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Resolução n° 268, estabelece que os extratos vegetais hidrossolúveis são “os alimentos obtidos a partir de partes proteicas de espécie(s) vegetal(is), podendo ser apresentados em grânulo, pó, líquido, ou outras formas com exceção daquelas não convencionais para alimentos. Podendo também ser adicionados de outros ingredientes, desde que não descaracterizem o produto”. Ainda de acordo com a Resolução n° 272, podem ser definidos como “produtos obtidos a partir de partes comestíveis de espécies vegetais, que podem passar por processos de floculação, extrusão, congelamento, laminação, fermentação, cocção” (BRASIL, 2005ab).

Em relação a composição nutricional dos extratos vegetais, esta depende da qualidade e tipo de matéria-prima e método de processamento realizado na produção (MAKINEN et al., 2016). Segundo Singhal et al. (2017), extratos vegetais à base de amêndoas, nozes, arroz, quinoa e aveia possuem baixos teores de proteínas e minerais como cálcio e ferro em comparação ao leite de vaca e à soja. Frente a isso, pode se citar como uma desvantagem comum de alguns extratos vegetais hidrossolúveis o baixo teor proteico (JESKE et al., 2017b).

O extrato vegetal hidrossolúvel mais utilizado é o de soja, entretanto, 14% dos consumidores com alergia à proteína do leite de vaca também apresentam reações adversas à soja (MIN et al., 2018). Ainda, outras alternativas de extratos vegetais hidrossolúveis como de nozes e amêndoas podem ser considerados alergênicos (VOJDANI; TURNPAUGH; VOJDANI, 2018; PAUL; KUMAR; SHARMA, 2019). Com isso, outras opções de extratos vegetais hidrossolúveis devem ser exploradas, a fim de se excluir alérgenos, possuir baixo custo, fácil acesso e ser sensorialmente agradável, incluindo assim mais consumidores (RINCON; BRAZ ASSUNÇÃO BOTELHO; DE ALENCAR, 2020).

O extrato vegetal hidrossolúvel à base de coco (seco) é uma opção interessante devido possuir cor branca semelhante ao leite e altos teores de lipídeos, além de ser sensorialmente bem aceito (ZHU et al., 2014). Este é obtido a partir do fruto do coqueiro, que como matéria-prima possui grande relevância, uma vez que, fornece vários tipos de produtos e subprodutos.

Além disso, seu aproveitamento vai desde a raiz até a estipe, inflorescência, folhas, caule, casca e fruto (LODY, 2011). A partir do fruto podem ser adquiridos produtos alimentares como a água do coco verde, óleo, coco ralado, amêndoa de coco e o extrato vegetal, conhecido popularmente como "leite de coco", sendo ainda obtido o açúcar de coco a partir da seiva da flor do coco (SABBE, 2008; CARVALHO e COELHO, 2009; WRAGE et al., 2019).

No Brasil a produção do coco se destina principalmente para água de coco e na forma seca (*in natura*) ou industrialmente como coco ralado, óleo de coco e "leite de coco", sendo sua comercialização realizada durante todo o ano (MARTINS; JESUS JÚNIOR, 2014). Em relação ao mercado mundial do coco o Brasil tem participação mínima, com exportações que chegaram a 1,5 milhões de dólares entre 2017 e 2018, sendo que entre este biênio a produção de coco no Brasil foi de 5,54 milhões de toneladas e o consumo de 5,52 milhões de toneladas; já os maiores produtores mundiais como as Filipinas, Indonésia e a Índia foram responsáveis por 83,3% da produção e 84,2% do consumo (BRAINER, 2018). Quanto ao consumo de coco no Brasil este é preferencialmente na forma de água de coco com *per capita* de aproximadamente 0,32 L/ano e com perspectivas de crescimento no consumo de 20% ao ano (MARTINS, JESUS JÚNIOR, 2014). Já seu preço seco é em média quatro vezes maior que o do coco verde, sendo que entre janeiro a julho seu valor seco é maior (3,16 R$/kg) em relação ao restante do ano (2,41 R$/kg) (AGRIANUAL, 2017).

De acordo com a Resolução n° 12, "o "leite de coco" é definido como uma emulsão aquosa extraída do endosperma do coco (*Cocos nucifera* L.), por processamentos mecânicos adequados" (ANVISA, 1978). Ainda, conforme Jiang, Xiang e Wang (2016), esta emulsão se dá de forma natural, a partir da estabilização das proteínas presentes no fruto. Nutricionalmente, é um produto alimentar rico em aminoácidos essenciais, principalmente em triptofano (CARVALHO e COELHO, 2009). De acordo com a TACO (2011), o coco seco (*Cocos nucifera* L.) e consecutivamente seu extrato vegetal contém, em 100 gramas do produto, cerca de 3,7 g de proteínas, 42,0 g de lipídeos, 10,4 g de carboidratos, 5,4 g de fibras alimentares, apresentando, ainda, em torno de 43% de umidade (base seca) (NEPA-UNICAMP, 2011). Contudo, a sua composição nutricional vai depender da qualidade do coco e eficiência do método de extração do extrato vegetal hidrossolúvel (MAKINEN et al., 2016; WANG et al., 2020). Segundo os estudos de Patil e Beniakul (2018), diferentes proporções de água para coco na produção do extrato vegetal hidrossolúvel não interferem na extração das proteínas e lipídeos. Adicionalmente, pode ainda apresentar concentrações de antioxidantes, minerais

(ferro, magnésio e zinco) e altas quantidades de lipídeos como ácidos graxos saturados, principalmente o ácido láurico (C12:0) e triglicerídeos de cadeia média (BALOGUN et al., 2016; SETHI et al., 2016).

Por outro lado, ressalta-se que há controvérsias de que o consumo excessivo de gorduras saturadas pode vir a ser prejudicial à saúde, (HOOPER et al., 2020). No entanto, de acordo com Astrup et al. (2020), metanálises de estudos randomizados e observacionais quanto a redução no consumo de ácidos graxos saturados não apresentaram efeitos significativos em doenças cardiovasculares (DCV). Ainda foi evidenciado que os triglicerídeos de cadeia média do coco apresentam efeitos benéficos no metabolismo lipídico e o ácido láurico pode vir a reduzir os níveis de colesterol total e frações das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (RESENDE et al., 2016; SHEELA et al., 2016; NARAYANANKUTTY; ILLAM; RAGHAVAMENON, 2018). Kang, Yang e Xiao (2020), também discorrem sobre o consumo de gordura saturada estar associado ao menor risco de acidente vascular cerebral (AVC). Contudo, deve-se levar em consideração os demais nutrientes e compostos presentes no coco, uma vez que os benefícios deste alimento estão associados a um conjunto de macronutrientes e estes não devem ser previstos de forma isolada.

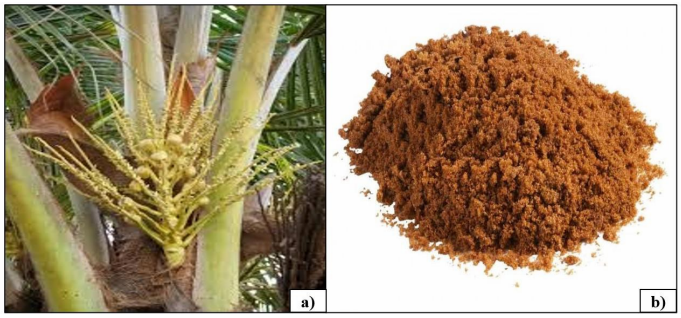
O extrato vegetal de coco possui várias formas de aplicabilidade em produtos, pois, oferece características sensoriais e tecnológicas adequadas, podendo ser utilizado como ingrediente em preparações ou ainda como substrato em processos fermentativos, como por exemplo, em grãos de kefir.

3.3 AÇÚCAR DE COCO

Os consumidores têm buscado por substituições ao uso de açúcares refinados, optando por edulcorantes ou açúcares orgânicos, como o mascavo, demerara e atualmente o açúcar de coco, conhecido também como açúcar de palma. Tais aspectos se dão pelo fato de que o consumo excessivo de açúcares refinados pode estar associado às doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) (WRAGE et al., 2019). Entretanto, apesar do açúcar de coco se apresentar como uma melhor opção em relação aos açúcares refinados, quimicamente não difere dos demais açúcares, sendo composto por aproximadamente 80% de sacarose, 3% de glicose e 7% de frutose (PHILIPPINE COCONUT AUTHORITY - PCA, 2015; KULKARNI, 2015; BECK, 2018).

O açúcar de coco ou de palma ainda é pouco conhecido no mercado e há poucos estudos sobre este produto na literatura. Sua produção é realizada de forma local e artesanal por pequenos agricultores e seu consumo advém, tradicionalmente de países asiáticos como a Indonésia, Filipinas e Índia (ALEXANDRU GRUMEZESCU, 2019; WRAGE et al., 2019). Este é obtido a partir da seiva da flor de coco (*Cocos nucifera* L.), sendo que cada flor fornece cerca de 1,5 L de seiva por dia, podendo ser colhida duas vezes ao dia. Há aproximadamente 15 g de açúcar em 100 g de seiva e a produção do açúcar de coco não é padronizada (BAFPS, 2010; HEBBAR et al., 2015). A partir da coleta da flor de coco, a seiva é retirada e armazenada em recipientes de polietileno ou bambu de 8 a 12 horas, afim de se evitar a fermentação do líquido, em seguida é aquecida até que ocorra sua cristalização em açúcar (HEBBAR et al., 2015). O açúcar obtido passa por processo de peneiramento até atingir uma granulometria fina e sua coloração pode variar de marrom clara a escura, dependendo do tempo de aquecimento da seiva (reação de Maillard) (Figura 1) (APRIYANTONO et al., 2002; PHILIPPINE COCONUT AUTHORITY - PCA, 2015).

FIGURA 1. Flor de coco (a); Açúcar de coco (b)



FONTE: Figura adaptada de GUITEL, 2018 e ALL NUTS, 2019.

Sensorialmente, o açúcar de coco possui sabor doce caramelizado (semelhante ao mascavo) e aroma de coco, com doçura próxima ao açúcar refinado, sendo possível a substituição de 1:1 m/m (WRAGE et al., 2019). Em relação aos açúcares refinados o açúcar de coco possui a vantagem de conter maior valor nutricional agregado, uma vez que, não passa por processo de refinamento (MAMMEN et al., 2020). Segundo a Philippine Coconut Authority – PCA (2015) e Jose et al. (2017), o açúcar de coco pode conter minerais (Fe, Zn, Ca, K, P, Na,

Mg), vitaminas (Complexo $B_{1,3,5,7,9}$ e vitamina C), além de alguns ácidos graxos de cadeia curta, polifenóis e antioxidantes. Sendo que ainda, se caracteriza por conter baixo índice glicêmico entre 35 e 54 quando comparado aos açúcares refinados, como o de cana-de-açúcar (IG 92) e/ou beterraba (IG 70) (KULKARNI, 2015; BECK, 2018; WRAGE et al., 2019; MAMMEN et al., 2020). De acordo com a *Philippine Coconut Authority* – PCA (2015) e Alexandru Grumezescu (2019), o baixo índice glicêmico do açúcar de coco advém das fibras solúveis presentes neste, como a inulina, que pode vir a retardar a absorção da glicose pelo organismo.

Ressalta-se que como o açúcar de coco não possui padronização no processo de produção, pode vir a conter aditivos de açúcares de plantas C4 (cana-de-açúcar), amido, glúten e óleo, sendo que estes podem ser atribuídos também aos métodos tecnológicos para aumentar o rendimento do açúcar (WRAGE et al., 2019).

Quanto a sustentabilidade, a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação, atribuiu o açúcar de coco como "o açúcar mais sustentável", uma vez que, os coqueiros têm durabilidade de mais de 25 anos e utilizam menos água quando comparados à cana-de-açúcar (SASS, 2017).

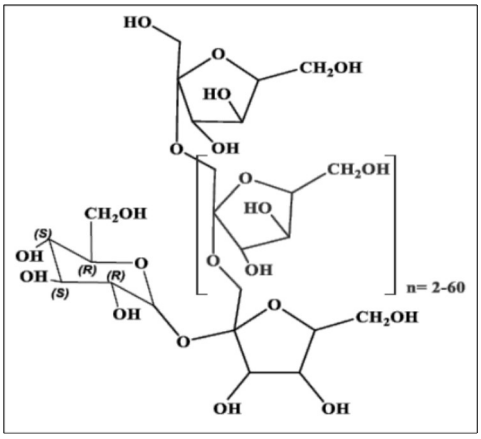
3.4 INULINA

A inulina e os fruto-oligossacarídeos (FOS) são considerados carboidratos complexos, devido as suas características como ingredientes alimentares não-digeríveis (fibras alimentares), exercendo assim, ações funcionais nos processos fisiológicos e bioquímicos do organismo (GUPTA et al., 2019). Conforme as normas da ANVISA, os produtos alimentares suplementados com inulina ou FOS devem fornecer no mínimo 2,5 g por porção, sendo recomendado um consumo diário mínimo de 5 g para se obter efeitos benéficos à saúde (ANVISA, 2016).

Assim a inulina é definida como um carboidrato complexo ou fibra alimentar solúvel, constituída por polímeros e oligômeros lineares de frutose, chamados de frutanas (GUPTA et al., 2019). Estas frutanas dividem-se em dois grupos gerais: a oligofrutose e os fruto-oligossacarídeos (SAAD, 2006). Estes compostos são encontrados naturalmente em alimentos de origem vegetal, como em cereais e frutos secos (AL-SHERAJI et al., 2013). Sendo que a inulina pode ser comercialmente obtida a partir da alcachofra de Jerusalém (*Helianthus*

tuberosus), da chicória (*Cichorium intybus*) e através de sua hidrólise parcial (oligofrutose) ou, ainda, pela síntese enzimática da sacarose (CHARALAMPOPOULOS; RASTALL, 2012; COOPER et al., 2015). As frutanas caracterizadas como inulina, são os polissacarídeos não-estruturais mais presentes na natureza, após o amido. São quimicamente compostas por cadeias lineares de carboidratos e a sua molécula é constituída por ligações glicosídicas β-(2→1) - frutosil-frutose, podendo conter uma molécula inicial de α-D-glicose (SAAD, 2006). Como mostra a Figura 2.

FIGURA 2. Estrutura molecular da inulina



FONTE: Figura adaptada de GUPTA et al., 2019.

Devido às moléculas com ligações glicosídicas β-(2→1) - frutosil-frutose, a inulina não é digerida, hidrolisada e/ou absorvida pelas enzimas presentes no trato-gastrointestinal, no qual, pode vir a ser metabolizada pelas bactérias do cólon intestinal, trazendo assim benefícios no aumento da absorção de minerais e íons e atuar como imunoprotetora (BONNEMA et al., 2010; GUPTA et al., 2019). Também é considerada como prebiótica e possui baixo IG (46), com valor calórico de 1,5 kcal/g^{-1} (SIMSEK et al., 2017).

Ainda, a inulina se caracteriza por ser hidrofílica, ou seja, se solubiliza na água em concentrações de até 12 g/L. Quando hidratada forma dispersões coloidais viscosas ou géis, sendo que sua solubilidade depende do peso molecular, grau de polimerização e temperatura (GUPTA et al., 2019). Ressaltando-se que a solubilidade da inulina pode aumentar em até 35%

quando submetida à altas temperaturas (aproximadamente 90 °C) (KALYANI NAIR; KHARB; THOMPKINSON, 2010).

O grau de polimerização da inulina pode variar entre 2 a 60, dependendo da sua fonte de origem (TOMASIK, 2015). Devido a isso, possui uma massa molecular maior em relação aos FOS, o que lhe confere maior capacidade de viscosidade (formação de géis), melhorando assim a textura e estabilidade de produtos alimentares, como em bebidas fermentadas (PIMENTEL et al., 2012). Além disso, sua capacidade de formação de gel pode ser aumentada e melhorada, através da sua combinação com outros ingredientes, como gomas e surfactantes em misturas formuladas até que se atinja a textura desejada (DAS et al., 2019). A partir destas características, quando misturada com água e/ou leite forma micro cristais com textura cremosa e suave semelhante à gordura, devido a isso, sua aplicação tem sido utilizada de forma tecnológica como um modificador reológico em substitutos de gorduras e açúcares, reduzindo o valor energético total dos produtos alimentares, em torno de 2 kcal/g, valor consideravelmente baixo em relação aos ingredientes que pode substituir (4 kcal/g para açúcares e 9 kcal/g para gorduras) (SHOAIB et al., 2016; DAS et al., 2019). Por meio disso, a inulina tem sido aplicada em formulações de vários produtos como, iogurtes, sorvetes, *mousses*, sobremesas cremosas, entre outros.

3.5 BEBIDA FERMENTADA DE KEFIR DE ÁGUA

O kefir de água, também conhecido como kefir açucarado, é uma bebida fermentada obtida a partir do processo fermentativo dos grãos de kefir em uma solução aquosa de sacarose (FELS et al., 2018). Sendo uma de suas principais características o seu meio de cultivo versátil, uma vez que, seus grãos crescem em diferentes substratos além da solução de sacarose, como em melado, mel, suco de frutas e vegetais, e extratos hidrossolúveis de vegetais (SANTOS e BASSO, 2013; FIORDA et al., 2017). Assim, estes substratos alternativos como meio de cultivo, podem vir a aumentar o valor nutricional e adicionar novos sabores e aromas a bebida fermentada obtida (LEITE et al., 2013a; NOGUEIRA et al., 2016).

As bebidas de kefir têm origem conferida às regiões montanhosas do Cáucaso e dentre os países que mais consomem os grãos de kefir de água estão os Estados Unidos, México, Canadá, Japão, Tailândia, Malásia, França, Grécia, Turquia, Romênia, Rússia, Inglaterra, Holanda, Noruega, Suécia, Espanha, Portugal, Brasil, Chile, Peru e Argentina (JIANZHONGA

et al., 2009; LEITE et al., 2013a; GUL et al., 2018). Sendo ainda possível encontrar o kefir de água através de outras denominações, como, “tibico”, “tibi”, “abelhas da Califórnia”, “abelhas africanas”, “castanhas de ale”, “bálsamo de Gileade”, “abelhas” e “Sementes de cerveja japonesa” (MIGUEL et al., 2011). Segundo Prado et al. (2015), já estão disponíveis comercialmente uma vasta variedade de bebidas fermentadas de kefir, como kefir tradicional, zero lactose, baixo teor e/ou zero gordura, vegano (à base de frutas e vegetais), tipo grego, entre outros, em países como o Canadá, Estados Unidos e Reino Unido.

A fermentação dos grãos de kefir de água geralmente é realizada em temperaturas entre 20 a 30 °C sob condições anaeróbicas entre 24 a 96 horas, até o pH de aproximadamente 4,6, resultando em uma bebida fermentada levemente adocicada, ácida e efervescente com aroma frutado (YÉPEZ et al., 2019; MALDONADO et al, 2020). Durante o processo de fermentação ocorre a produção de ácido láctico, dióxido de carbono (CO_2), etanol, ácido acético, ácido glucônico e vários outros produtos, incluindo compostos aromáticos voláteis formados pela associação simbiótica dos microrganismos presentes nos grãos (LAUREYS; De VUYST, 2014; FELS et al., 2018). Estas substâncias advindas da fermentação conferem características sensoriais desejáveis à bebida fermentada final como: textura suave e consistência um pouco espessa (devido ao glicerol, polissacarídeos, etc.), sabor levemente ácido e efervescente (devido à presença do etanol) e aroma frutado (devido aos ésteres) (FIORDA et al., 2017).

Os tipos de fermentações mais comuns dos grãos de kefir são: lácticas, alcoólicas e acéticas (VIANA et al., 2017). Sendo a fermentação láctica relacionada a acidez da bebida e é utilizada como indicador na extensão de vida de prateleira e preservação das bebidas fermentadas, atuando como um conservante natural. A fermentação alcoólica é utilizada a partir da metabolização de açúcares em bebidas fermentadas como cervejas e vinhos, que quando destiladas promovem a obtenção de bebidas com elevado teor alcoólico. A fermentação acética é atribuída principalmente a produção de vinagre (YÉPEZ et al. 2019; MALDONADO et al., 2020).

A fermentação dos grãos de kefir é realizada a partir de uma associação simbiótica de leveduras, bactérias do ácido láctico (BAL) e bactérias do ácido acético (BAA) (GAROFALO et al., 2015; BOURRIE et al., 2016; FELS et al., 2018). Os microrganismos mais comuns citados pela literatura são as BAL (*Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc*, e *Streptococcus* spp.), BAA (*Acetobacter*) e leveduras (*Kluyveromyces, Saccharomyces, Candida* e *Torula*) (LEITE et al., 2013a; NIELSEN, GÜRAKAN e ÜNLÜ, 2014; FIORDA et al., 2017). Contudo,

a composição e associação destes microrganismos no kefir tende a variar de acordo com a origem dos grãos, o método de cultivo e substratos utilizados na fermentação (GULITZ et al., 2011; KOH et al., 2018; FELS et al., 2018). Ainda, podem ser citadas as culturas de kefir para produção industrial, entretanto estas possuem número limitado de microrganismos, os quais, as cepas são selecionadas e isoladas para a fermentação (DAVRAS; GUZEL-SEYDIM; TAS, 2018).

A Tabela 1 apresenta alguns microrganismos que podem ser encontrados com mais frequência nos grãos do kefir de água.

TABELA 1. Microrganismos comumente encontrados nos grãos de kefir de água

Grupo de microrganismos	Gênero	Microrganismos
Bactérias	*Acetobacter*	A. *fabarium*, A. *orientalis*, A. *lovaniensis*.
	Lactobacillus	L. *brevis*, L. *buchneri*, L. *casei sub* sp. *casei*, L. *casei sub* sp. *rhamnosus*, L. *diolivorans*, L. *fermentum*, L. *harbinensis,* L. *hilgardii,* L. *hordeii*, L. *kefiranofaciens*, L. *kefiri*, L. *lactis*, L. *mali,* L. *nagelli*, L. *paracasei*, L. *parafarraginis*, L. *perolens,* L. *plantarum,* L. *satsumensis.*
	Outras espécies	*Lysinibacillus sphaericus, Oenococcus kitaharae, Bifidobacterium psychraerophilum.*
Leveduras	*Saccharomyces*	S. *cerevisiae*
	Pichia	P. *membranifaciens,* P. *kudriavzevii*
	Lanchancea	L. *fermentati*, L. *meyercii*.
	Kluyveromyces	K. *lactis*, K. *marxianus*.
	Kazachstania	K. *aerobia,* K. *unispora*.
	Hanseniaspora	H. *valbyensis*, H. *uvarum*.
	Outras espécies	*Zygotorulaspora florentina, Issatchenkia orientalis, Zygosaccharomyces fermentati, Dekkera bruxellensis.*

FONTE: Adaptado de FIORDA et al., 2017.

Os grãos de kefir são formados por uma matriz de exopolissacarídeos de dextrano (EPS), na qual os microrganismos (BAL, BAA e leveduras) estão incorporados (LAUREYS et al. 2018). Esta matriz de EPS contêm polímeros de glicose constituídos principalmente por ligações α-D-1,6 lineares e em menores quantidades cadeias laterais ligadas a α-1,3 (COMA et al., 2019). Sendo essa a principal diferença com os grãos de kefir de leite, que são formados por heteropolissacarídeos ramificados, chamados de kefiran ou kefirano (LEITE et al., 2013b; NIELSEN, GÜRAKAN e ÜNLÜ, 2014). Os grãos possuem formas irregulares apresentando

tamanhos entre 0,5 e 3,5 cm, são translúcidos, mucilaginosos, com estrutura frágil e insolúveis em água (FIORDA et al., 2017; LAUREYS et al. 2018), como mostra a Figura 3.

FIGURA 3. Grãos de kefir de água

FONTE: O autor, 2019.

Ainda, segundo a Resolução nº 46 e as normas internacionais de alimentos do *Codex Alimentarius*, o kefir, deve possuir um percentual de ácido láctico menor que 1% e conteúdo de etanol entre 0,5% e 1,5%, além de contagem de bactérias lácticas totais de no mínimo 10^7 Unidades Formadoras de Colônia (UFC/g) e contagem de leveduras específicas de no mínimo 10^4 UFC/g (BRASIL, 2007; FAO/WHO. 2011).

Conforme Davras et al. (2018), o kefir possui ação probiótica devido aos microrganismos presentes nos seus grãos e consecutivamente o consumo regular de produtos fermentados de kefir é atribuído à benefícios imunológicos, imunoprotetotores e anti-inflamatórios no trato gastrointestinal (TGI). Em estudos com camundongos onde o TGI foi induzido a inflamações evidenciou-se que o consumo regular de kefir obteve respostas significativas na atenuação das inflamações e teve ação imunoprotetora contra colites (FÁBREGA et al. 2017; SEO et al. 2018).

3.6 ATIVIDADE ENZIMÁTICA NA FERMENTAÇÃO DE KEFIR

Durante a fermentação dos grãos de kefir ocorrem processos enzimáticos, os quais, hidrolisam substâncias maiores em compostos menores (poli e dissacarídeos para monossacarídeos) que serão metabolizados mais facilmente para a produção de compostos orgânicos e ácidos (KONKIT e KIM, 2016). Assim, avaliar as atividades enzimáticas envolvidas na fermentação se torna importante, uma vez que à variedade de enzimas presentes neste processo são as principais responsáveis pela catálise, hidrólise e metabolismo para formação de novos compostos (GAHRUIE et al., 2015; DAS et al., 2019).

A amilase é uma das principais enzimas utilizadas na produção de alimentos, sendo responsável pela catálise e hidrólise da conversão do amido em açúcares. A α-amilase, e β-amilase, por meio da hidrólise de ligações glicosídicas, são as enzimas responsáveis pelas maiores produções de açúcares redutores a partir do amido (SOTTIRATTANAPAN et al., 2017). Sendo especificamente a α-amilase, que possui ação em ligações (α-1→4) glicosídicas, a enzima responsável pela produção de moléculas de glicose a partir da hidrólise dos oligossacarídeos. A glicose durante o processo fermentativo do kefir pode vir a ser metabolizada para a produção de ácidos, compostos orgânicos e ainda atuar no crescimento celular dos grãos (KONKIT e KIM, 2016).

A inulina (polissacarídeo não-estrutural) é a fonte energética mais presente na natureza depois do amido (SAAD, 2006) e a inulinase pode ser encontrada em diversos grupos de microrganismos, plantas e animais (SINGH; SINGH, 2019). Sendo as bactérias *Xanthomonas* sp., *Streptomyces* sp., *Bacillus* sp.; os fungos *Aspergillus* sp., *Rhizopus* sp., *Penicillium* sp., *Rhizoctonia* sp.; e as leveduras *Cryptococcus* sp., *Phichia* sp., *Kluyveromyces* sp., as principais fontes em potencial estudas para a inulinase (SINGH et al., 2020). A inulinase é metabolizada por dois tipos de enzimas: as exo-inulinases (β-D-frutano) que separam as moléculas de frutose através da clivagem do terminal não redutor β - (2→1) da cadeia de inulina; e as endo-inulinases (2→1 β-D-frutano) que liberam FOS a partir da hidrólise das ligações internas da inulina (SINGH et al., 2020). No processo fermentativo a ação catalítica da inulinase em inulina disponibiliza glicose e frutose para a metabolização e produção de ácidos orgânicos e etanol (SINGH; SINGH, 2019).

As peroxidases possuem ação enzimática por meio da oxidação de peróxidos (cofator peróxido de hidrogênio H_2O_2) e suas principais fontes são microrganismos, animais e plantas

(MEDINA et al., 2017; LI et al., 2020). São consideradas também enzimas oxirredutoras, responsáveis pela oxidação, redução e degradação de vários substratos como compostos aromáticos e fenólicos (AGUIAR; FERREIRA; MONTEIRO, 2010; MEDINA et al., 2017; DE OLIVEIRA et al., 2018). Ainda, de acordo com McCue e Shetty (2005) e Aguiar, Ferreira e Monteiro (2010), a ação enzimática da peroxidase está relacionada com o aumento da disponibilização de compostos fenólicos totais, uma vez que, a peroxidase na presença reativa de O_2 degrada e quebra as ligações poliméricas dos fenólicos por meio de co-oxidação, disponibilizando assim, fenólicos livres. As peroxidases ainda podem ser atribuídas à maior biodisponibilidade de micronutrientes, uma vez que, devido às suas características de oxirredução possuem sítios ativos de ligações em minerais como magnésio, vanádio, selênio e ferro (BUCHERT, et al., 2010; Li et al., 2020).

Quanto à aplicação tecnológica das enzimas, em alimentos, a α-amilase atua como estabilizante melhorando a textura e ainda aumenta o volume/rendimento dos alimentos (GREWAL et al., 2015; ZHANG et al., 2019). A indústrias alimentícia utiliza a aplicação hidrolítica da α-amilase principalmente para a produção de edulcorantes. Ainda devido as características higroscópicas da α-amilase, esta pode atuar como reguladora de umidade melhorando a vida de prateleira dos alimentos (SINDHU et al., 2021). A inulinase quando adicionada em iogurtes ou leites fermentados melhora a emulsificação e aumenta a firmeza destes a partir da formação de géis (aumento da viscosidade) (LÓPEZ-ALT, 2017; COLLADOS et al., 2020). A inulinase ainda é utilizada para a produção de vários metabólitos industriais, como ácidos orgânicos (ácido glutâmico, ácido láctico, ácido succínico, ácido butírico, ácido cítrico, ácido propiônico, entre outros) e para biocombustíveis (etanol, butanol e acetona) (SINGH; SINGH, 2019). A peroxidase tem sido aplicada na indústria alimentar juntamente com outras enzimas para a formação de coloides, principalmente para a obtenção de emulsões e géis (ZAIDEL; CHRONAKIS; MEYER, 2013; LIVNEY, 2015). Também devido às suas características oxirredutoras para formar radicais livres, a peroxidase tem sido aplicada a nanopartículas para o encapsulamento de compostos bioativos (HECK et al., 2013; LI et al., 2020). De acordo com Sindhu et al. (2021), grande parte das indústrias de alimentos utilizam enzimas em seus processamentos para melhorar as características sensoriais, principalmente em alimentos ricos em lipídios.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi dividido em duas etapas. A primeira etapa foi realizada na Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus* de Erechim – RS, que consistiu no delineamento fatorial para definição da formulação do substrato com o extrato hidrossolúvel de coco, inulina, goma xantana e o açúcar de coco, seguido do processo de fermentação do kefir de água para o desenvolvimento da bebida fermentada. A partir desta, já formulada, foram realizadas as análises quanto aos parâmetros fermentativos como: controle de pH, produção de CO_2 e ácido láctico, crescimento celular dos grãos e o rendimento da bebida, seguida da avaliação dos compostos orgânicos e atividades enzimáticas, produzidos durante a fermentação do kefir. A segunda etapa foi realizada na Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus* de Laranjeiras do Sul – PR, na qual, foi realizada a caracterização físico-química da bebida fermentada desenvolvida.

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Matérias-primas

Para este estudo utilizou-se culturas de grãos de kefir de água, adquiridas de doação de um produtor local de Guarapuava-PR. O coco seco (*Cocos nucifera* L.) e o açúcar de coco (THAISUGAR) foram adquiridos em comércios locais de Erechim-RS. A inulina (Fiber Bem, Holanda) e goma xantana foram adquiridas na Gastronomy Lab®.

4.1.2 Equipamentos

Os equipamentos utilizados neste estudo foram: Balança analítica (Shimadzu, HUY220, Filipinas); Liquidificador industrial (Vitax, LQI-06, Brasil); pHmetro (Dgimed, DM 20, Brasil); Agitador magnético com aquecimento (Nova Instrumentos, Brasil); Estufa com circulação e renovação de ar (Solab, SL-102, Brasil); Mufla (Zezimaq, 2000G, Brasil); Bloco digestor (Tecnal, TE-040/25, Brasil); Destilador de nitrogênio (Tecnal, TE-0363, Brasil); Centrífuga refrigerada (Sigma®, 3-16KL, Alemanha); Vortex (Marconi, NA162, Brasil), Espectrofotômetro UV-VIS (FEMTO-cirrus 80, Brasil), Cromatógrafo líquido de alta eficiência

– CLAE (Shimadzu, LC-2010, Brasil) equipado com detector de índice de refração de RID 10-A e uma coluna AMINEX® BIORAD HPX87H, Kit PowerSoil DNA Isolation (MO BIO Laboratories, EUA), Refratômetro digital portátil (ATC, RTS – 101, Brasil), Banho termostático com circulação interna (Tecnal, TE-184, Brasil), Termômetro de mercúrio (Incoterm, Brasil), Incubadora Orbital *Shaker* (Marconi, MA420, Brasil) e Colorímetro (Konica Minolta, CR-400, Brasil).

4.1.3 Reagentes

Os reagentes utilizados foram, Ácido Sulfúrico P.A. 98-98% (Vetec®); Clorofórmio 99% (Alphatec®); Hidróxido de Sódio P.A 99% (Neon®); Sulfato de Potássio; Sulfato de Cobre II P.A. (Dinâmica®); Sulfato de Potássio P.A. (Dinâmica®); Sulfato de Sódio Anidro P.A. (Êxodo Científica®); Metanol 99% (Impex®); Ácido Clorídrico P.A 37% (Alphatec®); Ácido Bórico (Neon comercial); fenolftaleína (Vetec®); Álcool Étílico P.A 99,9% (Neon comercial); Tartarato de Sódio P.A. (Êxodo Científica®); Guaiacol 1% (Dinâmica®); Peróxido de hidrogênio 8% (Alphatec®); DNS 3,5 (ácido dinitrosalicílico) (Dinâmica®); Amido Solúvel 1% (Nox®); Arabinose (Dinâmica®); Ácido Acético P.A. (Êxodo Científica®); Ácido Fórmico P.A. (Neon comercial); Frutose (Êxodo Científica®); Glicose (Êxodo Científica®); Acetonitrila (Alphatec®).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Preparo do extrato vegetal hidrossolúvel de coco (EVHC)

Para o preparo do substrato, foram pesadas 100 g da polpa do coco seco (*in natura)* para 1000 mL de água mineral filtrada (1:10 m/v), os quais, foram transferidos para liquidificador e desintegrados por 10 minutos em velocidade média. Após esse tempo, a mistura foi filtrada, com o auxílio de uma peneira revestida com tecido de algodão, para a separação do material particulado com posterior pasteurização do extrato vegetal obtido, em banho termostático a 90 ± 1 °C por 3 minutos, seguido de resfriamento até a temperatura de 20 ± 1 °C, conforme a metodologia de Yaakob et al., (2012).

4.2.2 Manutenção e fermentação da cultura de Kefir de água

O processo de fermentação foi realizado em *Erlenmeyer* de 250 mL, com capacidade de volume para o substrato de 100 mL. Os grãos de kefir foram mantidos em solução aquosa (água filtrada) com sacarose (açúcar mascavo (Mãe Terra)) com concentração de sólidos solúveis (SS) de aproximadamente 5 ºBrix e temperatura fixada a 25 ± 1 °C em incubadora *Shaker* (Marconi, MA420, Brasil), sem agitação, a fim de se manter a cultura ativa e viável para a fermentação no substrato de EVHC.

Para a fermentação no EVHC foram incubados 5% m/m da cultura de kefir no substrato a temperatura fixa de 25 ± 1 °C, com concentração de SS de aproximadamente 9 ºBrix, sem agitação em incubadora *Shaker*. Ainda, após a inoculação, os *Erlenmeyer* foram recobertos com gazes estéreis. Durante este período realizou-se o controle do pH por leitura direta nas amostras, nos tempos de fermentação 0, 24 e 48 horas, conforme o método n° 017/IV (INSTITUTO ADOLF LUTZ, 2008). Em seguida o substrato de EVHC, foi filtrado com o auxílio de uma peneira, separando a bebida fermentada dos grãos de kefir. Posteriormente os grãos de kefir foram retirados e incubados novamente em novo substrato de água com 5% de sacarose (m/v) (açúcar mascavo) para sua manutenção e viabilidade. Paralelamente, a bebida fermentada de EVHC obtida foi armazenada em frascos de vidro (previamente esterilizados) sob refrigeração (4 ± 1 °C) por 72 horas, conforme a metodologia de Nielsen, Gurakan e Unlu (2014).

4.2.3 Delineamento Composto Central para produção da bebida fermentada

As formulações do substrato de EVHC quanto às concentrações de açúcar de coco, de inulina e de goma xantana, foram definidas por meio da aplicação de um delineamento composto central (DCC) 2^3. Os níveis mínimos e máximos das concentrações foram definidos a partir dos limites legais estabelecidos, dados disponíveis na literatura (YAAKOB et al., 2012; BEZERRA et al., 2019) e testes preliminares, conforme apresentado na Tabela 2.

TABELA 2. Níveis das variáveis independentes do planejamento experimental.

Variáveis independentes	**Níveis**		
	-1	**0**	**+1**
Açúcar de coco (%) – X_1	2,0	6,0	10,0
Inulina (%) – X_2	2,0	2,5	3,0
Goma xantana (%) – X_3	0,01	0,13	0,26

Foi empregado o fatorial 2^3, com ponto central repetido três vezes (nível 0), totalizando assim, 11 ensaios, como mostra a Tabela 3. Os dados obtidos no delineamento fatorial foram tratados estatisticamente com auxílio do *Protimiza Experimental Design*. Uma análise de variância (ANOVA) e de regressão também foram aplicados (nível de confiança de α = 5%), com o intuito de testar a adequação dos modelos gerados.

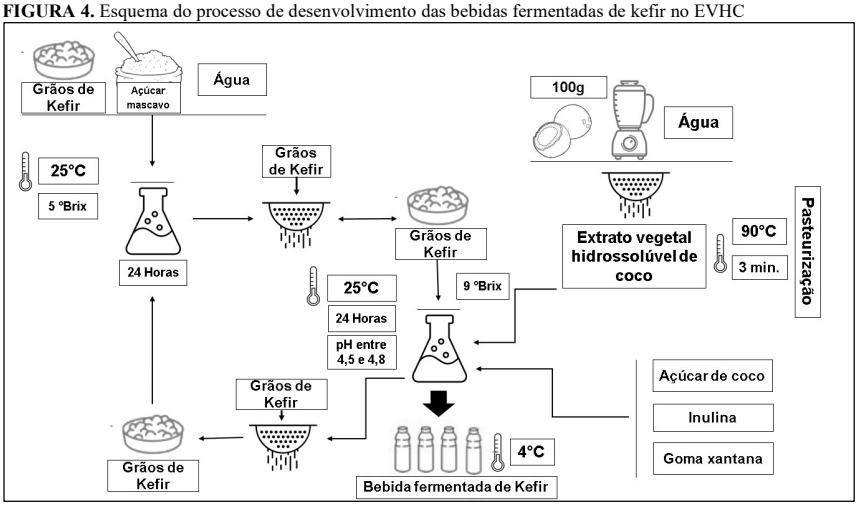
TABELA 3. Concentrações de açúcar de coco, inulina e goma xantana, definidas por DCC para as formulações da bebida fermentada no EVHC

Formulação	**Concentrações**					
	Açúcar de coco (X_1)		**Inulina (X_2)**		**Goma xantana (X_3)**	
	VC *	VR (%) **	VC	VR (%)	VC	VR
F1	-1	2,0	-1	2,0	-1	0,01
F2	1	10,0	-1	2,0	-1	0,01
F3	-1	2,0	1	3,0	-1	0,01
F4	1	10,0	1	3,0	-1	0,01
F5	-1	2,0	-1	2,0	1	0,26
F6	1	10,0	-1	2,0	1	0,26
F7	-1	2,0	1	3,0	1	0,26
F8	1	10,0	1	3,0	1	0,26
F9	0	6,0	0	2,5	0	0,13
F10	0	6,0	0	2,5	0	0,13
F11	0	6,0	0	2,5	0	0,13

*VC = valores codificados **VR = valores reais

As etapas do processo de manutenção e fermentação dos grãos de kefir de água seguido do desenvolvimento das formulações das bebidas fermentadas de kefir estão representadas conforme a Figura 4.

FIGURA 4. Esquema do processo de desenvolvimento das bebidas fermentadas de kefir no EVHC



FONTE: Elaborado pelo autor, 2020.

Para as 11 formulações definidas pelo DCC foram realizadas as análises de crescimento celular dos grãos, rendimento da bebida, pH, sólidos solúveis, produção de dióxido de carbono (CO_2) e de ácido láctico.

4.2.4 Crescimento celular dos grãos de kefir no EVHC

O crescimento celular dos grãos de kefir (Δm), fermentado nos substratos de EVHC, foi determinado pela metodologia de Nogueira et al., (2016). Foi calculado por meio da Equação 1, em que as massas de grãos de kefir (g) foram pesadas no início (m_{k0}) e após a fermentação (m_{kf}) (base úmida).

$$\Delta m \left(\frac{g}{100\ g}\right) = \frac{(m_{kf} - m_{k0})}{m_{k0}} . 100 \qquad \text{Equação 1}$$

4.2.5 Rendimento da bebida fermentada de kefir no EVHC

O rendimento (R) foi determinado pela metodologia de Nogueira et al., (2016), por meio da Equação 2, em que m_{s0} corresponde a massa inicial e m_{sf} *a* massa final da bebida fermentada de kefir nos substratos de EVHC, respectivamente.

$$R\left(\frac{g}{100\ g}\right) = \frac{m_{sf}}{m_{s0}}.100 \qquad \text{Equação 2}$$

4.2.6 Produção de dióxido de carbono (CO_2) na fermentação de kefir no EVHC

Para a análise da produção de CO_2 foram utilizados os dados obtidos da pesagem das massas iniciais e finais da bebida fermentada de kefir nos substratos de EVHC. E os resultados foram expressos em % de CO_2, conforme a Equação 3.

$$CO_2\ (\%) = \frac{1-(m_{sf}+ m_{kf})}{m_{k0}+m_{s0}}.100 \qquad \text{Equação 3}$$

4.2.7 Determinação de ácido láctico por acidez titulável

Para determinar a produção de ácido láctico, na bebida fermentada de kefir nos substratos de EVHC, foi utilizado o método de acidez titulável, a qual, foi realizada em triplicata, pelo método titulométrico *da Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2012), nos tempos 0, 24 e 48 horas do processo de fermentação. Para isso, pipetou-se 5,0 mL de alíquota de cada uma das 11 formulação das bebidas de kefir fermentadas no EVHC para um béquer de 100 mL, com adição de 15 mL de água destilada (1:3 v/v), com posterior adição de 3 gotas de fenolftaleína como indicador do ponto de viragem (obtenção de coloração rosa), sob agitação magnética e as amostras foram tituladas com NaOH (0,1 mol/L). Os resultados foram expressos em g/100mL de ácido láctico, conforme a Equação 4.

$$Ácido\ láctico\ \left(\frac{g}{100\ mL}\right) = \frac{V \times f \times 0{,}9}{m}.100 \qquad \text{Equação 4}$$

Onde:
V = volume gasto na bureta
f = Fator de correção de NaOH (Mol/L)
m = massa da amostra (g)
0,9 na Equação corresponde a 1 mL de NaOH.

4.2.8 Determinação da atividade enzimática de amilases

Para esta análise diluiu-se 0,18 g de amido solúvel (1%) em um tampão acetato de sódio 0,1 mol/L com pH 5,0, na proporção 1:25 (m/v). Posteriormente, uma alíquota de 1 mL desta solução foi adicionada à 1 mL do extrato enzimático seguido de banho termostático, com circulação interna, por 10 minutos a 38 ± 1 °C, conforme a metodologia de Fuwa (1954) e Pongsawadi e Yagisawa (1987), com adaptações. Para todas as amostras foram feitas triplicatas e um branco (controle), no qual, a alíquota do extrato enzimático foi substituído por água destilada.

A atividade enzimática foi determinada pelo método DNS (ácido dinitrosalicílico), na qual, 0,5 mL de alíquota da solução foi adicionada a 0,5 mL da solução de DNS, com posterior banho termostático a 100 ± 1 °C, por 10 minutos, seguido de banho de gelo até atingir a temperatura ambiente (MILLER, 1959). Em seguida foi adicionado 8 mL de uma solução de tartarato de sódio a solução obtida. Os resultados da atividade enzimática (AE) foram determinados com base na curva padrão de calibração de absorção gerada pela Equação 5 e leitura em espectrofotômetro UV-VIS na faixa do visível de 540 nm.

$$\text{AE} = (y)\frac{U}{mL} = 0{,}2922\ .x\ \left(\frac{g}{L}\right) - 0{,}0304 \qquad \text{Equação 5}$$

4.2.9 Determinação da atividade enzimática de peroxidases

Para a análise desta atividade enzimática foi necessário o preparo de um meio reacional, o qual consistia de 1,5 mL de tampão fosfato (5.10^{-3} mol/L e pH 5,0), 2 mL de água destilada, 0,5 mL de guaiacol (1 %) e 1 mL de peróxido de hidrogênio (8 %) com posterior adição do mesmo em banho termostático a 35 ± 1 °C, por 10 minutos. Após a estabilização da temperatura

adicionou-se uma alíquota de 1 mL de extrato enzimático a esta solução e a mesma foi mantida em banho termostático por mais 20 minutos (KHAN e ROBINSON, 1994).

Para todas as amostras foram feitos ensaios em triplicatas e um branco (controle), no qual a alíquota do extrato enzimático foi substituída por água destilada. Os resultados da atividade enzimática foram determinados por leitura em espectrofotômetro UV-VIS na faixa do visível de 470 nm. O cálculo da medida da atividade enzimática foi realizado através da média dos valores da triplicata, multiplicado por 1000 (diluição).

4.2.10 Determinação da atividade enzimática de inulinase

A atividade enzimática da inulinase foi analisada a partir da adição de 0,5 mL da amostra em solução de 4,5 mL de sacarose (2 % m/v), preparada em tampão acetato de sódio 0,1 mol/L com pH 5,0. Em seguida a solução passou por banho termostático a 50 ± 1 °C, por 2 minutos. Após este tempo foi retirado uma alíquota de 0,5 mL da solução e adicionado 0,5 mL da solução de DNS, para a determinação da concentração de açúcares redutores. Esta solução se manteve em banho termostático por mais 5 minutos a 100 ± 1 °C, seguido por banho de gelo até atingir a temperatura ambiente (25 ± 1 °C), então foi adicionada 8 mL de solução de tartarato de sódio (MILLER, 1959). Para o branco (controle) foi substituído a alíquota das amostras por água destilada. Para todas as análises foram realizadas triplicatas. Os resultados da atividade enzimática (AE) foram determinados com base na curva padrão de calibração de absorção (Equação 5) e leitura de absorbância em espectrofotômetro UV-VIS na faixa do visível de 540 nm.

4.2.11 Análise de compostos orgânicos

A quantificação dos compostos orgânicos (ácido acético, ácido fórmico, arabinose, celobiose, etanol, frutose e glicose), produzidos durante a fermentação, foram obtidos por Cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE. Os ensaios cromatográficos foram conduzidos em um equipamento CLAE equipado com detector de índice de refração de RID 10-A e uma coluna AMINEX® BIORAD HPX87H.

As análises foram realizadas conforme a metodologia descrita por Bazoti et al. (2017), na qual, antes da realização dos ensaios cromatográficos, houve o preparo das amostras das

bebidas fermentadas de kefir nos substratos de EVHC com pré-filtração e diluição destas em água destilada (1:5 v/v), com posterior injeção do volume de 20,0 µL das amostras ao cromatógrafo, acoplado a um detector PDA 10-A, operado com uma coluna C18, eluída com acetonitrila 1:8 mL/minuto de água e ácido acético a 1%, termostatizada a 30 ± 1 °C e com velocidade de fluxo da fase móvel de 0,8 mL/minuto. Os compostos orgânicos foram determinados a partir da calibração das curvas de cada composto.

4.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

4.3.1 Umidade

A umidade foi determinada pela pesagem de 2 g de cada amostra em cadinho de porcelana com o auxílio de uma balança analítica e após previamente secas e pesadas, foram submetidas à secagem em estufa a 105 ± 1 °C até massa constante. Todas as amostras foram analisadas em triplicatas. Os resultados foram expressos em g/100g de umidade em base úmida da amostra (AOAC, 2012).

4.3.2 Cinzas

As cinzas foram determinadas por calcinação em mufla a 550 °C até ocorrer a queima da matéria orgânica. Todas as amostras foram analisadas em triplicatas. Os resultados foram expressos em g/100g de cinzas em base úmida da amostra (AOAC, 2012).

4.3.3 Sólidos solúveis (SS)

Os teores de sólidos solúveis (SS) foram verificados em triplicata, em refratômetro digital portátil, com duas a três gotas do filtrado da amostra e os resultados foram expressos em ºBrix. (INSTITUTO ADOLF LUTZ, 2008).

4.3.4 Lipídeos

Os teores de lipídeos foram analisados pelo método *Bligh Dyer*, através da extração dos compostos a frio. Todas as amostras foram analisadas em triplicatas. Os resultados foram expressos em g/100g de lipídeos da amostra (AOAC, 2012).

4.3.5 Proteínas

Os teores de proteínas foram determinados pelo método de *Kjeldahl*, com 0,5 g de amostra. A partir do teor de amônia encontrado nas amostras pela transformação do nitrogênio em sulfato de amônia por digestão em ácido sulfúrico através de destilação e titulação que foi convertido em proteína bruta. Todas as amostras foram analisadas em 4 replicatas e o valor obtido foi multiplicado pelo fator de correção (FC) para coco de 5,30. Os resultados foram expressos em g/100g de proteína bruta (AOAC, 2012).

4.3.6 Carboidratos

Os carboidratos totais foram determinados a partir do cálculo do método de diferença, conforme a Equação 6.

$$\text{Carboidratos } g/100g = 100 - (\text{umidade} + \text{cinzas} + \text{lipideos} + \text{proteína}) \qquad \text{Equação 6}$$

4.3.7 Análise de cor

A cor foi determinada pelo sistema CIELab em colorímetro e iluminante D65, através dos parâmetros L* (luminosidade), a* (coordenada do eixo vermelho-verde), b* (coordenada do eixo azul-amarelo), croma (C * - intensidade da cor) e ângulo de matiz (h ° - cor observável) (HUNTERLAB, 1996). As amostras foram colocadas em placa de Petri e realizada a leitura em três pontos distintos em triplicata.

4.4 IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS

As amostras foram pré-preparadas a partir da maceração de 5 g dos grãos de kefir adaptados ao EVHC, seguido de centrifugação a 560xG (força G) por 5 minutos em centrifuga e 3,5 g de amostra dos grãos foram transferidos para tubos *Eppendorf* e congelados em ultrafreezer (-18 °C). A identificação dos microrganismos presentes no processo de fermentação, foi realizada a partir da extração do material genético utilizando 1 g da amostra de biomassa pelo *PowerSoil* DNA *Isolation Kit* (MO BIO *Laboratories*, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. As regiões V3-V4 foram amplificadas com os *primers* 341F e 806 R, respectivamente, segundo Caporaso et al., (2011) e Wang e Qian, (2009). As bibliotecas foram sequenciadas em um sistema MiSeq, usando os *primers* padrões Illumina já fornecidos no kit. As sequências agrupadas das unidades taxonômicas operacionais (UTOs) foram submetidas à classificação taxonômica em bancos de dados de serviço de árvores, considerando as sequências com pelo menos de 99% de identidade com o banco de dados de referência.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram feitas a partir da análise de variância (ANOVA) com o auxílio do *software Action Static* versão 3.7 e quando os resultados do *teste F* de regressão foram significativos, as médias foram comparadas pelo teste de *Tukey* ($p \leq 0,05$). Também foram utilizados os *softwares* estatísticos *Protimiza Experimental Design* para a aplicabilidade do método de DCC e o *software Statistica* versão 8.0 para a análise de componentes principais (ACP) das formulações da bebida fermentada de kefir no EVHC.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL (DCC)

Os resultados para o crescimento celular dos grãos de kefir (Δm), rendimento da bebida (R) e a acidez (produção de ácido láctico) nas formulações das bebidas fermentadas com kefir no EVHC podem ser observados na Tabela 4.

TABELA 4. Ensaios e variáveis respostas do delineamento fatorial das formulações das bebidas fermentadas com kefir em EVHC adicionadas de açúcar de coco, inulina e goma xantana.

Formulação	Concentrações						Variáveis Respostas		
	Açúcar de coco (X_1)		Inulina (X_2)		Goma xantana (X_3)		Crescimento celular (Δx) (Y_1)	Rendimento bebida (R) (Y_2)	Ácido láctico (Y_3)
	VC *	VR ** (%)	VC	VR (%)	VC	VR (%)	VR (g/100g)	VR (g/100g)	VR (g/100mL)
F1	-1	2,0	-1	2,0	-1	0,01	38,02	77,78	0,69
F2	1	10,0	-1	2,0	-1	0,01	38,12	75,88	0,87
F3	-1	2,0	1	3,0	-1	0,01	90,89	64,16	0,68
F4	1	10,0	1	3,0	-1	0,01	88,47	67,85	0,83
F5	-1	2,0	-1	2,0	1	0,26	25,98	78,38	0,86
F6	1	10,0	-1	2,0	1	0,26	23,44	86,31	0,88
F7	-1	2,0	1	3,0	1	0,26	69,21	68,18	0,77
F8	1	10,0	1	3,0	1	0,26	73,81	67,96	0,87
F9	0	6,0	0	2,5	0	0,13	67,23	70,31	1,00
F10	0	6,0	0	2,5	0	0,13	61,78	74,99	1,01
F11	0	6,0	0	2,5	0	0,13	63,99	73,68	1,00

*VC = valores codificados **VR = valores reais

A partir dos resultados apresentados na Tabela 4, gráficos de Pareto e uma análise de regressão foram aplicados para avaliar se as variáveis açúcar de coco (X_1), inulina (X_2), goma xantana (X_3) e suas interações (X_1 *x* X_2 *x* X_3) possuíam efeito significativo ($p \leq 0,05$) nas respostas crescimento celular dos grãos de kefir (Y_1), rendimento da bebida fermentada (Y_2) e produção de ácido láctico (Y_3) em um intervalo de confiança de 95% (α = 5%). Conforme mostra a Figura 5 e a Tabela 5.

FIGURA 5. Gráficos de Pareto quanto a significância nas variáveis das formulações de kefir no EVHC pela adição de açúcar de coco, inulina e goma xantana (x) sobre (y) (a) crescimento dos grãos de kefir; (b) rendimento da bebida e (c) produção de ácido láctico

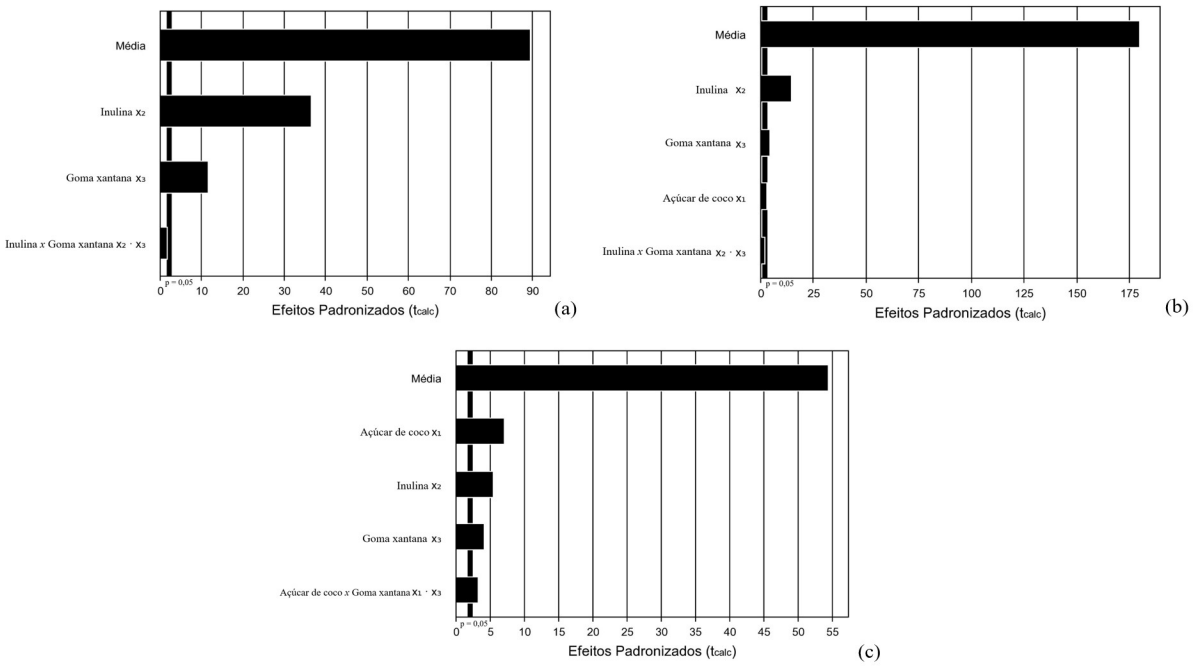


TABELA 5. Análise de regressão para as variáveis açúcar de coco, inulina e goma xantana e suas interações quanto ao crescimento celular, rendimento da bebida fermentada e produção de ácido láctico

Crescimento celular dos grãos de kefir				
Nome	Coeficiente	Erro padrão	t calculado	p-valor *
Média	56,92	0,64	89,57	0,00
Inulina (X_2)	24,60	0,67	36,50	0,00
Goma xantana (X_3)	- 7,88	0,67	- 11,70	0,00
Inulina *x* goma xantana ($X_2 x X_3$)	- 1,20	0,67	- 1,78	0,05
Rendimento da bebida fermentada				
Nome	Coeficiente	Erro padrão	t calculado	p-valor
Média	73,28	0,41	180,11	0,00
Açúcar de coco (X_1)	1,19	0,43	2,75	0,01
Inulina (X_2)	6,28	0,43	- 14,54	0,00
Goma xantana (X_3)	1,90	0,43	4,39	0,00
Inulina *x* goma xantana ($X_2 x X_3$)	- 0,86	0,43	- 2,00	0,05
Produção de ácido láctico				
Nome	Coeficiente	Erro padrão	t calculado	p-valor
Média	0,97	0,02	54,51	0,00
Açúcar de coco (X_1)	0,13	0,02	7,10	0,00
Inulina (X_2)	- 0,10	0,02	- 5,38	0,00
Goma xantana (X_3)	0,08	0,02	4,18	0,00
Açúcar de coco *x* goma xantana ($X_1 x X_3$)	0,06	0,02	3,25	0,03

* Foram descartadas as interações (X) que não possuíam significância estatística ($p \leq 0,05$) sobre as respostas (Y).

Os valores obtidos na Tabela 5, são resultantes da interação entre as variáveis independentes açúcar de coco (X_1), inulina (X_2) e goma xantana (X_3) com as variáveis respostas dependentes (Y), que neste estudo foram o crescimento celular dos grãos de kefir (Y_1), rendimento da bebida fermentada (Y_2) e a produção de ácido láctico (Y_3), que podem ser apresentadas também a partir das Equações 7, 8 e 9 do modelo codificado, respectivamente.

$$Y_1 = 56{,}92 + 24{,}60\ (X_2) - 7{,}88(\ X_3) - 1{,}20(\ X_2X_3) \qquad \text{Equação 7}$$

$$Y_2 = 73{,}28 + 1{,}19\ (X_1) + 6{,}28(\ X_2) + 1{,}90(\ X_3) - 0{,}86\ (X_2X_3) \qquad \text{Equação 8}$$

$$Y_3 = 0{,}97 + 0{,}13\ (X_1) - 0{,}10\ (\ X_2) + 0{,}08\ (\ X_3) + 0{,}06\ (X_1X_3) \qquad \text{Equação 9}$$

Assim, quanto ao crescimento celular dos grãos de kefir (Y_1), as variáveis independentes inulina (X_2) e goma xantana (X_3) e a interação entre inulina:goma xantana ($X_2 x X_3$) possuem efeito estatisticamente significativo sobre esta resposta ($p \leq 0,05$) (Figura 5a). No que diz

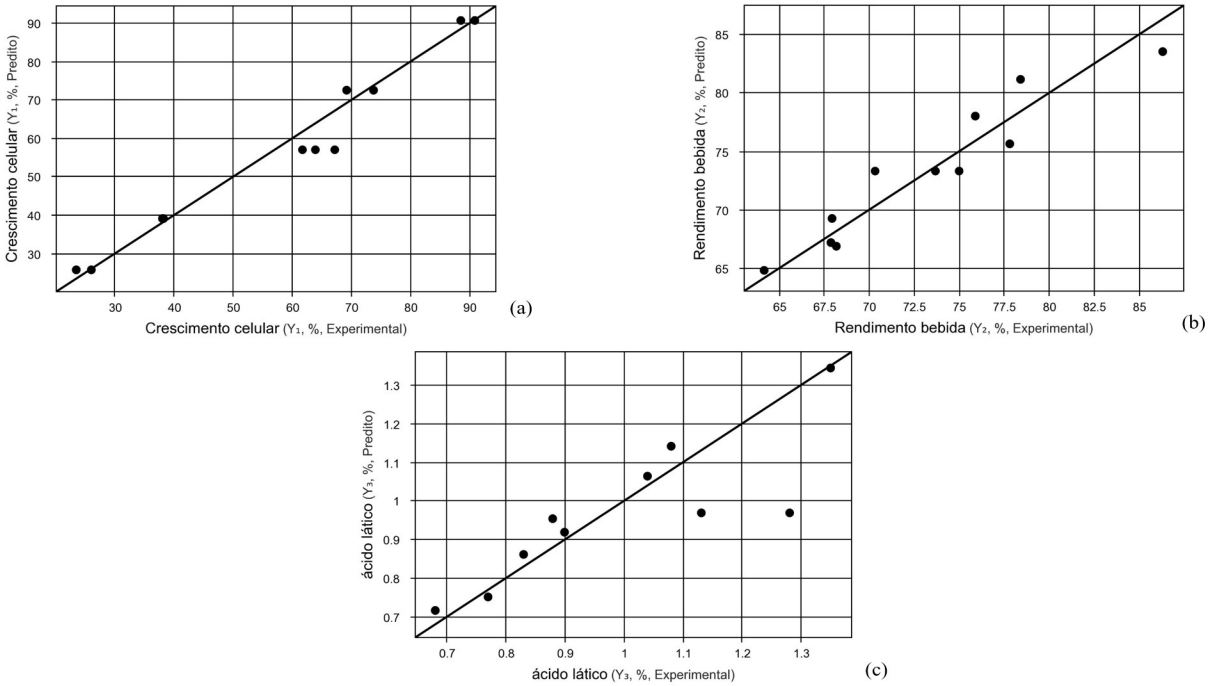
respeito as respostas quanto ao rendimento da bebida fermentada (Y_2) e a produção de ácido láctico (Y_3), todas as variáveis independentes (X_1, X_2 e X_3) estudadas e a interação entre inulina:goma xantana ($X_2 x X_3$) para Y_2 e a interação açúcar de coco:goma xantana ($X_1 x X_3$) para Y_3 apresentaram efeito estatisticamente significativo ($p \leq 0,05$) (Figura 5b e 5c).

Ressalta-se que, para a análise de regressão foram descartadas as interações que não possuíam significância estatística ($p < 0,05$) sobre as respostas (Y), como o açúcar de coco (X_1) na resposta Y_1 e as interações entre açúcar de coco:inulina ($X_1 x X_2$) em todas as respostas (Y) estudadas (dados não apresentados).

A partir da análise de regressão também foi determinada a existência de uma relação linear entre as respostas (Y), apresentadas pelos valores experimentais *versus* os preditos, que mostrou uma distribuição normal para a resposta de crescimento celular dos grãos de kefir (Y_1) (Figura 6a), já para as respostas de rendimento da bebida (Y_2) e produção de ácido láctico (Y_3), esta distribuição se apresentou de forma mais aleatória (Figura 6b e 6c), ou seja, quanto mais próximos os pontos estiverem na linha mais relacionadas às respostas vão estar entre si.

Com isso, a análise de relação linear indica que a resposta Y_1 é a que melhor correlaciona os resultados experimentais com os previstos em relação às demais respostas estudadas.

FIGURA 6. Relação linear das respostas (a) crescimento celular dos grãos de kefir (Y_1); (b) rendimento da bebida fermentada (Y_2) e (c) produção de ácido láctico (Y_3) através dos valores experimentais e preditos



Os resultados para a ANOVA do modelo de regressão para o crescimento celular dos grãos de kefir, rendimento da bebida fermentada e produção de ácido láctico para a bebida de kefir fermentada no EVHC estão apresentados na Tabela 6.

TABELA 6. Análise de ANOVA para o modelo codificado com nível de 95% de confiança para o crescimento celular dos grãos de kefir, rendimento da bebida fermentada e produção de ácido láctico

Crescimento celular dos grãos de kefir						
Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	$F_{calculado}$	$F_{tabelado}$	p-valor
Regressão	4,3	3	0,6	6,9	4,5	0,00
Resíduo	0,5	7	0,1			
Falta de ajuste	0,0	5	0,1			< 0,01
Erro puro	0,0	2	0,0			
Total	4,8	10				
					R^2	98,46%
Rendimento da bebida fermentada						
Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	$F_{calculado}$	$F_{tabelado}$	p-valor
Regressão	1,2	4	0,2	6,6	4,5	0,00
Resíduo	0,5	6	0,0			
Falta de ajuste	0,5	4	0,1			< 0,01
Erro puro	0,0	2	0,0			
Total	2,2	10				
					R^2	91,68%
Produção de ácido láctico						
Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	$F_{calculado}$	$F_{tabelado}$	p-valor
Regressão	0,9	4	0,2	4,8	4,4	0,00
Resíduo	0,2	6	0,0			
Falta de ajuste	0,2	4	0,0			< 0,01
Erro puro	0,0	2	0,0			
Total	1,3	10				
					R^2	83,00%

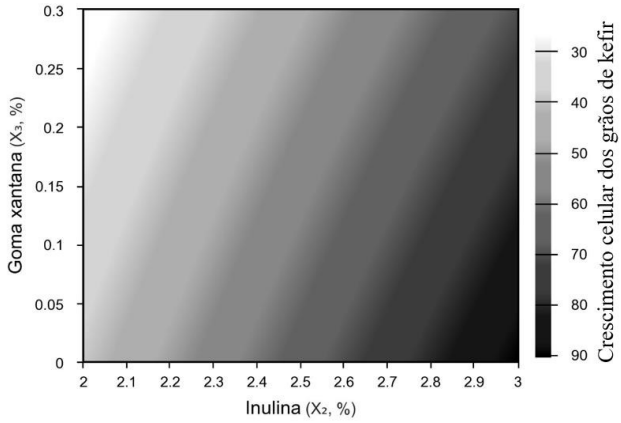
Observou-se a partir dos dados obtidos pela ANOVA que o modelo de regressão, para o crescimento celular dos grãos de kefir, rendimento da bebida fermentada e produção de ácido láctico, foi significativo em um nível de confiança de 95% ($p \leq 0,05$), com coeficientes de determinação (R^2) iguais a 98,46%, 91,68% e 83,00% respectivamente, evidenciando que o modelo codificado se ajusta e explica as variações dos dados experimentais quanto as variáveis e respostas propostas para este estudo. Além disso, a falta de ajuste não foi significativa, demonstrando que o modelo pode ser considerado preditivo.

Ainda a fim de se verificar se o modelo codificado proposto foi adequado em relação aos dados experimentais foram geradas as curvas de contorno, permitindo assim visualizar a

interação das respostas de crescimento celular dos grãos de kefir, rendimento da bebida e produção de ácido láctico (Y) quanto aos parâmetros das concentrações (X) de açúcar de coco, inulina e goma xantana. Assim foi possível constatar que as variáveis independentes (X) influenciaram nas dependentes (Y).

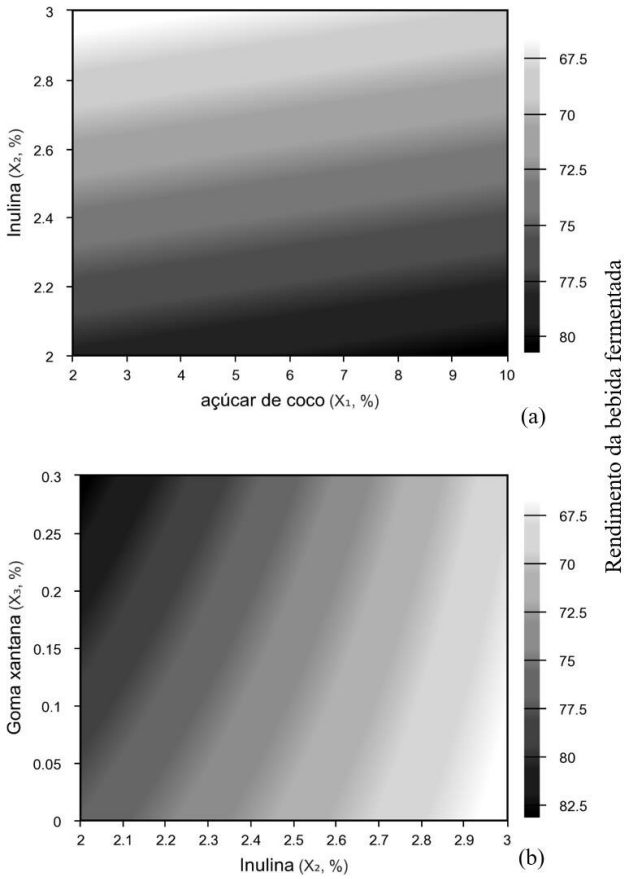
Em relação ao crescimento celular dos grãos de kefir (Y_1), observou-se que este foi maior à medida que as concentrações de inulina ficaram próximas a 2,8 e 3,0%; quanto à adição de goma xantana é possível observar que concentrações de até 0,15% já eram suficientes para influenciar a taxa de crescimento dos grãos em até 90%, onde a área mais escura é considerada o ponto mais representativo do gráfico (Figura 7).

FIGURA 7. Gráfico de curvas de contorno da interação entre as variáveis inulina (X_2) e goma xantana (X_3) no crescimento celular dos grãos de kefir (Y_1) no EVHC



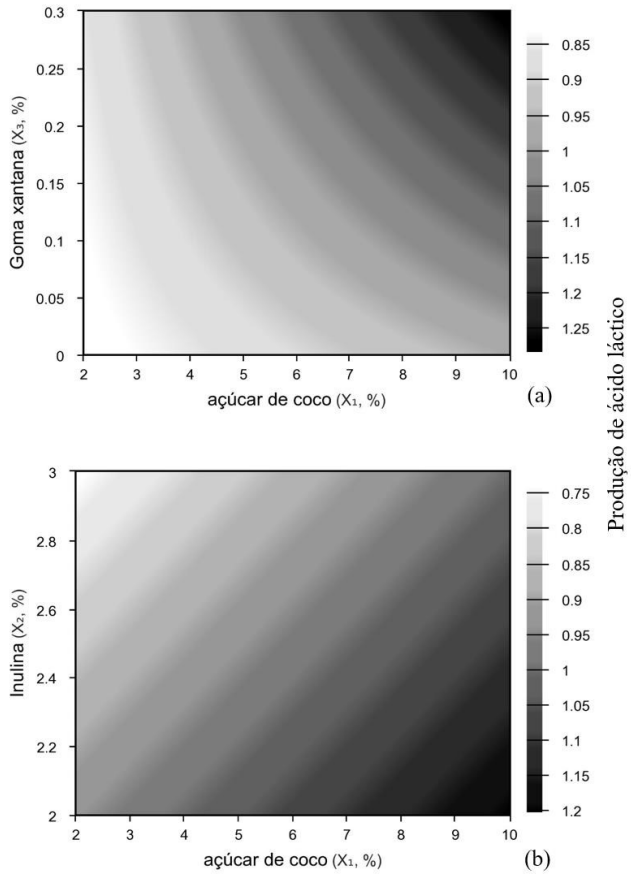
No que diz respeito ao rendimento da bebida fermentada de kefir no EVHC (Y_2), esta teve um rendimento de 80 a 82,5% quando as concentrações de goma xantana e açúcar de coco aumentaram (0,26% e 10% respectivamente) (Figura 8a). Já a adição de inulina não demonstrou ter uma interação importante no rendimento da bebida de kefir em relação ao açúcar de coco e a goma xantana (Figura 8b).

FIGURA 8. Gráficos de curvas de contorno das interações entre as variáveis (a) açúcar de coco (X_1) e inulina (X_2) e (b) inulina (X_2) e goma xantana (X_3) no rendimento da bebida fermentada de kefir (Y_2) no EVHC



Referente à produção de ácido láctico (Y_3), foi possível observar que o aumento das concentrações de açúcar de coco e goma xantana (0,26 e 10% respectivamente) aumentaram a acidez da bebida fermentada de kefir no EVHC em aproximadamente 1,20 a 1,25% como mostra a Figura 9a e 9b. Em relação às concentrações de inulina, pôde-se verificar que seu aumento (até 3,0%) não influenciou de forma importante a produção de ácido láctico (Figura 9b), o que pode indicar que esta foi metabolizada para a produção de outros compostos envolvidos na fermentação do kefir.

FIGURA 9. Gráficos de curvas de contorno das interações entre as variáveis (a) açúcar de coco (x_1) e goma xantana (X_3) e (b) inulina (X_2) e açúcar de coco (X_1) na produção de ácido láctico (Y_3)



A partir da análise dos dados do delineamento fatorial pôde-se constatar que houve uma redução no rendimento da bebida fermentada (Y_2) e consecutivamente aumento no crescimento celular dos grãos de kefir (Y_1), principalmente nas formulações com maiores concentrações de inulina (3,0%). De acordo com Nogueira et al. (2016), isso pode ocorrer pelo fato de que uma maior concentração celular dos grãos de kefir gera um maior consumo de substrato, reduzindo assim o rendimento da bebida. Graça et al. (2018), também observaram resultados similares,

em que o aumento do crescimento celular dos grãos gerou uma redução no rendimento das bebidas fermentadas com grãos de kefir de leite adicionadas na polpa de cupuaçu. Os autores relatam que devido à redução do pH pela adição da polpa houve um aumento da disponibilidade de monossacarídeos (glicose e frutose) que podem ser metabolizados com maior facilidade em relação aos dissacarídeos, à sacarose ou lactose, favorecendo assim, o crescimento mais rápido de algumas espécies de microrganismos presentes nos grãos do kefir, como as leveduras. Lopusiewicz et al. (2020), ainda correlacionam a adição de inulina com o aumento da viscosidade (espessante) em iogurtes, assim, esta ação pode vir a reduzir a mobilidade e disponibilidade dos nutrientes e moléculas de CO_2 no processo fermentativo e consequentemente reduzir o crescimento celular e aumentar o rendimento da bebida. Neste estudo a inulina teve pouca interação no rendimento da bebida fermentada em relação ao açúcar de coco e a goma xantana.

Lopusiewicz et al. (2020), ainda discorrem em seus estudos que a disponibilidade de açúcares simples (monossacarídeos) em extratos vegetais é baixa, sendo metabolizados mais rapidamente pelos microrganismos durante a fermentação. Assim, quando há a disponibilidade da metabolização da inulina na fermentação, passa a ocorrer um efeito sinérgico desta com os microrganismos, devido às propriedades prebióticas da inulina que agem positivamente no crescimento e viabilidade das BAL (DE SOUZA-OLIVEIRA et al., 2009). Bernat et al. (2014), observaram em seus estudos que durante a fermentação de extrato vegetal de avelã o crescimento das BAL ficou limitado à disponibilidade dos teores de glicose e frutose e quando este não foram suficientes ocorreu a metabolização da inulina para a obtenção de energia necessária para o crescimento e viabilidade das BAL, gerando assim maiores quantidades de derivados de inulina.

Em relação à produção de ácido láctico, constatou-se que a acidez variou de 0,68 a 1,01 g/100mL em 24 horas de fermentação dos grãos de kefir no EVHC, como já era esperado para este tipo de fermentação. Conforme com a legislação, a Resolução n° 46, estabelece que o kefir deve possuir acidez máxima (ácido láctico) de 1% (BRASIL, 2007). Neste estudo as formulações F9, F10 e F11 (triplicatas), obtiveram porcentuais de ácido láctico iguais a 1%, estando no limite máximo estabelecido pela legislação. Nos estudos de Norberto et al. (2018), os autores observaram resultados similares a este estudo, nos quais, foram avaliadas três diferentes formulações de bebidas fermentadas com grãos de kefir de água em extrato vegetal de soja e leite de vaca por 19 horas. Todas as formulações apresentaram um aumento na

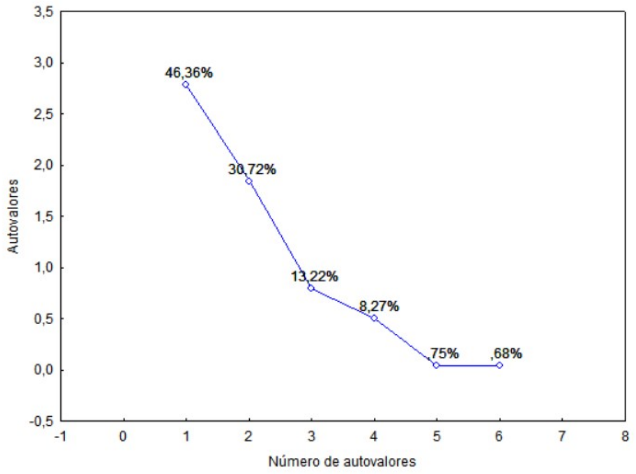
concentração de ácido láctico (0,73 e 0,76 g/100 mL), principalmente nas formulações com leite (100% e 50%), que possuíam maiores quantidades de açúcares disponíveis para a metabolização dos grãos de kefir quando comparadas ao extrato vegetal de soja. De Souza-Oliveira et al. (2009), em seus estudos relataram influência significativa da adição de inulina (4%) na cinética de acidificação na fermentação de leite com BAL, a qual, aumentou a acidez e reduziu o tempo de fermentação, melhorando ainda as taxas de crescimento das BAL.

5.2 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (ACP)

Para verificar se havia uma correlação entre as 11 formulações da bebida fermentada de kefir no EVHC em relação ao crescimento celular dos grãos (Δm), rendimento da bebida (R), pH, sólidos solúveis (SS), produção de ácido láctico e CO_2, aplicou-se uma Análise de Componentes Principais (ACP). A ACP consiste em uma técnica de análise multivariada que transforma um conjunto original de variáveis correlacionáveis em outro conjunto menor não correlacionável (Componentes Principais), que resulta na combinação linear do conjunto original explicando quais variáveis possuem maior relevância a partir de funções matemáticas (HONGYU; SANDANIELO; OLIVEIRA JUNIOR, 2015).

A partir da ACP foram encontrados 6 Componentes Principais (CP's), dos quais, apenas 2 apresentaram autovalores >1 (CP1 46,36% e CP2 30,72%), explicando 77,08% da variância entre as variáveis estudadas (Figura 10). Para selecionar os Componentes Principais que explicaram a maior parte da variação do conjunto de dados a partir do gráfico de *ScreePlot* foi adotado o critério de Kaiser (1958), que consiste na representação gráfica dos autovalores λi, referente a matriz de correlação, onde os dados são ordenados de forma decrescente. Assim, priorizou-se a primeira Componente Principal após a "formação de cotovelo", que representa um decréscimo importante em relação à variância total (CATTELL, 1966; SAVEGNAGO et al., 2011).

FIGURA 10. Gráfico *ScreePlot* dos percentuais das variâncias obtidos pelas componentes principais quanto ao crescimento celular dos grãos, rendimento da bebida, pH, sólidos solúveis, produção de ácido láctico e CO_2 na bebida fermentada de kefir no EVHC



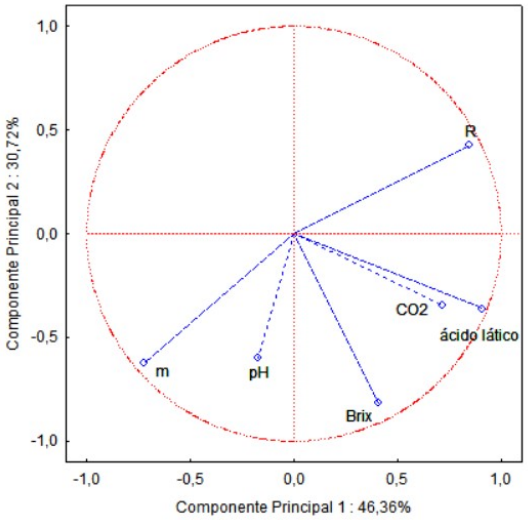
Ainda pela ACP, na Tabela 7 é possível observar a correlação entre a matriz e as variáveis com maior variância (marcadas em negrito) em relação ao Componente Principal (CP1 e CP2) em que se aceita apenas a componente com variância > 0,7 (JOLLIFFE, 1973).

TABELA 7. ACP correlacionada com as cargas marcadas para cada variável em relação aos valores médios de crescimento celular dos grãos, rendimento da bebida, pH, sólidos solúveis, produção de ácido láctico e CO_2 na bebida fermentada de kefir no EVHC.

	Carga dos Componentes Principais	
	Fator 1	Fator 2
pH	- 0,1702	- 0,5987
Sólidos solúveis (° Brix)	0,4072	**- 0,8165**
Ácido láctico	**0,9105**	- 0,3612
CO_2	**0,7195**	- 0,3468
Crescimento celular grãos (m)	**- 0,7210**	- 0,6216
Rendimento da bebida (R)	**0,8484**	0,4253

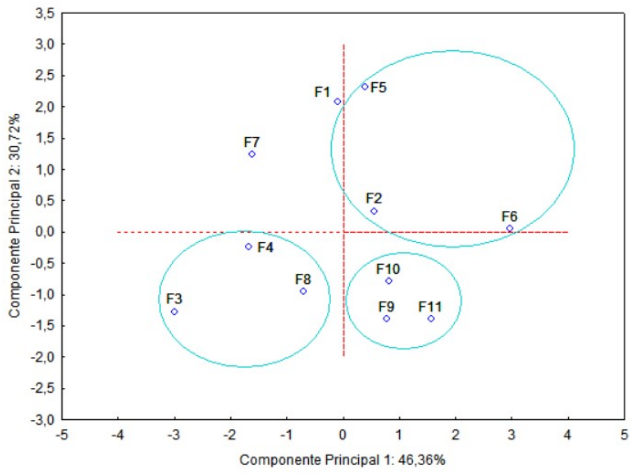
De acordo com a Tabela 7, no CP1 destacaram-se as variáveis produção de ácido láctico, CO_2, crescimento celular dos grãos de kefir e rendimento da bebida fermentada de kefir no EVHC. Já no CP2 apenas a variável de sólidos solúveis (ºBrix) teve contraste. As Figuras 11 e 12 apresentam o gráfico de pesos e o gráfico de escores, para os CP1 e CP2, respectivamente.

FIGURA 11. Gráfico de pesos das variáveis obtido pela análise dos valores médios de crescimento celular dos grãos (m), rendimento da bebida (R), pH, sólidos solúveis (Brix), produção de ácido láctico e CO_2 na bebida fermentada de kefir no EVHC



Assim, pela sobreposição das variáveis, pôde-se verificar que as variáveis de crescimento celular dos grãos (m) e pH estão inversamente correlacionadas com as variáveis rendimento da bebida fermentada (R), sólidos solúveis (ºBrix), produção de CO_2 e ácido láctico pela CP1. E todas as variáveis se correlacionam de forma negativa com o rendimento da bebida fermentada (R) pela CP2. Conforme foi constatado, inicialmente, pela matriz de cargas marcadas (Tabela 7).

FIGURA 12. Gráfico de escores da correlação entre a variação das 11 formulações da bebida fermentada de kefir no EVHC em relação aos parâmetros fermentativos



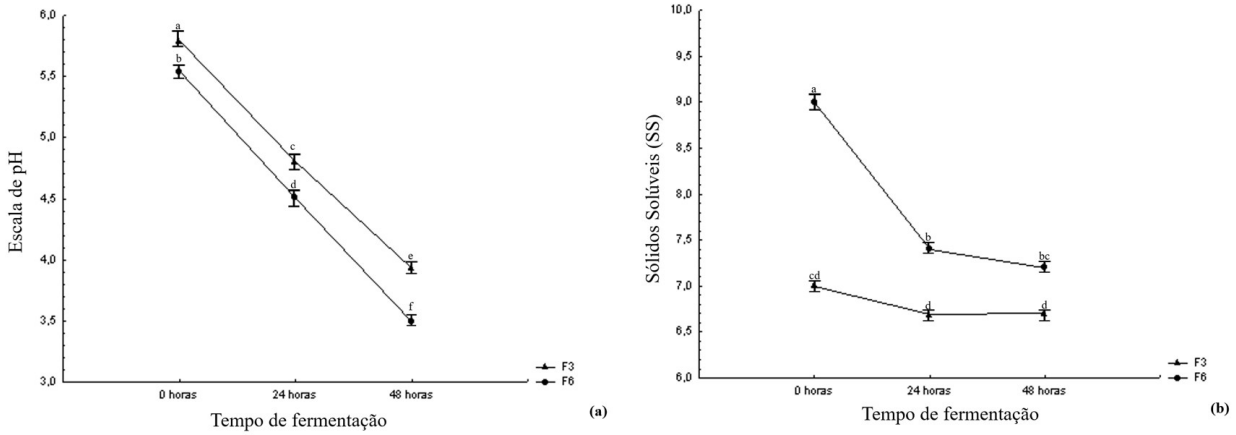
Através da análise conjunta das Figuras 11 e 12, é possível verificar que as Formulações F3, F4 e F8 localizadas no quadrante negativo de X e Y, apresentam maiores taxas de crescimento dos grãos de kefir e valores de pH mais altos (F3 e F8). Já as formulações F2, F5 e F6 que estão localizadas no quadrante positivo de X e Y mostraram um maior rendimento da bebida fermentada comparadas as demais formulações. Em relação à formulações F9, F10 e F11 (triplicatas), localizadas no quadrante positivo de X e negativo de Y, a correlação demonstrou que ocorre uma maior produção de ácido láctico, CO_2 e sólidos solúveis (ºBrix), o que pode indicar que nestas formulações o processo fermentativo foi direcionado principalmente para a produção de compostos orgânicos e ácidos. No que diz respeito a formulações F1 e F7, localizadas no quadrante negativo de X e positivo de Y, não foram observadas correlações significativas com os parâmetros fermentativos estudados.

A partir disso foram destacadas as formulações F3 e F6 por se correlacionarem de forma inversa entre si e em relação às demais formulações quanto aos parâmetros fermentativos estudados. Ainda, a formulação F6 se localizou mais próxima ao eixo 0, indicando que possui relação intermediaria quanto à produção de ácido láctico e CO_2. Assim, essas formulações foram selecionadas para dar prosseguimento as análises.

5.3 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

Os resultados quanto ao pH e sólidos solúveis (SS), estudados nos tempos 0, 24 e 48 horas do processo de fermentação, das F3 e F6, estão apresentados na Figura 13.

FIGURA 13. Escala temporal de (a) pH e (b) sólidos solúveis (SS) nas F3 e F6 da bebida fermentada de kefir no EVHC nos tempos 0, 24 e 48 horas de fermentação



▲ F3 = 2,0% açúcar de coco; 3,0% inulina; 0,01% goma xantana. ● F6 = 10,0% açúcar de coco; 2,0% inulina; 0,26% goma xantana. Resultados expressos com média ± desvio padrão. Condições marcadas com letras diferentes apresentam diferença estatisticamente significativa com nível confiança de 95% ($p \leq 0,05$).

A partir da análise da Figura 13a, quanto aos tempos de fermentação em relação ao pH, foi possível observar que ocorreu uma diminuição dos valores de pH no decorrer das 48 horas de fermentação. Isso indica que o tempo de 24 horas é o mais adequado para a fermentação de bebidas fermentadas de kefir no EVHC, com valores de pH próximos a 4,5.

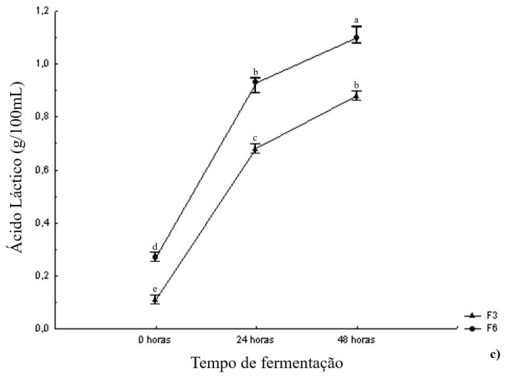
De acordo com Fiorda et al. (2017), para o processo de fermentação dos grãos de kefir os valores de pH considerados ótimos são de aproximadamente 4,0 e 4,5, entre 16 a 24 horas. Isso porque nestes valores de pH não ocorre a desnaturação das proteínas garantindo assim a estabilidade das bebidas fermentadas contra a deterioração, além de conferir caraterísticas sensoriais desejáveis para estes fermentados, como sabor levemente ácido, efervescente e aroma frutado (LEITE et al., 2013a; FIORDA et al., 2016). Quando o pH, no processo de fermentação do kefir permanece maior 4,5 o sabor da bebida ainda é conservado, principalmente na fermentação com extratos hidrossolúveis vegetais, entretanto, a estabilidade da textura não ocorre, o que faz com que a bebida obtida apresente uma característica líquida (SANTOS et al., 2019). Já em 48 horas de fermentação, o valor de pH das F3 e F6, ficou igual ou abaixo de 4,0 e a bebida apresentou acidez acentuada, com características sensoriais similares ao vinagre, o que pode indicar favorecimento da produção de ácido acético e precipitação das proteínas presentes no substrato de EVHC.

Em relação aos sólidos solúveis (SS) (Figura 13b) foi possível observar que ocorreu diferenças significativas entre o decréscimo de SS apenas para a F6, nos tempos estudados. Tu et al. (2019), também constataram em seus estudos uma redução significativa nos teores de SS de 9,20 para 4,43 ºBrix em 48 horas de fermentação dos grãos de kefir de água em soro de soja. Corona et al. (2016), ao estudarem a caracterização de bebidas fermentadas de kefir de água em sucos de vegetais, também observaram diminuição nos SS, sendo que os autores correlacionaram está diminuição com o aumento da produção de etanol, CO_2 e ácidos, devido a metabolização dos açúcares disponíveis (carboidratos) nos substratos hidrossolúveis vegetais pelos microrganismos presentes nos grãos de kefir. Em relação à adição de inulina, Santos et al. (2019), observaram que em formulações de bebidas fermentadas de kefir de água em extrato vegetal de soja, com concentrações de inulina de 3,5% (m/v) e SS de até 10 ºBrix, a redução dos SS foi menor independente do tempo de fermentação, devido a maior disponibilidade de açúcares.

Assim, observa-se que no tempo de até 24 horas o processo fermentativo é mais intenso, devido a maior disponibilidade de substrato, após esse tempo ocorre uma redução deste

processo em consequência da relação desfavorável do maior crescimento dos grãos e redução do substrato com aumento da acidez. Ainda, verificou-se que na F6, que continha maiores concentrações de açúcar de coco (10,0%), goma xantana (0,26%) e inulina (2,0%) em relação a F3 (2,0% açúcar de coco e 3,0% inulina), a acidificação foi mais acentuada. Isso pode ser atribuído às maiores concentrações de açúcares que foram metabolizadas mais rapidamente, já a F3 teve um esgotamento mais rápido dos açúcares disponíveis no substrato, produzindo menos compostos ácidos. Santos et al. (2020), observaram em seus estudos com bebidas fermentadas com BAL em extratos vegetais de coco e grãos de bico com diferentes concentrações de açúcares que o aumento do teor de açúcar (0,0 a 10,0 g/100g) nas bebidas foi proporcional à diminuição do pH e aumento da acidez. Isso também pode ser visto na Figura 14, que mostra um aumento significativo da produção de ácido láctico de 0,87 e 1,10 g/100 mL nas F3 e F6, respectivamente, no tempo de 48 horas de fermentação. Conforme Graça et al. (2018), os SS iniciais (basicamente açúcares) apresentados no substrato podem ser usados tanto para o crescimento celular dos grãos de kefir quanto para a formação de ácidos. O que também pôde ser constatado neste estudo, de acordo com os resultados do delineamento fatorial (Tabela 4), nos quais, a F6 apresentou maior teor de acidez (0,88 g/100 mL) e menor taxa de crescimento celular dos grãos (23,44 g/100 g) quando comparada a F3 (0,68 g/100 mL e 90,89 g/100 g), em 24 horas de fermentação.

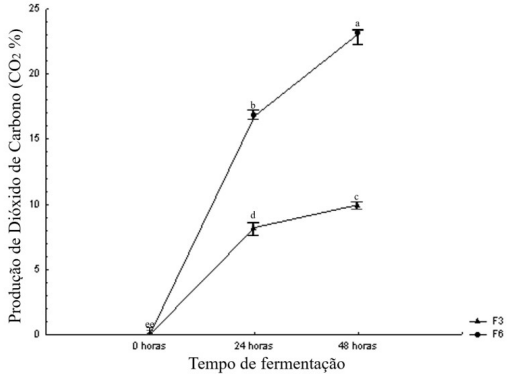
FIGURA 14. Escala temporal da produção de ácido láctico nas F3 e F6 da bebida fermentada de kefir no EVHC nos tempos 0, 24 e 48 horas de fermentação



▲ F3 = 2,0% açúcar de coco; 3,0% inulina; 0,01% goma xantana. ● F6 = 10,0% açúcar de coco; 2,0% inulina; 0,26% goma xantana. Resultados expressos com média ± desvio padrão. Condições marcadas com letras diferentes apresentam diferença estatisticamente significativa com nível confiança de 95% ($p \leq 0,05$).

Outro fator importante a ser avaliado quanto aos parâmetros fermentativos em grãos de kefir é a produção de CO_2, uma vez que, os microrganismos presentes nos grãos possuem capacidade de produzir compostos aromáticos que conferem o sabor e aroma típicos da bebida fermentada, devido à formação de ácidos e produtos carbonílicos pela liberação de CO_2. Assim, se ocorrer uma concentração muito baixa de CO_2 na bebida fermentada, esta tende a apresentar um sabor e aroma atípicos e se ocorrer o inverso este pode vir a inibir o desenvolvimento e crescimento de algumas leveduras (GORSEK; RITONJA; PECAR, 2016). Dessa forma, avaliou-se a produção de CO_2 nos tempos 0, 24 e 48 horas de fermentação das Formulações F3 e F6 como mostra a Figura 15.

FIGURA 15. Escala temporal da produção de dióxido de carbono (CO_2) nas F3 e F6 da bebida fermentada de kefir no EVHC nos tempos 0, 24 e 48 horas de fermentação



▲ F3 = 2,0% açúcar de coco; 3,0% inulina; 0,01% goma xantana. ● F6 = 10,0% açúcar de coco; 2,0% inulina; 0,26% goma xantana. Resultados expressos com média ± desvio padrão. Condições marcadas com letras diferentes apresentam diferença estatisticamente significativa com nível confiança de 95% ($p \leq 0,05$).

A partir da análise da Figura 15, é possível observar que conforme o tempo de fermentação transcorre há um aumento da produção de CO_2, este ocorre por meio dos processos metabólicos gerados pelos microrganismos presentes nos grãos de kefir, sendo que a F3 apresentou uma menor produção de CO_2 em relação a F6. Isto pode estar correlacionado com o crescimento celular dos grãos de kefir, uma vez que, conforme Guillamón e Mass (2009) e Aceituno et al. (2012), quanto mais O_2 estiver disponível na fermentação de kefir (fermentação aeróbica) maior é a taxa de crescimento dos microrganismos presentes nos grãos. Desta forma, quanto maior a produção de CO_2 (fermentação anaeróbica) menor a disponibilidade de O_2 e,

consecutivamente, menor será a taxa de crescimento, como mostra a Tabela 4, onde a F3 apresentou uma maior taxa de crescimento dos grãos quando comparada a F6. Outro fator a ser considerado, no processo de produção de CO_2, é a maior disposição de açúcares (SS) na F6 (3,0% de inulina) visto que, a glicose e a frutose advindas da hidrólise da inulina, quando em maior quantidade podem vir a ser utilizadas pelas leveduras durante a fermentação alcoólica para a produção de etanol e CO_2 (CHI et al., 2011; GULITZ et al., 2011).

5.4 ANÁLISE DE AÇÚCARES E COMPOSTOS ORGÂNICOS

Com base na análises físico-químicas, a composição de açúcares e a produção de compostos orgânicos foram avaliados (Tabela 8) a fim de distinguir qual foi o processo metabólico para cada formulação (F3 e F6) durante a fermentação.

TABELA 8. Concentrações de açúcares e compostos orgânicos nas F3 e F6 da bebida fermentada de kefir no EVHC em 24 horas de fermentação.

Açúcares (g/L^{-1})	**Formulações**	
	F3	**F6**
Arabinose	ND	ND
Celobiose	0,19 ± 0,20	0,17 ± 0,17
Glicose	ND	ND
Frutose	3,91 ± 2,70	5,30 ± 1,96
Compostos orgânicos (g/L^{-1})		
Ácido acético	ND	1,08 ± 0,00
Ácido fórmico	ND	ND
Etanol	12,14 ± 3,12	9,67 ± 2,81
Etanol (%)	1,21	0,96

ND: Não detectado. F3 = 2,0% açúcar de coco; 3,0% inulina; 0,01% goma xantana. F6 = 10,0% açúcar de coco; 2,0% inulina; 0,26% goma xantana. Resultados expressos com média ± desvio padrão.

Conforme os resultados apresentados na Tabela 8, no que diz respeito à metabolização de açúcares, nas F3 e F6, foi possível observar a utilização da glicose e frutose para produção de compostos orgânicos e etanol. A glicose não apresentou valores detectáveis, isso pode ter ocorrido devido à metabolização completa ocorrer antes de 24 horas de fermentação ou porque a quantidade disponível neste tempo de fermentação já estava muito reduzida. Tu et al. (2019), observaram uma diminuição das concentrações de glicose durante o processo fermentativo de grãos de kefir de água em soro de soja em até 120 horas de fermentação, visto que a partir de 24 horas a redução foi continua e significativa (2,59 g/L para 0,54 g/L), sugerindo que os microrganismos presentes nos grãos foram capazes de metabolizar a glicose disponível para a

produção de compostos orgânicos. Norberto et al. (2018), também observaram uma redução significativa nas concentrações de glicose, durante o processo fermentativo em até 20 horas, nas formulações de bebidas fermentadas com extrato vegetal de soja e leite com grãos de kefir, devido a metabolização desse açúcar pelos microrganismos dos grãos.

Ainda, foi possível identificar a presença de celobiose, em ambas as formulações, que é um dissacarídeo presente no coco ou no açúcar de coco. De acordo com Zhang, Donaldson e Ma (2012), a metabolização da celobiose advém da hidrólise da celulose em celodextrinas que são denominadas de acordo com o número de moléculas de glicose que as compõe, sendo a celobiose composta por duas moléculas que, no processo fermentativo, são convertidas principalmente para a produção de etanol. Corroborando, assim, com os dados encontrados neste estudo, nos quais, a celobiose foi metabolizada para a produção de etanol em ambas as formulações (Tabela 8).

Quanto à frutose, foi observada uma maior concentração (5,30 g/L) na F6 após 24 horas de fermentação, sendo que para esta formulação, a frutose foi revertida para a produção de ácido acético e etanol. Já na F3, a metabolização da frutose foi revertida principalmente para a produção de etanol (Tabela 8). Fiorda et al. (2016), constataram que em bebidas de kefir à base de mel há maiores teores de etanol (metabolizado pela glicose e frutose) quando comparadas a bebidas de kefir com colostro, extrato vegetal de soja e leite de vaca. Os autores justificaram que há uma metabolização seletiva dos microrganismos para a produção de etanol na bebida à base de mel, devido a maior disponibilidade de açúcares. Esses dados corroboram com este estudo, uma vez que a F3, com concentração de 3,0% de inulina (maior concentração de açúcar disponível), teve maior produção de etanol (12,14g/L) em relação a F6 (9,67g/L), o que pode vir a indicar que ocorreu uma metabolização seletiva.

No que diz respeito à produção de ácido acético, pela F6, advinda da metabolização da celobiose e frutose, Damodaran et al. (2010) discorrem que, durante o processo fermentativo de grãos de kefir, há a produção de ácido acético e glicerol. Os autores ainda explicam que esta produção tende a aumentar em decorrência de uma parte do teor de etanol ser metabolizado para ácido acético por meio de bactérias heterofermentativas (gênero *Acetobacter*) que possuem atividade desidrogenase, que convertem o etanol em acetaldeídos. Sendo que estes, juntamente com os ésteres, são responsáveis pelo sabor e aroma frutado, característico da bebida fermentada de kefir (FIORDA et al., 2017).

Referente a produção de etanol durante o processo fermentativo, foi possível observar que a F3 apresentou maior produção (1,21%) quando comparada a F6 (0,96%). De acordo com Norberto et al. (2018) e Atalar (2019), esta produção de etanol está relacionada à metabolização dos açúcares disponíveis, pelas leveduras (*Saccharomyces e Candida*) e algumas bactérias (*Lactobacillus e Lactococcus*), durante o processo fermentativo alcoólico dos grãos de kefir. Ainda segundo a Resolução nº 46 e as normas internacionais de alimentos do *Codex Alimentarius*, bebidas fermentadas de kefir devem conter conteúdo de etanol entre 0,5% e 1,5% (BRASIL, 2007; FAO/WHO. 2011). Assim pôde se constatar que as F3 e F6 deste estudo estão conforme as normas vigentes sendo consideradas como bebidas fermentadas não alcoólicas.

5.5 ATIVIDADE ENZIMÁTICA NA FERMENTAÇÃO DE KEFIR

Visto que durante a fermentação de kefir vários processos metabólicos estão envolvidos na hidrólise dos açúcares para a produção de etanol e demais compostos orgânicos, as enzimas exercem papel fundamental, uma vez que são as principais responsáveis pela catálise, hidrólise e metabolização para produção de novos compostos a partir dos substratos utilizados na fermentação dos grãos de kefir (GAHRUIE et al., 2015; KONKIT e KIM, 2016; DAS et al., 2019). Desta forma, foram analisadas as atividades enzimáticas da amilase, inulinase e peroxidase nas F3 e F6, como mostra a Tabela 9.

TABELA 9. Determinação da atividade enzimática nas F3 e F6 da bebida fermentada de kefir no EVHC em 24 horas de fermentação.

Atividade enzimática (U/mL)	**Formulações**	
	F3	**F6**
Amilase	9,13 ± 1,02	9,73 ± 0,97
Inulinase	2,03 ± 1,36	1,28 ± 1,01
Peroxidase	28,00 ± 3,02	30,50 ± 2,88

F3 = 2,0% açúcar de coco; 3,0% inulina; 0,01% goma xantana. F6 = 10,0% açúcar de coco; 2,0% inulina; 0,26% goma xantana. Resultados expressos com média ± desvio padrão.

A partir dos dados da Tabela 9, foi possível observar na F6 maior atividade enzimática para a amilase e peroxidase; já na F3 a inulinase teve maior incidência, isso pode ser atribuído ao fato desta formulação conter maiores concentrações de inulina (3,0%) quando comparada a F6. De acordo com Konkit e Kim (2016), as BAL contribuem para a atividade enzimática da amilase e inulinase, uma vez que, estas bactérias metabolizam mais facilmente os açúcares disponíveis, por meio da hidrólise enzimática, para a produção de etanol quando comparadas a

outras fontes de açúcares como amido, celobiose, arabinose e xilano (CHI et al., 2011). Ghosh et al. (2015), discorrem em seus estudos que as BAL durante a fermentação podem vir a produzir α-amilase estáveis em pH de até 4,03, a partir da disponibilidade de amido no substrato utilizado.

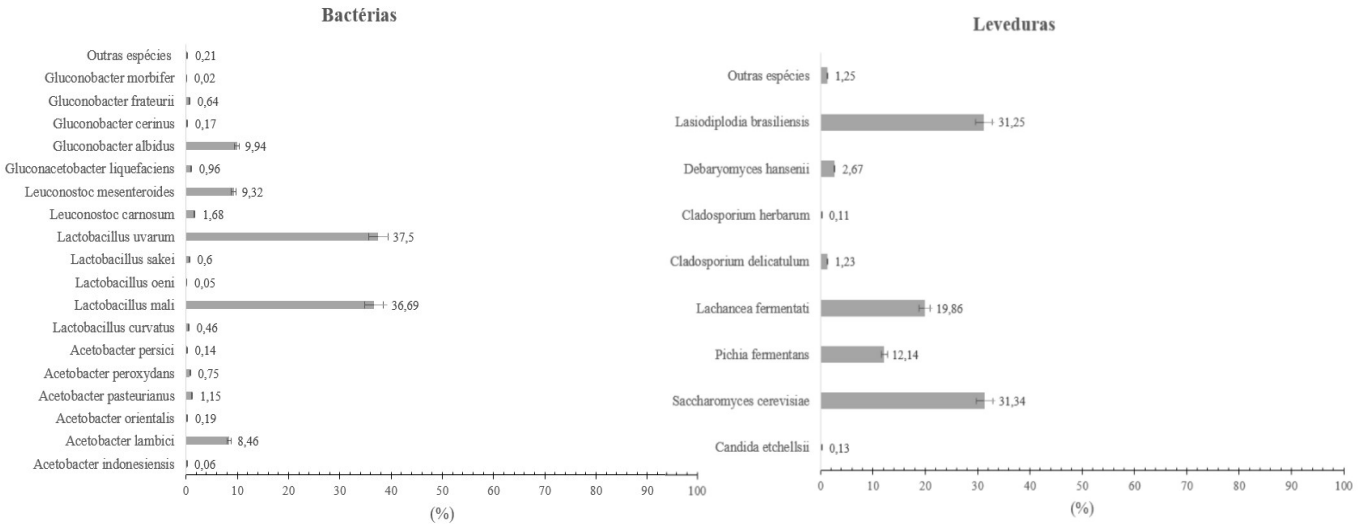
Konkit e Kim (2016), ainda, encontraram valores menores para atividade enzimática para a amilase de 5,41 U/mL em iogurtes fermentados à base de leite, que os obtidos nesse estudos Ressalta-se também, que não foram encontrados trabalhos na literatura que avaliaram a atividade enzimática da inulinase em bebidas fermentadas suplementadas ou não com a inulina.

Outro fator a ser observado é o potencial redox das peroxidases, que é diretamente influenciado pelo pH, ou seja, quanto menor o pH maior é o potencial redox e, consecutivamente maior é a velocidade de catálise enzimática pelas peroxidases (LI et al., 2020). Assim, pôde-se perceber que a F6 apresentou um maior decréscimo de pH em 24 horas de fermentação (Figura 11a) e maior atividade enzimática para a peroxidase quando comparada a F3 (30,50 e 28,00 U/mL). McCue e Shetty (2005), analisaram formulações de iogurte de leite de soja bioprocessado e suplementado com culturas de kefir de leite a partir da ação enzimática da peroxidase. Os autores observaram que em 48 horas de fermentação a atividade enzimática foi de 2,33 U/mL, sendo este valor inferior à atividade enzimática para peroxidase obtida, para este estudo, em 24 horas de fermentação (Tabela 9).

5.6 IDENTIFICAÇÃO E VARIEDADE DOS MICRORGANISMOS

A partir da extração do material genético e sequenciamento agrupado das UTOs, submetidas a classificação taxonômica sequenciadas com pelo menos 99% de identidade de bancos de referência, uma variedade de microrganismos simbióticos (bactérias e leveduras) foi identificada nos grãos de kefir de água fermentados no EVHC, conforme mostra a Figura 16.

FIGURA 16. Identificação de microrganismos presentes em grãos de kefir de água cultivados em substrato de extrato vegetal hidrossolúvel de coco suplementado com inulina



A biodiversidade da associação simbiótica dos microrganismos encontrados nos grãos de kefir de água é ampla, sendo as espécies de BAL as que mais predominam nos grãos, contudo é possível observar variações de espécies como os *Leuconostoc, Lactococos, Streptococos, Acetobacter, Pseudomonas* e *Acinetobacter* (GAO et al., 2013). Da mesma forma, a variedade das leveduras nos grãos de kefir de água é caracterizada principalmente pela presença de espécies como as *Saccharomyces, Kazachstania, Kluyveromyces, Pichia, Issatchenkia* e *Dekkera*, entretanto outras espécies também podem ser encontradas dependendo do meio de cultivo dos grãos (ZHOU et al., 2009; DIOSMA et al., 2014).

Em relação à composição das espécies de bactérias nos grãos de kefir de água, pôde- se perceber uma menor variação destas em relação às leveduras, sendo as espécies mais predominantes as BAL. Sendo ainda possível observar a presença de espécies de BAA, que são características em substratos açucarados, nos quais, utilizam como fonte metabólica o etanol (proveniente do metabolismo das leveduras) para seu crescimento e viabilidade (DERTLI; ÇON, 2017).

Ainda, de acordo com Ikram-Ul-Haq e Ali (2007), as leveduras são consideradas as espécies de microrganismos mais diversificadas nos grãos de kefir, o que pode indicar que seu metabolismo é proveniente principalmente de fontes de carbono produzido durante o processo de fermentação. Isto também pode vir a ocorrer devido ao aumento da disponibilidade de açúcares advindos da suplementação de inulina, que estimulam ainda mais o crescimento e viabilidade das leveduras como as *Saccharomyces, Hanseniaspora, Pichia* e *Lachancea* (SANTOS et al., 2019). Conforme Morrissey et al. (2004), a levedura *Saccharomyces cerevisiae,* que estimula principalmente a produção de etanol, é a espécie mais predominante após 24 horas do processo fermentativo do kefir.

5.7 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

A composição centesimal das F3 e F6 nos tempos 0 e 24 horas de fermentação dos grãos de kefir estão dispostas na Tabela 10.

TABELA 10. Composição centesimal das F3 e F6 da bebida fermentada de kefir no EVHC em 0 e 24 horas de fermentação.

Composição (g/100g)	Formulações			
	F3		F6	
	Tempo 0 horas	Tempo 24 horas	Tempo 0 horas	Tempo 24 horas
Umidade	91,42 ± 0,02 [a]	90,49 ± 0,16 [b]	83,72 ± 0,41 [c]	82,26 ± 0,32 [d]
Cinzas	0,16 ± 0,03 [ab]	0,17 ± 0,01 [a]	0.10 ± 0,04 [ab]	0,15 ± 0,10 [b]
Lipídeos	2,73 ± 0,04 [ab]	2,84 ± 0,18 [a]	3,24 ± 0,07 [ab]	3,26 ± 0,07 [b]
Proteínas	0,79 ± 0,06 [b]	0,95 ± 0,03 [d]	0,77 ± 0,11 [c]	0,84 ± 0,12 [a]
Carboidratos	5,26 ± 0,12 [a]	4,46 ± 0,13 [c]	13,82 ± 0,43 [d]	12,41 ± 0,34 [b]
Valor energético (Kcal)	53,28 ± 0,25 [a]	50,54 ± 1,43 [b]	83,01 ± 1,72 [d]	79,00 ± 1,05 [c]

F3 = EVHC com 2,0% açúcar de coco; 3,0% inulina; 0,01% goma xantana. F6 = EVHC com 10,0% açúcar de coco; 2,0% inulina; 0,26% goma xantana. Resultados expressos com média ± desvio padrão. Condições marcadas com letras diferentes apresentam diferença estatisticamente significativa com nível confiança de 95% ($p \leq 0,05$).

Conforme os dados da Tabela 10, pôde-se observar que os teores de umidade de todas as formulações apresentaram diferença significativa entre si, sendo que a F6 em 24 horas de fermentação apresentou menor teor de umidade quando comparada as demais. Em relação aos teores de cinzas das formulações, estes apresentaram diferença significativa somente em 24 horas de fermentação. Santos et al. (2020), ao avaliarem bebidas fermentadas com BAL em extratos vegetais de coco e grão de bico, encontraram teores umidade entre 83,04 a 93,65 g/100g e teores de cinzas entre 0,30 a 0,33 g/100g, sendo que nas bebidas com maiores concentrações de açúcar (10,0 g/100g) esses teores foram menores. Santos et al. (2019), encontraram em seus estudos teores de umidade de 92,85 e 90,74 g/100 g e teores de cinzas de 0,41 e 0,39 g/100 g, para bebidas fermentadas de kefir em extrato vegetal de soja, sem e com adição de inulina, respectivamente. Dados que corroboram com este estudo. Ainda, conforme Atalar (2019), a umidade se associa diretamente com a estabilidade do alimento, sendo as bebidas fermentadas de kefir caracterizadas por possuírem altos teores de umidade.

Quanto ao teor lipídico os valores variaram entre as F3 e F6 no tempo 0 a 24 horas de fermentação, no entanto, sem diferença significativa. Hasan et al. (2006) e Olateru et al. (2020), atribuem o aumento dos teores de lipídeos durante a fermentação devido a algumas espécies de leveduras (*Lachancea*) e BAL (*Leuconostoc*), presentes nos grãos de kefir, possuírem atividade lipolítica através das enzimas presentes no processo fermentativo, as quais, aumentam as concentrações de ácidos graxos livres e glicerol. Santos et al. (2020), encontraram em formulações de extratos vegetais de coco e grão de bico fermentadas com BAL teores lipídicos de 1,32 a 1,53 g/100g, sem açúcar e com adição de 10,0 g/100g de açúcar, atribuindo o aumento lipídico das bebidas fermentadas à composição do coco, que pode conter até 20,0 g/100g de

gordura. Neste estudo as formulações com maiores concentrações de açúcares (10%) também apresentaram maiores teores lipídicos.

Em relação às proteínas, as F3 e F6 apresentaram um acréscimo significativo em seu teor proteico em 24 horas de fermentação quando comparadas às formulações no tempo 0 horas. Farnworth e Mainville (2008) discorrem que durante o processo de fermentação, quando ocorre a hidrólise proteica do substrato, maiores quantidades de nitrogênio ficam retidas nas amostras e, assim, estas são quantificadas como proteínas, pelo método de *Kjeldahl*. Outro fator responsável pelo aumento das proteínas pode ser a alta atividade proteolítica dos microrganismos dos grãos de kefir disponibilizar maiores quantidades de peptídeos bioativos e aminoácidos livres como fonte de nitrogênio ao substrato, o que auxilia no aporte proteico das bebidas fermentadas de kefir (SKRZYPCZAK et al., 2019; TANGYU et al., 2019). Ainda, foi observado que a F3 apresentou maiores teores de proteínas durante a fermentação quando comparada a F6. De acordo com Atalar (2019), valores de pH altos podem resultar em um aumento do teor proteico, uma vez que, valores de pH muito baixos (maior acidez) causam desnaturação e perda das proteínas durante o processo fermentativo da bebida.

Grasso, Alonso-Miravalles e O'Mahony (2020), avaliaram a composição nutricional de iogurtes à base de plantas, os quais, obtiveram em iogurtes de coco teores proteicos de 0,60 g/100g, resultados próximos aos desse estudo (Tabela 10). Já nos estudos realizados por Jeske et al. (2017a) e Singhal et al. (2017), em amostras de leite de coco comercial os valores proteicos encontrados foram inferiores a 1,0 g/100g. Santos et al. (2020), ao avaliarem bebidas fermentadas com BAL em extratos vegetais de coco e grão de bico, encontraram valores de proteínas entre 1,27 e 1,15 g/100g em formulações sem adição de açúcar e com adição de 10,0 g/100g de açúcar, respectivamente. De acordo com Patil e Benjakul (2018), baixos teores proteicos em bebidas com EVHC já são esperados, uma vez que o coco não é considerado um alimento fonte de proteínas.

Os teores de carboidratos, apresentaram redução significativa nas formulações entre os tempos 0 a 24 horas de fermentação, o que já era esperado, porque durante o processo fermentativo os açúcares disponíveis são metabolizados pelos microrganismos para produção de ácidos e compostos orgânicos. Outro fato a ser considerado é o cálculo realizado por diferença, uma vez que nas F3 os teores dos demais nutrientes foram superiores às F6, o que consecutivamente atribui menores teores de carboidratos à F3. Santos et al. (2020), encontraram em formulações de bebidas fermentadas de coco com grão de bico o conteúdo total de

carboidratos de 3,07 a 14,22 g/100g com diferentes concentrações de açúcar (2,5 a 10,0 g/100g). Grasso, Alonso-Miravalles e O'Mahony (2020), encontraram em seu estudo teores de 8,0 g/100 g de carboidratos em iogurtes de coco, sendo que associaram este aumento a adição de aditivos como amido, pectina e ágar, que disponibilizaram maiores concentrações de hidratos de carbono nas formulações do iogurte de coco.

Ainda, no tempo de 24 horas de fermentação o valor energético (kcal) foi menor (53,28 para 50,54 kcal/100g) em comparação as formulações no tempo 0 horas (83,01 para 79,00 kcal/100g). Santos et al. (2020), encontraram valores energéticos de 31 a 74 kcal para bebidas fermentadas com extrato de coco e grão de bico, os quais, associaram o aumento do valor energético à maior adição de açúcar. Santos et al. (2019), em formulações de bebidas fermentadas com extrato de soja adicionadas com 3,5% m/v de inulina, os valores energéticos foram de 42,29 kcal. Dados que corroboram com este estudo.

As diferenças nutricionais encontradas entre as formulações (Tabela 10) podem ser justificadas pela heterogeneidade das matérias-primas dos componentes básicos das formulações, bem como pelas proporções utilizadas. Conforme Patil e Benjakul (2018), as propriedades do produto final dependem da qualidade da matéria-prima utilizada, bem como do método de extração, homogeneização, emulsificação e armazenamento. Ainda, a fermentação pode auxiliar melhorando algumas características e propriedades nutricionais e sensoriais (TANGYU et al., 2019).

5.8 ANÁLISE DE COR

Quanto aos parâmetros de cor das F3 e F6 nos tempos 0 e 24 horas de fermentação dos grãos de kefir no EVHC foram analisadas a luminosidade (L*), o ângulo Hue (H°) e croma (C*), como mostra a Tabela 11.

TABELA 11. Parâmetros de cor L*, H° e C* das F3 e F6 da bebida fermentada de kefir no EVHC em 0 e 24 horas de fermentação.

Formulações	L*	H°	C*
F3 tempo 0 horas	74,85 ± 2,73 [a]	71,44 ± 2,83 [a]	13,27 ± 5,78 [a]
F3 tempo 24 horas	76,61 ± 2,92 [d]	73,97 ± 0,72 [a]	16,57 ± 7,64 [c]
F6 tempo 0 horas	68,31 ± 1,75 [c]	65,87 ± 5,77 [b]	15,70 ± 2,58 [d]
F6 tempo 24 horas	73,09 ± 1,86 [d]	73,16 ± 0,65 [a]	25,53 ± 3,02 [b]

F3 = EVHC com 2,0% açúcar de coco; 3,0% inulina; 0,01% goma xantana. F6 = EVHC com 10,0% açúcar de coco; 2,0% inulina; 0,26% goma xantana. Resultados expressos com média ± desvio padrão. Condições marcadas com letras diferentes apresentam diferença estatisticamente significativa com nível confiança de 95% ($p \leq 0,05$).

Em relação a coloração, verificou-se uma variação significativa do valor L* das formulações no tempo 0 horas de fermentação em comparação ao tempo de 24 horas. De acordo com Zelovitis et al. (2016), valores de L* variam de 0 (L* totalmente escuro) a 100 (L* totalmente claro) e o H° é usado para indicar a tonalidade, no qual, 0° é vermelho, 90° amarelo, 180° verde e 270° azul. Referente ao H° apenas a F6 no tempo 0 horas de fermentação teve diferença significativa quando comparada as demais formulações. Já os valores de croma apresentaram diferença significativa em todas as formulações independente do tempo de fermentação. Segundo Bem et al. (2012), a cromaticidade (C*) está relacionada a saturação de cor, onde valores próximos à 0 expressam cores mais acinzentadas e quando próximos a 60, cores mais intensas e vívidas. Assim, é possível observar que todas as formulações ficaram próximas a 90 H°, com valores de L* próximos ao branco e C* mais próximos à 0 do que 60, indicando uma coloração branca amarelada acinzentada. Ressaltando ainda que o processo de fermentação em até 24 horas tornou as formulações mais brancas.

Amirah et al. (2020), ao avaliarem o processo de fermentação em iogurtes à base de coco relatam em seus estudo que já é esperada a coloração branca devido ao processo de desnaturação e hidrólise dos componentes da formulação. Ainda, Ma et al. (2015) e Peyer et al. (2016), discorrem em seus estudos que a cor mais branca na fermentação corresponde tanto à cor da matéria-prima utilizada quanto à presença de partículas insolúveis que atuam como partículas de dispersão da luz.

6. CONCLUSÃO

Este estudo mostrou que a utilização do EVHC como substrato fornece contribuições importantes quanto aos aspectos tecnológicos e de bioprocessos para o seguimento de bebidas fermentadas com grãos de kefir. A adição de inulina proporcionou aumento da viscosidade nas formulações desenvolvidas e teve interação significativa quanto ao crescimento celular dos grãos de kefir, rendimento da bebida fermentada e produção de acidez, principalmente no tempo de até 24 horas de fermentação. Ainda, foi possível observar que EVHC adicionado de inulina e açúcar de coco é uma matriz viável para a viabilidade e manutenção dos microrganismos presentes nos grãos de kefir de água, favorecendo principalmente as BAL e as leveduras. Referente a composição nutricional, a bebida fermentada de kefir no EVHC apresentou baixos teores calóricos (Kcal) e proteicos e alto conteúdo lipídico. Adicionalmente, o processo

fermentativo contribuiu de forma significativa para agregar valor nutricional além de aumentar a brancura da bebida obtida. Assim, pôde-se constatar que os grãos de kefir de água apresentaram um grande potencial de adaptação ao substrato de EVHC em até 24 horas de fermentação, favorecendo o desenvolvimento de uma bebida fermentada não láctea que pode vir a ser uma alternativa de produto alimentar para pessoas com intolerância à lactose, alérgicas a laticínios e veganas.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Realizar análise sensorial, a fim de se avaliar a aceitação do produto desenvolvido, bem como análises microbiológicas como a contagem de bactérias lácticas e leveduras específicas (UFC/g) conforme a legislação vigente. Também sugere-se estudar a durabilidade da bebida fermentada quanto a vida de prateleira.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAS. Associação Brasileira de Supermercados. Demanda por produtos vegetarianos ainda é maior do que a oferta no Brasil. Disponível em: http://www.abrasnet.com.br/clipping.php?area=1&clipping=51257 Acesso em 28 de junho de 2020.

ACEITUNO, F. F.; ORELLANA, M.; TORRES, J.; MENDOZA, S.; SLATER, A.W.; MELO, F.; AGOSIN, E. Oxygen response of the wine yeast Saccharomyces cerevisiae EC1118 grown under carbon-sufficient, nitrogen-limited enological conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, p. 8340 – 8352, 2012.

AGÊNCIA NACIONAL VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **Alimentos com alegações de propriedades de propriedades funcionais e ou de saúde: lista de alegações de propriedade funcional aprovadas.** Atualizado em dezembro, 2016.

AGÊNCIA NACIONAL VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. Normas técnicas especiais. Resolução – CNNPA – Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos nº 12, de 1978. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 24 jul. 1978.

AGRIANUAL 2018: Anuário da Agricultura Brasileira. **Coco-da-baía**. São Paulo: Informa Economics IEG/FNP, 2017. p. 263-271. 440 p.

AGUIAR, M. M., FERREIRA, L. F. R., & MONTEIRO, R. T. R. Use of vinasse and sugarcane bagasse for the production of enzymes by lignocellulolytic fungi. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 5, p. 1245–1254, 2010.

ALEXANDRU GRUMEZESCU, A. M. H. **The science of beverages**. In nature beverages. Woodhead publishing. 2019, p. 339-360.

ALL NUTS. Açúcar de coco (2019). Disponível em https://www.allnuts.com.br/acucar-de-coco. Acesso em 28 de abril de 2020.

AL-SHERAJI, S. H.; ISMAIL, A.; MANAP, M. Y.; MUSTAFA, S. YUSOF, R. M.; HASSAN, F. A Prebiotics as functional foods: A review. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 4, p. 1542–1553, 2013.

AMIRAH, A. S.; NOR SYAZWANI, S.; RADHIAH, S.; ANIS SHOBIRIN, M. H.; NOR-KHAIZURA, M. A. R.; WAN ZUNAIRAH, W. I.; NURUL SHAZINI, R. Influence of raisins puree on the physicochemical properties, resistant starch, probiotic viability and sensory attributes of coconut milk yogurt. **Journal of Food Science**, v. 4, p. 77-84, 2019.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Métodos de Análise Oficiais da AOAC**. Apêndice F. Washington, 2012.

APRIYANTONO, A.; ARISTYANI, A.; NURHAYATI, LIDYA; Y., BUDIYANTO, S.; SOEKARTO, S. T. Rate of browning reaction during preparation of coconut and palm sugar. **International Congress Series**, v. 1245, p. 275–278, 2002.

ASTRUP, A.; MAGKOS, F.; BIER, D. M.; BRENNA, J. T.; DE OLIVEIRA OTTO, M. C.; HILL, J. O.; KING, J. C.; MENTE, A.; ORDOVAS, J. M.; VOLEK, J. S.; YUSUF, S.; KRAUSS, R. M. Saturated Fats and Health: A Reassessment and Proposal for Food-based Recommendations: JACC State-of -the-Art Review. **Journal of the American College of Cardiology**, 2020.

ATALAR, I. Functional kefir production from high pressure homogenized hazelnut milk. **LWT-Food Science and Technology**, v. 107, p. 256-263, 2019.

BAFPS - Bureau of Agriculture and Fisheries Product Standards. **Philippine national standard for coconut sap sugar**: grading and classification. PNS/BAFPS. Quezon city Philippines, 2010, p. 76.

BALLCO, P.; GRACIA, A. An extended approach combining sensory and real choice experiments to examine new product attributes. **Food Quality and Preference**, v. 80, p. 103830, 2020.

BALOGUN, M. A.; KOLAWOLE, F. L.; ADEBISI, J. T. T.; OGUNLEYE, O. T. Effect of fortification of fresh cow milk with coconut milk on the proximate composition and yield of warankashi, a traditional cheese. **Journal Food Science Technology**, n. 8, v. 1, p. 10-14, 2016.

BAZOTI, S. F.; GOLUNSKI, S.; SIQUEIRA, D. P.; SCAPINI, T.; BARRILLI, E. T.; MAYER, D. A.; BARROS, K. O.; ROSA, C. A.; STAMBUK, B. U.; ALVES Jr., S. L.; VALÉRIO, A.; DE OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Second-generation ethanol from non-detoxified sugarcane hydrolysate by a rotting wood isolated yeast strain. **Bioresource Technology**, v. 244, p. 582–587, 2017.

BEDIN, E.; TORRICELLI, C.; GIGLIANO, S.; DE LEO, R.; PULVIRENTI, A. Vegan foods: Mimic meat products in the Italian market. **International Journal of Gastronomy and Food Science**, v. 13, p. 1-9, 2018.

BECK, L. Coconut sugar: Is it healthier than white sugar, or just hype? The Globe and Mail. (2018). Disponível em: https://www.theglobeandmail.com/life/health-and-fitness/ask-a-health-expert/coconut-sugar-is-it-healthier-than-white-sugar-or-just-hype/article19187927. Acesso em 24 de julho de 2020.

BEM, M. S.; POLESI, L. F.; SARMENTO, S. B. S.; ANJOS, C. B. P. Physicochemical and sensory properties of pasta prepared legume flours hydrothermally treated. **Alimentos e Nutrição, Araraquara**, v. 23, n. 1, p. 101-110, 2012.

BERNAT, N.; CHAFER, M.; CHIRALT, A.; GONZALEZ-MARTINEZ, C. Hazelnut milk fermentation using probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG and inulin. **International Journal of Food Science and Technology**, n 49, p. 2553-62, 2014.

BEZERRA, M. A.; FERREIRA, S. L. C.; NOVAES, C. G.; SANTOS, A. M. P. dos.; VALASQUES, G. S.; CERQUEIRA, U. M. F. M.; ALVES, J. P. S. Simultaneous optimization of multiple responses and its application in Analytical Chemistry – A review. **Talanta**, v. 194, p. 941-959, 2019.

BRAINER, M. S. de C. P. Produção de coco: O Nordeste é destaque nacional. **Caderno Setorial ETENE**, v. 3, n. 61, p. 1-25, 2018.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 268, de 22 de setembro de 2005. Aprova o "regulamento técnico para produtos Proteicos de origem vegetal". Brasília, DF: **ANVISA**, 2005a.

BRASIL. RDC nº 272, de 22 de setembro de 2005. Aprova o "regulamento técnico para produtos de vegetais, produtos de frutas e cogumelos comestíveis". **Diário Oficial [da] União,** Brasília-DF, 22 set. 2005b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Resolução n° 46, de 23 de outubro de 2007. Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ) de Leites Fermentados. **Diário Oficial da União, Brasília**, n. 205, seção 1, p. 4, 2007.

BONNEMA, A. L; KOLBERG, L. W.; THOMAS, W.; SLAVIN, J. L. Gastrointestinal tolerance of chicory inulin products, (PubMed – NCBI) **Journal of the American Dietetic Association,** v. 110, p. 865–868, 2010.

BOURRIE, B.C.T.; WILLING, B.P.; COTTER, P.D. "The Microbiota and Health Promoting Characteristics of the Fermented Beverage Kefir." **Frontiers in Microbiology**, p. 1–17, 2016.

BUCHERT, J.; ERCILI CURA, D.; MA, H.; GASPARETTI, C.; MONOGIOUDI, E.; FACCIO, G.; MATTINEN, M.; BOER, H.; PARTANEN, R.; SELINHEIMO, E.; LANTTO, R.; KRUUS, K. Crosslinking food proteins for improved functionality. **The Annual Review of Food Science and Technology**, v. 1, p.113-138, 2010.

CAPORASO, J. G.; LAUBER, C. L.; WALTERS, W. A.; BERG-LYONS, D.; LOZUPONE, C. A.; TURNBAUGH, P. J.; FIERER, N.; KNIGHT, R. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America - PNAS**, v. 108, n. 1, p. 4516–4522, 2011.

CARVALHO, M. R. A. C. G.; COELHO, N. R. A. Leite de coco: aplicações funcionais e tecnológicas. **Estudos**, v. 36, n. 5/6, p. 851-865, Goiânia - 2009.

CATTEL, R.B. The screen test for the number of factors. **Multivariate Behavioral Research**, v. 1, p. 140-161, 1966.

CHARALAMPOPOULOS, D.; RASTALL, R. A. Prebiotics in foods. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 187–191, 2012.

CHI, Z. M.; ZHANG, T.; CAO, T. S.; LIU, X. Y.; CUI, W.; ZHAO, C. H. Biotechnological potential of inulin for bioprocesses. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 4295 – 4303, 2011.

CO, J; YAHAYA, L. E.; OGUNWOLU, S. O.; MOKWUNOYE, F. C.; OLALEKAN-ADENIRAN, M. Formulation and Assessment of Cashew Kernel Milk as an Alternative to Cow's Milk. **Food Processing & Nutritional Science**, v. 1, n. 1, p. 86–92, 2020.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. Milk and Milk Products (CODEX STAN 243–2003), vol. 2 edition, pp. 6–16. Rome, Italy: World Health Organization (WHO) and Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2011.

COLLADOS, A., CONVERSA, V., FOMBELLIDA, M., ROZAS, S., KIM, JH, ARBOLEYA, J. C. ROMÁNA, M.; PEREZÁBAD, L. Application of food enzymes in the kitchen. **International Journal of Gastronomy and Food Science**, v. 21, P. 100,212, 2020.

CONWAY, J. Vegan market: statistics and facts. (2019). Disponível em: https://www.statista.com/topics/3377/vegan-market/. Acesso em: 20 julho de 2020.

COMA, E.; PELTZER, M. A.; DELGADO, J. F.; SALVAY, A. G. Water kefir grains as an innovative source of materials: Study of plasticiser content on film properties. **European Polymer Journal**, v. 120, p. 109-234, 2019.

COOPER, P. D.; RAJAPAKSHA, K. H.; BARCLAY, T. G.; GINIC-MARKOVIC, M.; GERSON, A. R.; PETROVSKY, N. Inulin crystal initiation via a glucose-fructose cross-link of adjacent polymer chains: Atomic force microscopy and static molecular modeling. **Carbohydrate Polymers**, v. 117, p. 964–972, 2015.

CORONA, O.; RANDAZZO, W.; ALESSANDRO, M.; GUARCELLO, R.; NICOLA, F.; HÜSEYIN, N. Characterization of kefir-like beverages produced from vegetable juices. **LWT-Food Science and Technology**, v. 66, p. 572–581, 2016.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos**. 4 ed. Porto Alegre - RS, Brasil: Artmed, 2010, v 1, p. 110.

DAS, K.; CHOUDHARY, R.; THOMPSON-WITRICK, K. A. Effects of new technology on the current manufacturing process of yogurt-to increase the overall marketability of yogurt. **LWT - Food Science and Technology**, v.108, p. 69–80, 2019.

DAVRAS, F.; GUZEL-SEYDIM, Z.; TAS, T. "Immunological Effects of Kefir Produced from Kefir Grains versus Starter Cultures When Fed to Mice". **Functional Foods in Health and Disease,** v. 8 n. 8, p. 367–378, 2018.

DERTLI, E.; ÇON, A. H. Microbial diversity of traditional kefir grains and their role on kefir aroma. **LWT - Food Science and Technology**, v. 85, p. 151- 157, 2017.

DE SOUZA-OLIVIERA, R. P.; PEREGO, P.; CONVERTI, A.; DE OLIVEIRA, M.N. The effect of inulin as prebiotic on the production of probiotic fibre-enriched fermented milk. **International Journal of Dairy Technology**, v. 62, p. 195–203, 2009.

DIAS, V. da V.; SCHUSTER, M. da S.; TALAMINI, E.; RÉVILLION J.P. Scale of consumer loyalty for organic food. **British Food Journal**, v. 118, p. 697-713, 2016.

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**, v. 30, p. 43 – 53, 2014.

ESTRELA, L. L. S.; SILVA, M. L. L.; SANTOS, C. C. L.; PONTES, A. L. S.; EPAMINONDAS, P. S. **Avaliação da qualidade de leite condensado à base de extrato de coco**. In: Giselle Medeiros da Costa One; Adriana Gomes Cézar Carvalho. (Org.). Nutrição e saúde: os desafios da interdisciplinaridade nos ciclos da vida humana. 1ed.Campina Grande – PB: Instituto Bioeducação. IBEA, 2017, v. 3, p. 91-105.

EUROMONITOR INTERNATIONAL. The future of meat. (2019). Disponível em: https://www.euromonitor.com/the-future-ofmeat/report. Acesso em 5 de julho de 2020.

FÁBREGA, M. J.; RODRÍGUEZ-NOGALES, A.; GARRIDO-MESA, J.; ALGIERI, F.; BADIA, J.; GIMÉNEZ, R.; GÁLVEZ, J.; BALDOAM, L. "Intestinal Anti-inflammatory Effects of Outer Membrane Vesicles from *Escherichia coli Nissle* 1917 in DSS-experimental Colitis in Mice". **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1–13, 2017.

FARNWORTH, E. D.; MAINVILLE, A. Kefir-A Fermented milk product. **Handbook of Fermented Functional Foods Functional Foods and Nutraceuticals Series**, v. 2, n. 4, p. 89-128, 2008.

FEDERAÇÃO DAS INDÚSTRIAS DO ESTADO DE SÃO PAULO - FIESP. Brasil Food Trends 2020. São Paulo: FIESP; 2018. p. 61. Disponível em: http://www.brasilfoodtrends.com.br/Brasil_Food_Trends/files/publication.pdf. Acesso em 30 de junho de 2019.

FELS, L.; JAKOB, F.; VOGEL, R. F.; WEFERS, D. Structural characterization of the exopolysaccharides from water kefir. **Carbohydrate Polymers**, v.189, p.296–303, 2018.

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,** v. 22, n. 8, p. 732–742, 2016.

FIORDA, F. A.; PEREIRA, G. V. M.; THOMAZ-SOCCOL, V.; RAKSHIT, S. K.; PAGNONCELLI, M. G. B.; VANDENBERGHE, L. P. S.; SOCCOL, C. R. Microbiological, biochemical, and functional aspects of sugary kefir fermentation – a review. **Food Microbiology**, v. 66, p. 86–95, 2017.

FOURREAU, D.; PERETTI, N.; HENGY, B.; GILLET, Y.; COURTIL-TEYSSEDRE, S., HESS, L.; HEISSAT, S. Complications carentielles suite à l'utilisation de "laits" végétaux, chez des nourrissons de deux mois et demi à 14 mois (quatre cas). **La Presse Médicale**, v. 42, n. 2, p. 37-43, 2013.

FREIRIA, C.A.; SOUZA, J.S. de; COUTO, L.R.R.; SILVA, M.A.C.; VIEIRA, M.O.S. Campanha de Comunicação Ahimsa-Vegan Life. **Revista Eletrônica de Comunicação**, v.12, p. 98, 2017.

FUWA, H. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as the substrate. **Journal of Biochemistry**. v. 41, p. 583-603,1954.

GAO, J.; GU, F.; HE, J.; XIAO, J.; CHEN, Q.; RUAN, H.; HE, G. Metagenome analysis of bacterial diversity in Tibetan kefir grains. **European Food Research and Technology**, v. 236, p. 549 – 556, 2013.

GAHRUIE, H. H.; ESKANDARI, M. H.; MESBAHI, G.; HANIFPOUR, M. A. Scientific and technical aspects of yogurt fortification: A review. **Food Science and Human Wellness**, v. 4, n. 1, p. 1–8, 2015.

GAROFALO, C.; OSIMANI, A.; MILANOVIC, V.; AQUILANTI, L.; DE FILIPPIS, F.; STELLATO, G.; DI MAURO, S.; TURCHETTI, B.; BUZZINI, P.; ERCOLINI, D.; CLEMENTI, F. Bacteria and yeast microbiota in milk kefir grains from different Italian regions. **Food Microbiol**., v. 49, p.123-133, 2015.

GHOSH, K., RAY, M.; ADAK, A.; HALDER, S. K.; DAS, A.; JANA, A.; PARUA, S.; VÁGVÖLGYI, C.; DAS MOHAPATRA, P. K.; PATI, B. R.; MONDAL, K. C. Role of probiotic Lactobacillus fermentum KKL1 in the preparation of a rice based fermented beverage. **Bioresource Technology**, v. 188, p. 161–168, 2015.

GORSEK, A.; RITONJA, J.; PECAR, D. Mathematical modelling of carbon dioxide production in milk inoculated by kefir grains. **Journal of Biotechnology**, v. 231, p. 86, 2016.

GRAÇA, A. P. O. DA.; MARIA, T. C.; AGUIAR-OLIVEIRA, E.; DEZIDERIO, M. A.; MAZALLI, M. R.; KAMIMURA, E. S.; MALDONADO, R. R. Cupuassu as a potential substrate for fermentation using kefir grains. **European International Journal of Science and Technology**, v. 7, n. 6, 2018.

GRASSO, N.; ALONSO-MIRAVALLES, L.; O'MAHONY, J. A. Composition, Physicochemical and Sensorial Properties of Commercial Plant-Based Yogurts. **Foods**, v. 9, p. 252, 2020.

GREWAL, N.; FAUBION, J.; FENG, G.; KAUFMAN, R. C.; WILSON, J. D.; SHI, Y. C. Structure of waxy corn starch hydrolyzed by maltogenic α-amylase in relation to its retrogradation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, p. 4196 – 4201, 2015.

GUILLAMÓN, J.M.; MAS, A. **Acetic acid bacteria**. In: KONIG, H., UNDEN, G., FROHLICH, J. Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine. Springer, Heidelberg, Germany, p. 31 - 46.

GUITEL. Flor do açúcar de coco (2018). Disponível em https://www.rainforestherbs.com.my/organic-coconut-sugar/. Acesso em 28 de abril de 2020.

GUL, O.; ATALAR, I.; MORTAS, M.; DERVISOGLU, M. "Rheological, Textural, Colour and Sensorial Properties of Kefir Produced with Buffalo Milk Using Kefir Grains and Starter Culture: A Comparison with Cows' Milk Kefir". **International Journal of Dairy Technology**, v. 71, p. 73–80, 2018.

GULITZ, A.; STADIE, J.; WENNING, M.; EHRMANN, M. A.; VOGEL, R. F. The microbial diversity of water kefir. **International Journal of Food Microbiology**, v.151, p. 284–288, 2011.

GUPTA, N.; JANGID, A. K.; POOJA, D.; KULHARI, H. Inulin: A novel and stretchy polysaccharide tool for biomedical and nutritional applications**. International Journal of Biological Macromolecules**, v. 132, p. 852-863, 2019.

HASAN, F., A. A.; SHAH, A. HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme Microbiol Technology**. 39:235–251, 2006.

HEBBAR, K.; ARIVALAGAN, M.; MANIKANTAN, M.; MATHEW, A.; THAMBAN, C.; THOMAS, G. V. Coconut inflorescence sap and its value addition as sugar–collection

techniques, yield, properties and market perspective. **Current Science**, v.109, p.1411–1417, 2015.

HECK, T.; FACCIO, G.; RICHTER, M.; THONY-MEYER, L. Enzyme-catalyzed protein crosslinking. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 2, p. 461-475, 2013.

HONGYU, K.; SANDANIELO, V. L. M.; OLIVEIRA JUNIOR, G. J.; Análise de Componentes Principais: resumo teórico, aplicação e interpretação. **E&S – Engineering and Science**, v. 1, n. 5, p. 83-90, 2015.

HOOPER, L.; MARTIN, N.; JIMOH, O. F.; KIRK, C.; FOSTER, E.; ABDELHAMID, A. S. Reduction in saturated fat intake for cardiovascular disease. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, 2020.

HUNTERLAB. (1996), CIE L*a*b* color scale. Applications. Disponível em: www.Hunterlab.Com/Application-Notes.Html. Acesso em: 28 de julho de 2020.

IBOPE. Pesquisa de opinião pública sobre vegetarianismo. (2018). Disponível em: https://www.svb.org.br/images/Documentos/JOB_0416_VEGETARIANISMO.pdf. Acesso em 12 de julho de 2020.

IKRAM-UL-HÁ, Q.; ALI, S. Kinetics of invertase production by *Saccharomyces cerevisiae* in batch cultures. **Pakistan Journal of Botany**, v. 39, p. 907 – 912, 2007.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ – IAL. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. v. 1, 1020 p.

JESKE, S.; ZANNINI, E.; ARENDT, E. K. (2017a). Evaluation of physicochemical and glycemic properties of commercial plant-based milk substitutes. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 72, n. 1, p. 26–33, 2017a.

JESKE, S.; ZANNINI, E.; ARENDT, E. K. Past, present and future: The strength of plant-based dairy substitutes based on gluten-free raw materials. **Food Research International**, v. 110, p. 42–51, 2017b.

JIANG, P.; XIANG, D.; WANG, X. Effect of Different Treatment on the Properties of Coconut Milk Emulsions. **Food Science and Technology Research**, v.22, n.1. p. 83-89, 2016.

JIANZHONGA, Z.; XIAOLIA, L.; HANHUB, J.; MINGSHENG, D. Analysis of the microflora in Tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis. **Food Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, p. 543 – 548, 2010.

JOLLIFFE, I.T. Discarding Variables in a Principal Component Analysis. II: Real Data. **Journal of the Royal Statistical Society**, v. 22, n. 1, p. 21–31, 1973.

JOSE, S. P.; ASHA, S.; KRISHNAKUMAR, I. M.; RATHEESH, M.; SANTHOSH, S.; SAVITHA, S.; SANDYA, S.; GIRISH KUMAR, G. B.; PRAMOD, C. Nephro-protective effect of a novel formulation of unopened coconut inflorescence sap powder on gentamicin induced renal damage by modulating oxidative stress and inflammatory markers. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 85, p. 128–135, 2017.

KAISER, H. F. The Varimax criterion for analytic rotation in factor analysis. **Psychometrika,** v. 23, n. 3.p. 187-200, 1958.

KALYANI NAIR, K.; KHARB, S.; THOMPKINSON, D. K. Inulin dietary fiber with functional and health attributes - a review. **Food Reviews International,** v. 26, p.189–203, 2010.

KANG, Z.Q.; YANG, Y.; XIAO, B. Saturated fat in the diet intake and risk of stroke: systematic review and dose-response meta-analysis of prospects five cohort studies**. Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, v. 30, p. 179-89, 2020.

KHAN, A. A.; ROBINSON, D. S. Hydrogen donor specificity of mango isoperoxidases. **Food Chemistry**, v. 49, n. 4, p. 407-410, 1994.

KOH, W. Y.; UTRA, U.; ROSMA, A.; EFFARIZAH, M. E.; ROSLI, W. I. W.; PARK, Y.-H. Development of a novel fermented pumpkin-based beverage inoculated with water kefir grains: a response surface methodology approach. **Food Science and Biotechnology**, v. 27, n. 2, p. 525-35, 2018.

KONKIT, M.; KIM, W. Activities of amylase, proteinase, and lipase enzymes from *Lactococcus chungangensis* and its application in dairy products. **Journal of Dairy Science**, v. 99 n. 7, p. 4999–5007, 2016.

KULKARNI, N. Coconut Neera: Nutritional drink needs promotion. (2015). Disponível em: http://www.nuffoodsspectrum.in/news/37/1305/coconut-neera-nutritional-drink-needs-promotion. Acesso em 24 de julho de 2020.

LAUREYS, D.; De VUYST, L. Microbial species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of water kefir fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, p. 2564–2572, 2014.

LEITE, A. M. O.; LEITE, D. C. A.; DEL AGUILA, E. M.; ALVARES, T. S.; PEIXOTO, R. S.; MIGUEL, M. A. L.; SILVA, J. T.; PASCHOALIN, V. M. F. Microbiological and chemical characteristics of Brazilian Kefir durin fermentation and storage processes. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 4149-4159, 2013a.

LEITE, A. M. O.; MIGUEL, M. A.; PEIXOTO, R. S.; ROSADO, A. S.; SILVA, J. T.; PASCHOALIN, V. M. Microbiological, technological and therapeutic properties of Kefir: a natural probiotic beverage. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 341-349, 2013b.

LIVNEY, Y. D. Nanostructured delivery systems in food: Latest developments and potential future directions. **Current Opinion in Food Science**, v. 3, p. 125-135, 2015.

LI, X.; LI, S.; LIANG, X.; MCCLEMENTS, D. J.; LIU, X.; LIU, F. Applications of oxidases in modification of food molecules and colloidal systems: Laccase, peroxidase and tyrosinase. **Trends in Food Science & Technology**, 2020.

LODY, R. **Coco**: comida, cultura e patrimônio. São Paulo: Editora Senac São Paulo, 2011.

LÓPEZ-ALT, J. K. **The Food Lab: Better Home Cooking through Science**, first ed. Norton (W.W), New York, 2017.

LOPUSIEWICZ, L.; DROZLOWSKA, E.; SIEDLECKA, P.; MEZYNSKA, M.; BARTKOWIAK, A. Preparation and characterization of novel flaxseed oil cake yogurt-like plant milk fortified with inulin. **Journal of Food & Nutrition Research**, v. 59, n. 1, p. 61-70, 2020.

MA, L.; LI, B.; HAN, F.; YAN, S.; WANG, L.; SUN, J. Evaluation of the chemical quality traits of soybean seeds, as related to sensory attributes of soymilk. **Food Chemistry**, 173, 694–701, 2015.

MAKINEN, O. E.; WANHALINNA, V.; ZANNINI, E.; ARENDT, E. K. Foods for special dietary needs: Non-dairy plant-based milk substitutes and fermented dairy-type products. **Journal Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, n. 1, p. 339–349, 2016.

MALDONADO, R. R.; AGUIAR-OLIVEIRA, E.; KAMIMURA, E. S.; MAZALLI, M. R. **Kefir and kombucha beverages: New substrates and Nutritional Characteristics.** In: SANKARANARAYANAN, A.; AMARENSAN, N; DHANASEKARAN, D. (org) Fermented Food Products, CRC Press and Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, EUA. 2020, p. 295-312.

MAMMEN, R.; JOHN, F.; KRISHNAKUMAR, I. M.; MALIAKEL, B.; MOHANAN, R.; FLEENOR, B. Safety and influence of a novel powder form of coconut inflorescence sap on glycemic index and lipid profile. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 23, p. 100-217, 2020.

MARTINS, C. R., JESUS JÚNIOR, L. A. DE. **Produção e comercialização de coco no Brasil frente ao comércio internacional: panorama 2014**. Aracaju. Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2014. 51 p.

MCCUEA, P. P.; SHETTY, K. Phenolic antioxidant mobilization during yogurt production from soymilk using Kefir cultures. **Process Biochemistry**, v. 40, p.1791–1797, 2005.

MEDINA, J. C. D.; WOICIECHOWSKI A. L.; GUIMARÃES, L. R. C.; KARP, S. G.; SOCCOL, C. R. Peroxidases. **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering**, p. 217-232, 2017.

MIGUEL, M. G. C. P.; CARDOSO, P. G.; MAGALHÃES, K. T.; SCHWAN, R. F. Profile of microbial communities present in tibico (sugary kefir) grains from different Brazilian states. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 27, p. 1875-1884, 2011.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426, 1959.

MIN, M.; BUNT, C. R.; MASON, S. L.; HUSSAIN, M. A. Non-dairy probiotic food products: An emerging group of functional foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 16, p. 2626–2641, 2018.

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**, v. 97, p. 647 – 655, 2004.

NARAYANANKUTTY, A.; ILLAM, S. P.; RAGHAVAMENON, A. C. Health impacts of different edible oils prepared from coconut (*Cocos nucifera*): A comprehensive review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 80, p. 1–7, 2018.

NEPA – NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISAS EM ALIMENTAÇÃO. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO)**. 4ª ed. Campinas: NEPA – UNICAMP, 2011. 161 p.

NIELSEN, B.; GÜRAKAN, G. C.; ÜNLÜ, G. Kefir: a multifaceted fermented dairy product. **Probiotics and Antimicro**, v. 6, n. 3-4, p.123-135, 2014.

NOGUEIRA, L. K.; AGUIAR-OLIVEIRA, E.; KAMIMURA, E. S.; MALDONADO, R. R. Milk and açaí berry pulp improve sensorial acceptability of Kefir fermented milk beverage. **ACTA Amazônica**, v. 46, n. 4, p. 417-424, 2016.

NORBERTO, A. P.; MARMENTINI, R. P.; CARVALHO, P. H.; CAMPAGNOLLO, F. B.; TAKEDA, H. H.; ALBERTE, T. M.; ROCHA, R. S.; CRUZ, A. G.; ALVARENGA, V. O.; SANT'ANA, A. S. Impact of partial and total replacement of milk by water-soluble soybean extract on fermentation and growth parameters of kefir microorganisms. **Food Science and Technology**, v. 93, p. 491-98, 2018.

OLATERU, C. T.; POPOOLA, B. M.; ALAGBE, G. O.; AJAO, O. Lactic acid bacteria fermentation of coconut milk and its effect on the nutritional, phytochemical, antibacterial and sensory properties of virgin coconut oil produced. **African Journal of Biotechnology**, v. 19, n. 6, p. 362–366, 2020.

PATIL, U.; BENJAKUL, S. Coconut milk and coconut oil: Their manufacture associated with protein functionality. **Journal of Food Science**, v. 83, n. 8, p.2019–2027, 2018.

PAUL, A. A.; KUMAR, S.; KUMAR, V.; SHARMA, R. Milk Analog: Plant-based alternatives to conventional milk, production, potential and health concerns. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p.1–19, 2019.

PCA - Philippine Coconut Authority. **Coconut processing technologies**: coconut sap sugar. Leaflet, 2015, p.5.

PEYER, L. C.; ZANNINI, E.; ARENDT, E. K. Lactic acid bacteria as sensory biomodulators for fermented cereal-based beverages. **Trends in Food Science & Technology**, v.54, p. 17–25, 2016.

PIMENTEL, T. C.; GARCIA, S.; PRUDENCIO, S. H. Iogurte probiótico com frutanos tipo inulina de diferentes graus de polimerização: características físico-químicas e microbiológicas e estabilidade ao armazenamento. **SEMINA: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 3, p. 1059–1070, 2012.

Plant Based Foods Association & The Good Food Institute. (2017). Plant based foods sales experience 8.1 percent growth over past year. Disponível em: http://www.prweb.com/releases/2017/09/prweb14683840.htm. Acesso em 24 de julho de 2020.

PONGSAWASDI, P.; YAGISAWA, M. Screening and identification of a cyclomaltodextrin glucanotransferase-producing bacteria. **Journal Fermentation Technology**, v. 65, n. 4, p. 463-467, 1987.

PRADO, M.R.; BLANDÓN, L.M.; VANDENBERGHE, L.P.; RODRIGUES, C.; CASTRO, G.R.; THOMAZ-SOCCOL; V., SOCCO.; C.R. "Milk Kefir: Composition, Microbial Cultures, Biological Activities, and Related Products." **Frontiers in Microbiology**, v.6, p. 1–10, 2015.

QUEIROZ, C. A.; SOLIGUETTI, D. F. G.; MORETTI, S. L. A. As principais dificuldades para vegetarianos se tornarem veganos: um estudo com o consumidor brasileiro. **Revista Demetra: alimentação, nutrição & saúde**, v. 13, n. 3, p. 535-54, 2018.

RESENDE, N. M.; FELIX, H. R.; SORE, M. R., A, M. M. N.; CAMPOS, K. E.; VOLPATO, G. T. The effects of coconut oil supplementation on the body composition and lipid profile of rats submitted to physical exercise. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.13, 2016.

RÉVILLION, J. P.; KAPP, C.; BADEJO, M. S.; DIAS, V. V. O mercado de alimentos vegetarianos e veganos: características e perspectivas. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 37, n. 1, p. 1–10, 2020.

RINCON, L.; BRAZ ASSUNÇÃO BOTELHO, R.; DE ALENCAR, E. R. Development of novel plant-based milk based on chickpea and coconut. **LWT - Food Science and Technology**, v. 128, p. 109-479, 2020.

ROSENFELD, D. L.; BURROW, A. L. The unified model of vegetarian identity: a conceptual framework for understanding plant-based food choices. **Appetite**, v.112, p.78-95, 2017.

RUBY, M. B. Vegetarianism. A blossoming field of study. **Appetite**, v. 58, p. 141-150, 2012.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v.42, n.1, 2006.

SABBE, S. Familiarity and purchasing intention of Belgian consumers for fresh and processed tropical fruit products. Brit. **Journal Food**, v.110, p. 805-818, 2008.

SANTOS, M. R; BASSOS, C. Análise físico-química e sensorial de gelatina à base de quefir. **Revista Disciplinarum Scientia**. Série: Ciências da Saúde, Santa Maria, v. 14, n. 1, p. 93-100, 2013.

SANTOS, D. C.; OLVEIRA FILHO, J. G.; SANTANA, A. C. A.; FREITAS, B. S. M.; SILVA, F. G.; TAKEUCHIA, K. P.; EGEA, M. B. Optimization of soymilk fermentation with kefir and the addition of inulin: Physicochemical, sensory and technological characteristics. **LWT - Food Science and Technology**, v. 104, p. 30–37, 2019.

SANTOS, M. C. M.; LEANDRO, E. S.; DE ALENCAR, E. R.; BRAZ ASSUNÇÃO BOTELHO, R. Fermentation of chickpea (*Cicer arietinum* L.) and coconut (*Coccus nucifera* L.) beverages by *Lactobacillus paracasei subsp paracasei* LBC 81: The influence of sugar content on growth and stability during storage. **LWT - Food Science and Technology,** 2020.

SASS, C. All-natural sweeteners that are (somewhat) healthier than sugar. (2017). Disponível em: https://www.health.com/nutrition/natural-sweeteners. Acesso em 24 de julho de 2020.

SAVEGNAGO, R. P.; CAETANO, S. L.; RAMOS, S. B.; NASCIMENTO, G. B.; SCHMIDT, G. S.; LEDUR, M. C.; MUNARI, D. P. Estimates of genetic parameters, and cluster and principal components analyses of breeding values related to egg production traits in a White Leghorn population, **Poultry Science**, 90, p.2174-2188. 2011.

SEO, M. K.; PARK, E. J.; KO, S.Y.; CHOI, E.W.; KIM, S. "Therapeutic Effects of Kefir Grain Lactobacillus-derived Extracellular Vesicles in Mice with 2, 4, 6-trinitrobenzene Sulfonic Acid-induced Inflammatory Bowel Disease". **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 10, p. 8662–8671. 2018.

SETHI, S.; TYAGI, S. K.; ANURAG, R. K. Plant-based milk alternatives an emerging segment of functional beverages: A review. **Journal of Food Science & Technology**, v. 53, n. 9, p. 3408–3423, 2016.

SHEELA, D. L.; NAZEEM, P. A.; NARAYANANKUTTY, A.; MANALIL, J. J.; RAGHAVAMENON, A. C. In Silico and Wet Lab Studies Reveal the Cholesterol Lowering Efficacy of Lauric Acid, a Medium Chain Fat of Coconut Oil. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 71, p. 410-415, 2016.

SHOAIB, M.; SHEHZAD, A.; OMAR, M.; RAKHA, A.; RAZA, H.; SHARIF, H. R.; SHAKEEL, A.; ANSARI, A.; NIAZI, S. Inulin: Properties, health benefits and food applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 147, p.444–454, 2016.

SILVA, A. T. DA, SILVA, F. T. DA, ALVES, J. D. S., PERES, D. S., GARCIA, L. G. C.; SANTOS, P. A. DOS. Physical-chemical profile and bioactive compounds of water-soluble baru extract (*Dipteryx alata Vogel*). **Research, Society and Development**, v. 9, n. 5, 2020.

SIMSEK, S.; SÁNCHEZ-RIVERA, L.; EL, S. N.; KARAKAYA, S.; RECIO, I. Characterization of in vitro gastrointestinal digests from low fat caprine kefir enriched with inulin. **International Dairy Journal**, v. 75, p. 68–74, 2017.

SINDHU, R.; SHIBURAJ, S.; SABU, A.; FERNANDES, P.; SINGHAL, R.; MATHEW, G. M.; NAIR, I, C.; JAYACHANDRAN, K.; VIDYA, J.; VANDENBERGHE, L. P. S.; DENIZ, I.; MADHAVAN, A.; BINOD, P.; SUKUMARAN, R. K.; KUMAR, S. S.; ANUSREE, M.; NAGAVEKAR, N.; SOUMYA, M.; JAYAKUMAR, A.; RADHAKRISHNAN, E.; KARP, S. G.; GIOVANA, M.; PAGNONCELLI, M. G. B.; PEREIRA, G. V. M.; SOCCOL, C. R.; DOGAN, S.; PANDEY, A. **Enzyme technology in food processing: recent developments and future perspectives.** Reference Module in Food Science, 2021, p. 192-199.

SINGHAL, S.; BAKER, R. D.; BAKER, S. S. A comparison of the nutritional value of cow's milk and nondairy beverages. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 64, n. 5, p. 799–805, 2017.

SINGH, R. S.; SINGH, T. **Microbial inulinases and pullulanases in the food industry**, in: KUMAR, A.; YADAV, M.; SEHRAWAT, N. (Eds.), Microbial Enzymes and Additives for the Food Industry, Nova Science Publishers Inc., USA, 2019, p. 23-52.

SINGH, R. S.; SINGH, T.; HASSAN, M.; KENNEDY, J. F. Updates on Inulinases: Structural aspects and biotechnological applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2020.

SKRZYPCZAK, K.; JABŁOŃSKA-RYŚ, E.; GUSTAW, K.; SŁAWIŃSKA, A.; WAŚKO, A.; RADZKI, W.; MICHALAK-MAJEWSKA, M.; GUSTAW, W. Reinforcement of the antioxidative properties of chickpea beverages through fermentation carried out by probiotic strain *Lactobacillus plantarum* 299v. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 1–12, 2019.

SOCIEDADE BRASILEIRA VEGETARIANA - SBV. Vegetarianismo (2016), p. 2. Disponível em: http://www.svb.org.br/vegetarianismo1. Acesso em 29 de junho de 2019.

SOTTIRATTANAPAN, P.; NANTACHAI, K.; DADUANG, S.; FUNAHASHI, T.; YAMADA, M. Purification and characterization of amylase from roots of *Paederia foetida* Linn. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 10, p. 329-335, 2017.

TANGYU, M.; MULLER, J.; BOLTEN, C. J.; WITTMANN, C. Fermentation of alternatives to plant-based milk to improve taste and nutritional value. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2019.

TOMASIK, P. **Chemical and Functional Properties of Food Saccharides**. New York: CRC Press. 2015.

TU, C.; AZI, F.; HUANG, J.; XU, X.; XING, G.; DONG, M. Quality and metagenomic evaluation of a novel functional beverage produced from soy whey using water kefir grains. **LWT – Food Science and Technology**, v. 113, p. 108-258, 2019.

VÄKEVÄINEN, K.; LUDENA-URQUIZO, F.; KORKALA, E.; LAPVETELÄINEN, A.; PERÄNIEMI, S.; VON WRIGGT, A.; PLUMED-FERRER, C. Potential of quinoa in the development of fermented spoonable vegan products. **LWT - Food Science and Technology**, v. 120, p. 108-912, 2020.

VANGA, S. K.; RAGHAVAN, V. How well do plant-based alternatives fare nutritionally compared to cow's milk? **Journal of Food Science & Technology**, v. 55, n.1, p.10–20, 2018.

VIANA, R. O.; MAGALHÃES-GUEDES, K. T.; BRAGA, R. A. JR.; DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F. "Fermentation Process for Production of Apple-based Kefir Vinegar: Microbiological, Chemical and Sensory Analysis". **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 592–601, 2017.

VOJDANI, A.; TURNPAUGH, C.; VOJDANI, E. Immune reactivity against a variety of mammalian milks and plant-based milk substitutes. **Journal of Dairy Research**, v. 85, n. 3, p. 358–365, 2018.

YÉPEZ, A.; RUSSO, P.; SPANO, G.; KHOMENKO, I.; BIASOLI, F.; CAPOZZI, V.; AZNAR, R. "In Situ Riboflavin Fortification of Different Kefir-like Cereal-based Beverages Using Selected Andean LAB Strains". **Food Microbiology**, v. 77, p. 61–68, 2019.

WANG, Y.; QIAN, P. Y. Conservative Fragments in Bacterial 16S rRNA Genes and Primer Design for 16S Ribosomal DNA Amplicons in Metagenomic Studies. **PLOS ONE**, v. 4, n. 10, p. 7401, 2009.

WANG, W.; CHEN, H.; KE, D.; CHEN, W.; ZHONG, Q.; CHEN, W.; YUN, Y. H. Effect of sterilization and storage on volatile compounds, sensory properties and physicochemical properties of coconut milk. **Microchemical Journal**, v. 153, p. 104-532, 2019.

WRAGE, J.; BURMESTER, S.; KUBALLA, J.; ROHN, S. Coconut sugar (*Cocos nucifera* L.): Production process, chemical characterization, and sensory properties. **LWT - Food Science and Technology**, v. 112, p. 108-227, 2019.

YAAKOB, H.; AHMED, N. R.; DAUD, S. K.; MALEK, R. A.; RAHMAN, R. A. Optimization of ingredient and processing levels for the production of coconut yogurt using response surface methodology. **Food Science and Biotechnology**, v. 21, n. 4, p.933-940, 2012.

ZELOVITIS, I.; VLACHOU, A.-M.; PAPPA, E. C.; KONDYLI, E. Manufacture of a "Functional" Fermented Milk Product with the Addition of an Alcoholic Plant Origin Extract. **Current Research in Nutrition and Food Science**, v. 4, n. 2, p. 97-104, 2016.

ZAIDEL, D. N. A.; CHRONAKIS, I. S.; MEYER, A. S. Stabilization of oil-in-water emulsions by enzyme catalyzed oxidative gelation of sugar beet pectin. **Food Hydrocolloids**, v. 30, n.1, p. 1165 19-25, 2013.

ZHANG, Z.; DONALDSON, A. A.; MA, X. Advancements and future directions in enzyme technology for biomass conversion. **Biotechnology Advances**, v.30, p.913-919, 2012.

ZHANG, L.; LI, L.; QIAO, Y.; ZHANG, Y.; ZHENG, W.; ZHAO, Y.; HUANG, Y.; CUI, Z. Improvement of the quality and shelf life of wheat bread by a maltohexaose producing α-amylase. **Journal of Cereal Science**, v. 87, p. 165-71, 2019.

ZHOU, J.; LIU, X.; JIANG, H.; DONG, M. Analysis of the microflora in Tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis. **Food Microbiology**, v. 26, p. 770 – 775, 2009.

ZHU, X.; ZHAO, Z.; WANG, L.; ZHANG, L. A new method to measure fat content in coconut milk based on Y-type optic fiber system. **Optik (Stuttg)**, v. 125, p. 6172–6178, 2014.