

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

**FLAVIA LETICIA SANCHES**

**ESTUDO E CARACTERIZAÇÃO DE KEFIR DE ÁGUA A BASE DE QUINOA**

**LARANJEIRAS DO SUL**

**2023**

**FLAVIA LETICIA SANCHES**

**ESTUDO E CARACTERIZAÇÃO DE KEFIR DE ÁGUA A BASE DE QUINOA**

Dissertação apresentada para o Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Larissa Canhadas Bertan

**LARANJEIRAS DO SUL**

**2023**

**Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS**

Sanches, Flavia Leticia  
ESTUDO E CARACTERIZAÇÃO DE KEFIR DE ÁGUA A BASE DE  
QUINOA / Flavia Leticia Sanches. -- 2023.  
54 f.:il.

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Larissa Canhadas Bertan

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da  
Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciência e  
Tecnologia de Alimentos, Laranjeiras do Sul, PR, 2023.

1. Mercado vegano. 2. Delineamento experimental. 3.  
Inulina. I. Bertan, Larissa Canhadas, orient. II.  
Universidade Federal da Fronteira Sul. III. Título.

**FLAVIA LETICIA SANCHES**

## **ESTUDO E CARACTERIZAÇÃO DE KEFIR DE ÁGUA A BASE DE QUINOA**

Dissertação apresentada para o Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Larissa Canhadas Bertan

Este trabalho foi defendido e aprovado pela banca em: 21/11/2023

### **BANCA EXAMINADORA**

Documento assinado digitalmente  
 **ADRIANE ELISABETE ANTUNES DE MORAES**  
Data: 18/12/2023 10:18:09-0300  
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

---

**Prof<sup>ª</sup>. Dra. Adriane Elisabete Antunes de Moraes**  
(Faculdade de Ciências Aplicadas - FCA/UNICAMP – avaliadora)

Documento assinado digitalmente  
 **JOAO PAULO BENDER**  
Data: 18/12/2023 09:08:08-0300  
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

---

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

Documento assinado digitalmente  
 **LARISSA CANHADAS BERTAN**  
Data: 18/12/2023 10:51:09-0300  
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

---

**Prof<sup>ª</sup>. Dra. Larissa Canhadas Bertan – UFFS**  
(UFFS/*Campus* Laranjeiras do Sul-PR – presidente/orientadora)

Dedico este trabalho àqueles que me amam, mesmo em minha ausência física (por vezes diária): Meus pais, avós e marido.

## AGRADECIMENTOS

Encerro este ciclo com orgulho e gratidão. Talvez a Flavia criança nunca teve a dimensão de tudo que iria conquistar, porém hoje vejo que tudo foi possível quando apoiada em ombros de gigantes! Começo agradecendo a grande professora, cientista e amiga que conquistei na vida, minha orientadora Prof. Dra. Larissa Canhadas Bertan, por sempre acreditar em mim e me desafiar a fazer mais, por enxergar em mim um potencial que por vezes apenas ela via. Em complemento, agradeço Prof. Dra. Cátia Tavares dos Passos Francisco por ser tão doce e presente, muitas vezes junto comigo no laboratório para ter certeza de que tudo daria certo, sempre com seu brilho no olhar inspirador. Agradeço também a Prof. Dra. Helen Treichel por acreditar neste trabalho e investir tempo e recursos importantes de suas pesquisas, sempre presente ajudando a gerar e analisar os dados, foi uma honra trabalhar com todas vocês.

Durante essa jornada também reafirmei amizades que a graduação já havia me apresentado, Eliane Pompeu de Jesus, por mesmo sem nenhuma obrigação encarou junto comigo o laboratório, além dos alunos Gessica Andrade e Luan Diniz que fizeram todos os testes necessários e fizeram com que o projeto iniciasse ainda na minha ausência física, devido à distância. Uma outra grande mulher que espero levar além do mestrado é Claudia Weis, uma companheira sempre solícita, eficiente, forte, inspiradora, do tipo de pessoa que precisamos ter perto. Obrigada todos vocês por ajudarem a fazer esse trabalho dar certo!

Importante agradecer à Universidade Federal da Fronteira Sul, minha casa, meu berço, minha origem, onde me descobri profissional e conheci pessoas incríveis. Agradeço muito a todos os professores, técnicos e alunos que sempre me ajudaram a vencer a distância nestes dois anos de mestrado, em especial Prof. Dr. Luciano Tormen, Marcia Miss, Silvia Tormen e Milena Cia Retcheski. Além da Prof. Dra. Anna Rafaela Cavalcante Braga, da Universidade Federal de São Paulo, pela parceria na realização de uma das etapas mais importantes do trabalho, a simulação da digestão *in vitro*.

Por fim, minha base, a família. Meu marido, Victor, por sempre me apoiar a ir além e reafirmar todos os dias a escolha certa que fiz em querer dividir a vida contigo. Agradeço meu pai por ter doado o dia dos pais de 2023 para que eu estivesse no laboratório, confortando meu coração que ainda teríamos vários outros juntos. Minha mãe, meus avós, meus tios e primos – quanto amor! Obrigada, sou mais feliz hoje por ter vocês para dividir essa conquista.

## RESUMO

A quinoa é uma espécie vegetal da família *Chenopodiaceae*, rica em proteínas, lipídios e fibras, o que lhe confere um interessante valor nutricional. Apesar de altamente nutritiva e possuir vantagens tecnológicas, ainda é pouco explorada e conhecida por consumidores. Portanto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar uma bebida, especialmente para o público com restrição ao consumo de lactose, proteína do leite e/ou vegano, a base de extrato vegetal hidrossolúvel de quinoa (EVHQ) fermentada com grãos de kefir de água. Inicialmente foi elaborado um EVHQ, no qual foi avaliado o efeito da concentração de sacarose (CS) (2; 6 e 10% (m/v)), concentração de inulina (CI) (2,5; 3,0 e 3,5% (m/v)) e concentração de goma xantana (CGX) (0; 0,08 e 0,16% (m/v)) através de um planejamento composto central (DCC)  $2^3$ , contendo 3 pontos centrais. As onze formulações foram submetidas à fermentação com 5% (m/v) de kefir de água a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  por 12 horas, sendo posteriormente caracterizadas quanto: (i) ao crescimento celular dos grãos, (ii) rendimento da bebida, (iii) pH, (iv) sólidos solúveis, (v) produção de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), (vi) de ácido láctico e (vii) produção de etanol. As maiores taxas de crescimento dos grãos de kefir foram obtidos nas máximas CI (3,5% (m/v)) e CGX (0,16 % (m/v)), independente da CS. Ainda, foi possível identificar que o rendimento e concentração de ácido láctico apresentam comportamento contrário, onde quanto maior a produção de ácido láctico, houve maior necessidade de consumo de substrato e consecutivo redução de rendimento. Após análise das variáveis dependentes via análise de regressão, não foi evidenciado interações significativas ( $p \leq 0,05$ ) em um intervalo de confiança de 95% ( $\alpha = 5\%$ ). Deste modo, para a etapa final foram selecionadas as amostras F1F (CS 2, CI 2,5 e CG X 0% (m/v)) e F8F (CS 10, CI 3,5 e CG X 0,16% (m/v)), devido serem os extremos das formulações. As formulações foram caracterizadas quanto a composição centesimal, análise de compostos orgânicos, composição microbiológica da cultura de kefir, análise sensorial e caracterização enzimática e microbiológica antes e após simulação de digestão gastrointestinal *in vitro*. Na caracterização centesimal, a fermentação aumentou a quantidade de proteínas devido à alta atividade proteolíticas dos microrganismos presentes no kefir, além do aumento do teor lipídico. A identificação dos microrganismos houve prevalência de leveduras *Saccharomyces sp.*, o que explicou as concentrações de etanol identificados na composição de compostos orgânicos através da metabolização de glicose, frutose e celobiose. Na análise sensorial, a formulação F8F apresentaram melhores resultados quando comparada com a formulação F1F. A digestão gastrointestinal *in vitro* evidenciou a redução de bactérias ácido lácticas e leveduras e aumento de bactérias ácido acética na fase líquida para ambas as formulações. Já para parte sólida, houve o aumento bactérias ácido lácticas e leveduras e as bactérias ácido acética mantiveram-se altas. No perfil enzimático houve redução de todas as enzimas analisadas para ambas as formulações, exceto para a amilase na F1F, que foi de 14,05 U/mL para 39,41 U/mL. Portanto, conclui-se que a utilização de EVHQ como substrato para a produção de bebida fermentada com cultura de kefir de água mostra-se como uma alternativa viável para atendimento de um nicho específico de mercado, com vantagens nutricionais e tecnológicas.

Palavras-chave: Mercado vegano. Delineamento experimental. Inulina.

## ABSTRACT

Quinoa is a plant species from the *Chenopodiaceae* family, rich in proteins, lipids and fiber, which gives it an interesting nutritional value. Despite being highly nutritious and having technological advantages, it is still little explored and known by consumers. Therefore, the objective of this work was to develop and characterize a drink, especially for the public with restrictions on the consumption of lactose, milk protein and/or vegan, based on water-soluble vegetable extract of quinoa (WVEQ) fermented with water kefir grains. Initially, an WVEQ was created, in which the effect of sucrose concentration (SC) (2; 6 and 10% (w/v)), inulin concentration (IC) (2.5; 3.0 and 3.5% (w/v)) and xanthan gum concentration (XGC) (0, 0.08 and 0.16% (w/v)) through a central composite design (CCD)  $2^3$ , containing 3 central points. The eleven formulations were subjected to fermentation with 5% (w/v) water kefir at  $25\pm 1^\circ\text{C}$  for 12 hours and were subsequently characterized regarding: (i) cell growth of the grains, (ii) beverage yield, (iii) pH, (iv) soluble solids, (v) production of carbon dioxide ( $\text{CO}_2$ ), (vi) lactic acid and (vii) production of ethanol. The highest growth rates of kefir grains were obtained at maximum IC (3.5% (w/v)) and XGC (0.16% (w/v)), regardless of SC. Furthermore, it was possible to identify that the yield and concentration of lactic acid show opposite behavior, where the greater the production of lactic acid, there is a greater need for substrate consumption and a consecutive reduction in yield. After analyzing the dependent variables via regression analysis, no significant interactions were found ( $p \leq 0.05$ ) within a 95% confidence interval ( $\alpha = 5\%$ ). Therefore, for the final stage, samples F1 (SC 2, IC 2.5 and XGC 0% (w/v)) and F8 (SC 10, IC 3.5 and XGC 0.16% (w/v)), because these are the extremes of the formulations, which are characterized in terms of proximate composition, microbiological composition of the kefir culture, analysis of organic compounds, sensory analysis and enzymatic and microbiological characterization before and after simulation of *in vitro* gastrointestinal digestion. In the centesimal characterization, fermentation increased the amount of proteins due to the high proteolytic activity of the microorganisms present in kefir, in addition to the increase in lipid content. The identification of microorganisms showed a prevalence of yeasts *Saccharomyces* sp., which explained the concentrations of ethanol identified in the composition of organic compounds through the metabolism of glucose, fructose and cellobiose. In the sensory analysis, the F8 formulation showed better results when compared to the F1 formulation. *In vitro* gastrointestinal digestion showed a reduction in lactic acid bacteria and yeast and an increase in acetic acid bacteria in the liquid phase for both formulations. As for the solid part, there was an increase in lactic acid bacteria and yeasts and acetic acid bacteria remained high. In the enzymatic profile, there was a reduction in all enzymes analyzed for both formulations, except for amylase in F1F, which went from 14.05 U/ mL to 39.41 U/mL. Therefore, it is concluded that the use of WVEQ as a substrate for the production of fermented beverages with water kefir culture appears to be a viable alternative for serving a specific market niche, with nutritional and technological advantages.

Keywords: Vegan market. Experimental design. Inulin.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	<b>13</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	13
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	13
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>14</b>
3.1	MATERIAIS .....	14
3.2	MÉTODOS.....	14
<b>3.2.1</b>	<b>Elaboração do extrato vegetal hidrossolúvel de quinoa (EVHQ) fermentado</b>	<b>14</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Análises físico-químicas dos EVHQ fermentados</b> .....	<b>17</b>
3.2.2.1	<i>Crescimento celular dos grãos de kefir</i> .....	17
3.2.2.2	<i>Rendimento</i> .....	17
3.2.2.3	<i>Determinação do pH</i> .....	17
3.2.2.4	<i>Determinação dos sólidos solúveis</i> .....	17
3.2.2.5	<i>Produção de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>)</i> .....	17
3.2.2.6	<i>Determinação de ácido láctico</i> .....	18
3.2.2.7	<i>Determinação de etanol</i> .....	18
<b>3.2.3</b>	<b>Caracterização das formulações selecionadas</b> .....	<b>18</b>
3.2.3.1	<i>Caracterização centesimal</i> .....	18
3.2.3.2	<i>Determinação de compostos orgânicos</i> .....	18
3.2.3.3	<i>Identificação dos microrganismos da cultura de kefir</i> .....	19
3.2.3.4	<i>Análise microbiológica para a determinação da segurança</i> .....	19
3.2.3.5	<i>Análise sensorial</i> .....	20
<b>3.2.4</b>	<b>Simulação de digestão gastrointestinal <i>in vitro</i></b> .....	<b>21</b>
<b>3.2.5</b>	<b>Determinação da atividade enzimática</b> .....	<b>22</b>
3.2.5.1	<i>Amilase</i> .....	22
3.2.5.2	<i>Celulase</i> .....	22
3.2.5.3	<i>Lacase</i> .....	23
3.2.5.4	<i>Lipase</i> .....	23
3.2.5.5	<i>Protease</i> .....	24
3.2.5.6	<i>Peroxidase</i> .....	24
<b>3.2.6</b>	<b>Caracterização microbiológica</b> .....	<b>25</b>

3.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	25
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>26</b>
4.1	DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL (DCC) .....	26
4.2	COMPOSIÇÃO CENTESIMAL .....	30
4.3	COMPOSTOS ORGÂNICOS .....	33
4.4	IDENTIFICAÇÃO E VARIEDADE DOS MICRORGANISMOS DA CULTURA DE KEFIR .....	35
4.5	ANÁLISE MICROBIOLÓGICA PARA A DETERMINAÇÃO DA SEGURANÇA DAS BEBIDAS .....	38
4.6	ANÁLISE SENSORIAL.....	38
4.7	CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA E ENZIMÁTICA APÓS SIMULAÇÃO DE DIGESTÃO GASTROINTESTINAL <i>IN VITRO</i> .....	41
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>45</b>
<b>6</b>	<b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>46</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>47</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O perfil alimentar dos consumidores vem apresentando crescente tendência para dietas a base de vegetais, em virtude do aumento da quantidade de pessoas veganas e/ou que apresentam alguma alergia alimentar que restrinja o consumo de leite de vaca (DINIZ; COURA; RODRIGUES, 2020; MOSSO et al., 2020; VÄKEVÄINEN et al., 2020). Os veganos são aquelas pessoas cujos hábitos alimentares consistem na exclusão do consumo de produtos de origem animal, seja por questões éticas como o bem-estar animal, como também, por buscarem um sistema alimentar mais sustentável (CLARK; POPE; BELARMINO, 2022; LÓPEZ-MARTÍNEZ; MORENO-FERNÁNDEZ; MIGUEL, 2021). Assim, sua dieta é à base de cereais, pseudocereais, vegetais, frutas, sementes e nozes (AYDAR; TUTUNCU; OZCELIK, 2020). Além disso, o aumento do consumo de alimentos à base de vegetais também pode ser associado a fatores fisiológicos como intolerância à lactose e/ou alergias às proteínas do leite ( $\alpha$ -lactoalbumina,  $\beta$ -lactoglobulina e caseína) (SHARMA et al., 2001; VANGA; RAGHAVAN, 2018). Logo, a forma mais efetiva de tratamento é a exclusão do leite e derivados da dieta (FACIONI et al., 2020).

Essas mudanças do perfil consumidor, podem ser comprovadas ao consultarem pesquisas de mercado. O mercado vegano vem aumentando, sendo que as vendas globais em 2015 atingiram um valor de 2,22 bilhões de dólares e, em 2019, esse valor atingiu cerca de 55 bilhões de dólares. Em 2023, há perspectiva de alcançar mais de 60 bilhões de dólares (STATISTA RESEARCH DEPARTMENT, 2023).

Além de questões mercadológicas, também deve-se considerar os impactos nutricionais que essa mudança de hábitos pode acarretar à população. Apesar de muitas vezes apresentarem características sensoriais semelhantes aos produtos de origem animal, há uma lacuna quando analisado a presença e biodisponibilidade de alguns componentes nutricionais, como por exemplo, vitaminas do complexo B (ZHANG; HUGHES; GRAFENAUER, 2020). Assim, pesquisas devem ser realizadas focando tais aspectos.

Em virtude disso, a indústria alimentícia vem se aprimorando em pesquisas e tecnologias que abrangem o desenvolvimento de novos produtos, ingredientes e métodos de produção que atendam a este nicho de consumidores (BALLCO; GRACIA, 2020). Desta forma, visando o aumento de público com predominância vegana em sua alimentação e as características tecnológicas de produtos de origem vegetal, diversos estudos vêm sendo realizados com o intuito de utilizar formulações com extratos vegetais hidrossolúveis como

castanha de caju e baru, avelã, quinoa, grão de bico, coco, entre outros para elaboração de diversos tipos de produtos (ALVES et al., 2021; ATALAR, 2019; CO et al., 2020;; RINCON; BOTELHO; DE ALENCAR, 2020; SANCHES et al., 2022; SILVA et al., 2020; VÄKEVÄINEN et al., 2020).

Os extratos vegetais têm sido uma alternativa viável e promissora na substituição do leite de vaca fluido, assim como, para a elaboração de produtos, como bebidas fermentadas (SETHI; TYAGI; ANURAG, 2016). A bebida fermentada é um alimento que está inserido na dieta brasileira, por ser saudável e prático, entretanto, é excluída do cardápio de pessoas veganas e/ou que possuem sensibilidade às proteínas do leite e/ou intolerância à lactose por, habitualmente, ser oriundo do leite de animais (vaca, cabra, etc) (PANDEY; RITZ; PEREZ-CUETO, 2021). Logo, torna-se fundamental realizar estudos que possibilitem a criação de uma forma substitutiva a esse produto. Nesse sentido, as bebidas fermentadas veganas surgem como opção promissora.

O processo fermentativo em extratos vegetais contribui para a palatabilidade e para as características sensoriais, como também é responsável por otimizar a biodisponibilidade, absorção e digestibilidade de nutrientes presentes no meio pelo organismo humano. Isso ocorre principalmente devido à ruptura das paredes celulares de plantas e a liberação de enzimas e demais componentes bioativos, bem como a redução do pH do meio (ADEBO et al., 2022; CARULLO et al., 2022).

Entre as opções de extrato vegetais existentes no mercado, as mais comuns são as elaboradas com soja (JESKE; ZANNINI; ARENDT, 2017). A aceitação do extrato de soja é limitada pois apresenta características sensoriais semelhantes à do feijão cru, assim como, um *flavor* desagradável e um alto teor de oligossacarídeos como a rafinose e estaquiose, responsáveis pelos fatores de flatulência que limitam o consumo (HOU; YU; CHOU, 2000). Portanto, a indústria de alimentos tem investido em pesquisas e tecnologias com o objetivo de viabilizar a utilização de outras matérias-primas para criar produtos diversificados que atendam a demanda de consumidores veganos, alérgicos ao leite e à soja, como a utilização de extratos vegetais hidrossolúveis alternativos (VÄKEVÄINEN et al., 2020).

O kefir é constituído por uma mistura de microrganismos, predominantemente de bactérias ácido-láticas e leveduras, que atuam em simbiose e são utilizados na elaboração de bebida fermentada. Sua produção pode ocorrer tanto com substrato de origem animal (leite de diferentes espécies animais), como vegetal (açúcar mascavo, leite de arroz, soja, entre outras). Além da versatilidade, estudos demonstram que a bebida fermentada de kefir é um produto rico em ácido lático, acético e glicônico, álcool etílico, gás carbônico, vitamina B12 e

polissacarídeos (EGEA et al., 2022; GANATSIOS et al., 2021; LEITE et al., 2013; MORETTI et al., 2022). Desta forma, é considerado como uma alternativa adequada ao atendimento de necessidades nutricionais do público vegano ou alérgicos/intolerantes à produtos à base de leite (GÖKIRMAKLI; GÜZEL-SEYDIM, 2022).

A atividade enzimática é um fator determinante para a otimização da fermentação e para produção da bebida fermentada de kefir, pois está diretamente envolvida na degradação de aminoácidos e peptídeos necessários para a rota metabólica destes microrganismos e liberação de subprodutos de maior valor nutricional e responsáveis pelas alterações sensoriais (PENDÓN et al., 2022). Vale ressaltar que as características nutricionais do kefir também são impactadas pelas características do extrato vegetal hidrossolúvel submetido à fermentação, principalmente quanto ao seu conteúdo de ácidos graxos e digestibilidade de proteínas (MARTÍNEZ-PADILLA et al., 2020). Ademais, a ação microbiológica também garante a inibição de contaminação de deteriorantes e patógenos, através da presença de ácidos que reduzem o pH, mantendo a biossegurança do produto elaborado (MORETTI et al., 2022). Portanto, devido à grande gama de possibilidades de aplicação de grãos de kefir de água na produção de bebidas fermentadas, diversos estudos vêm sendo realizados em busca do desenvolvimento de novos produtos, como a fermentação em extratos hidrossolúveis de quinoa, cereja, espinafre, rosa, romã, ameixa vermelha, subproduto de processamento de jaca, uma composição de maçã, morango, cenoura e beterraba, entre outros (OZCELIK; AKAN; KINIK, 2021; PABLO; CIMA FRANCA, 2022; PAREDES; ESCUDERO-GILETE; VICARIO, 2022).

A quinoa pode ser utilizada como base para a elaboração de extrato vegetal e se necessário, posterior tratamento tecnológico. A quinoa é uma espécie vegetal da família *Chenopodiaceae*, é considerado um pseudo grão rico em proteínas, lipídios e fibras, o que lhe confere um interessante valor nutricional. Apesar de altamente nutritiva e possuir vantagens tecnológicas, ainda é pouco explorada e conhecida por consumidores (NAVRUZ-VARLI; SANLIER, 2016). Assim, a utilização desta matéria-prima para elaboração de uma bebida fermentada vegana pode ser interessante.

Frente ao exposto, ao conciliar o aumento do consumo de produtos para o público vegano e/ou para pessoas que possuem alguma alergia que restrinja o consumo de alguns tipos de alimentos, com o desenvolvimento de novos produtos se faz necessário. Dessa forma, a utilização de extrato vegetal hidrossolúvel de quinoa como matéria-prima na criação de produtos alimentícios para o público supracitado pode ser uma alternativa interessante. Logo, o presente trabalho visou avaliar a utilização de extrato vegetal hidrossolúvel de quinoa no desenvolvimento de bebida fermentada vegana a partir de grãos de kefir de água.

## 2 OBJETIVO

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Elaborar e caracterizar uma bebida fermentada vegana à base de extrato vegetal hidrossolúvel de quinoa com kefir de água.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Elaborar o extrato vegetal hidrossolúvel de quinoa (EVHQ);
- ✓ Estudar a influência da concentração de sacarose, inulina e xantana no substrato de EVHQ após fermentação com kefir de água a partir de um delineamento composto central (DCC) 2<sup>3</sup>;
- ✓ Realizar a análise centesimal da quinoa em grão, EVHQ e das formulações escolhidas no delineamento, antes e após fermentação;
- ✓ Identificar a concentração de compostos orgânicos nos EVHQs fermentados;
- ✓ Identificar os microrganismos presentes nos grãos de kefir de água nas formulações fermentadas selecionadas;
- ✓ Realizar análise sensorial das formulações fermentadas;
- ✓ Determinar a atividade enzimática e microbiológica das bebidas fermentadas selecionadas à base de EVHQ antes e após o processo *in vitro* de digestão gastrointestinal.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi dividido em duas etapas. Na primeira etapa, foi avaliado o efeito da concentração de sacarose, inulina e goma xantana no extrato vegetal hidrossolúvel de quinoa para obtenção de uma bebida fermentada. Para isso utilizou-se de um planejamento composto central (DCC) 2<sup>3</sup>, contendo 3 pontos centrais. As formulações foram caracterizadas quanto: (i) ao crescimento celular dos grãos, (ii) rendimento da bebida, (iii) pH, (iv) sólidos solúveis, (v) produção de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), (vi) de ácido láctico e (vii) produção de etanol. Na segunda etapa as formulações selecionadas foram caracterizadas quanto a composição centesimal, análise de compostos orgânicos, composição microbiológica da cultura de kefir, análise sensorial e caracterização enzimática e microbiológica antes e após simulação de digestão gastrointestinal *in vitro*.

#### 3.1 MATERIAIS

Os ingredientes utilizados na elaboração do extrato vegetal hidrossolúvel de quinoa foram quinoa em grãos (Vitão, Curitiba), sacarose (União, Rio de Janeiro), inulina (Ingredientes On-line, São Paulo), goma xantana (Ingredientes On-line, São Paulo), kefir de água (doação, Laranjeiras do Sul) e açúcar mascavo (Agro Luigi, Guaraniaçu).

#### 3.2 MÉTODOS

##### 3.2.1 Elaboração do extrato vegetal hidrossolúvel de quinoa (EVHQ) fermentado

A elaboração do extrato vegetal hidrossolúvel de quinoa seguiu as metodologias propostas por Bianchi et al. (2015) e Ujiroghene et al. (2019), com adaptações. Primeiramente foi feito o remolho em água da quinoa em grãos na proporção de 1:2 por 1 hora em refrigeração ( $5 \pm 2^\circ\text{C}$ ). Após, a água de remolho foi descartada, e a quinoa novamente foi adicionada de água na mesma proporção e submetida ao cozimento por 17 min. Em seguida, foi realizada a filtração e os grãos cozidos adicionados novamente de água (1:10) foram triturados utilizando liquidificador (Philips Walita, São Paulo). Em seguida, o conteúdo sólido foi separado do

líquido e o EVHQ foi submetido a pasteurização ( $95^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/3 \text{ min}$ ), e envasado em frasco de vidro higienizado e esterilizado e armazenado em geladeira ( $5 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ). Após essa etapa, o extrato base seguiu para etapa do delineamento composto central.

Os níveis das variáveis (Tabela 1) do delineamento composto central (DCC)  $2^3$ , contendo 3 pontos centrais seguiu a metodologia descrita por Alves et al. (2021), com modificações. As variáveis independentes analisadas foram: concentração de sacarose (X1); concentração de inulina (X2) e concentração de goma xantana (X3). As variáveis dependentes (respostas analisadas) foram: (i) crescimento celular dos grãos, (ii) rendimento da bebida, (iii) pH, (iv) sólidos solúveis, (v) produção de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), (vi) de ácido láctico e (vii) produção de etanol. Foi utilizado o softwar estatístico *Protimiza Experimental Design* para a aplicabilidade do método de DCC.

Tabela 1 - Níveis utilizados no planejamento  $2^3$  para fabricação da bebida fermentada à base de extrato vegetal hidrossolúvel de quinoa.

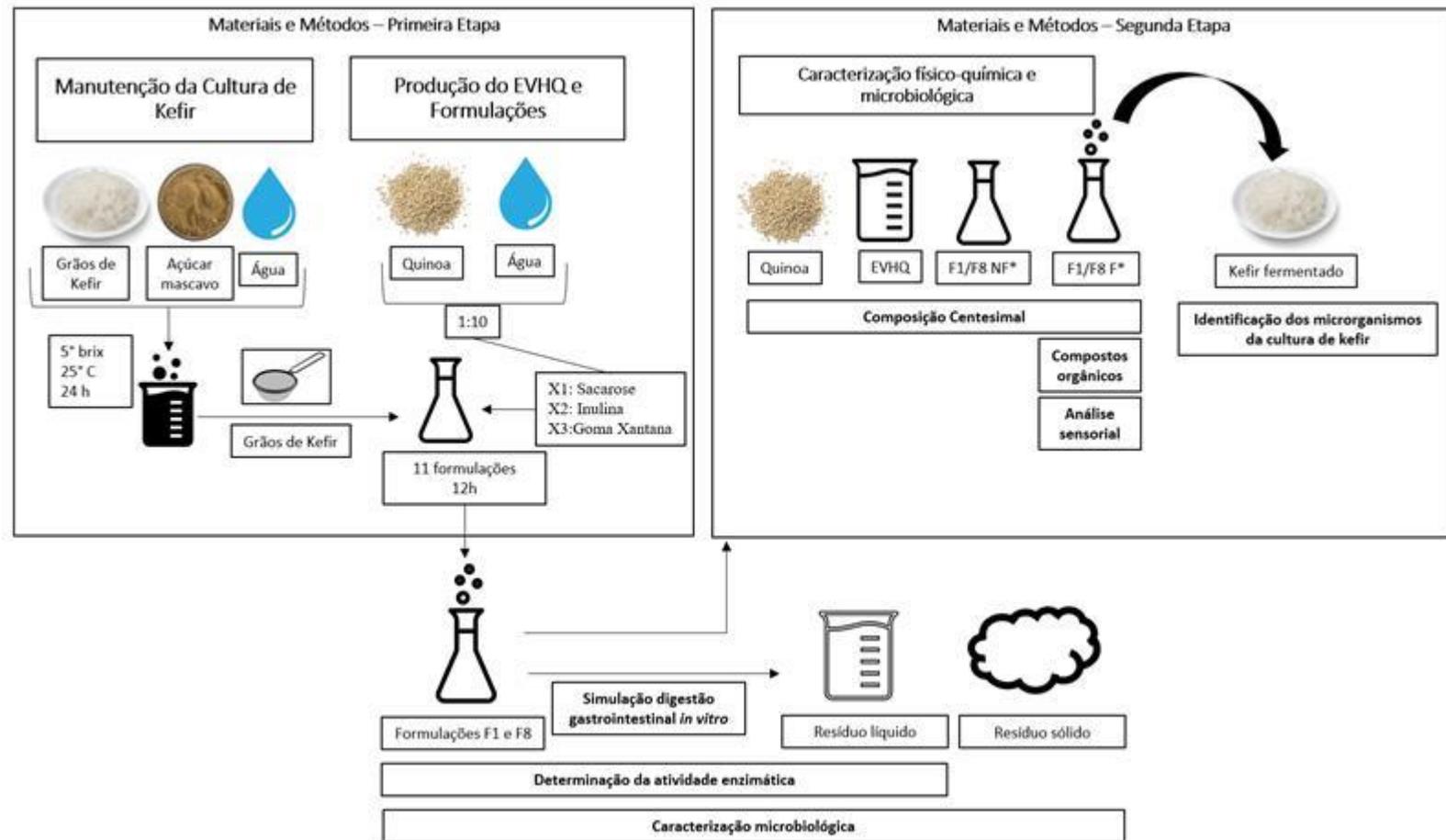
Variáveis Independentes	Códigos	Níveis		
		-1	0*	+1
Concentração de sacarose (%)	X <sub>1</sub>	2,0	6,0	10,0
Concentração de inulina (%)	X <sub>2</sub>	2,5	3,0	3,5
Concentração de goma xantana (%)	X <sub>3</sub>	0,0	0,08	0,16

\*Ponto Central do planejamento experimental

Inicialmente, durante 7 dias os grãos de kefir foram acondicionados em solução aquosa (água filtrada) de sacarose (açúcar mascavo) com concentrações de sólidos solúveis de aproximadamente 5 °Brix e temperatura de  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$  em estufa de circulação de ar, com troca da solução de sacarose a cada 24 horas.

Após decorridos os 7 dias, 5% m/m da cultura de kefir foram inoculados no EVHQ, previamente adicionado das concentrações especificadas de sacarose, inulina e goma xantana (Tabela 1) e incubado a  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$  por um período de 12 horas, sendo então analisados.

Figura 1 – Modelo esquemático da elaboração e caracterização de kefir de água a base de quinoa



### 3.2.2 Análises físico-químicas dos EVHQ fermentados

#### 3.2.2.1 Crescimento celular dos grãos de kefir

O crescimento celular dos grãos de kefir ( $\Delta m$ ) fermentado nos substratos de EVHQ, foi determinado pela metodologia de Nogueira et al. (2016). A determinação foi por meio da Equação 1, em que as massas de grãos de kefir (g) foram pesadas no início ( $m_{k0}$ ) e após a fermentação ( $m_{kf}$ ).

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

#### 3.2.2.2 Rendimento

O rendimento da bebida (R) foi determinado pela metodologia de Nogueira et al. (2016), através da Equação 2, em que  $m_{s0}$  corresponde a massa inicial e  $m_{sf}$  a massa final da bebida fermentada.

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

#### 3.2.2.3 Determinação do pH

A determinação do pH foi feita através de potenciômetro digital (AOAC, 2012).

#### 3.2.2.4 Determinação dos sólidos solúveis

Os teores de sólidos solúveis (SS) foram verificados em refratômetro digital, com duas a três gotas do filtrado do EVHQ e os resultados foram expressos em °Brix. (AOAC, 2012) .

#### 3.2.2.5 Produção de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>)

O dióxido de carbono (g/100 mL) foi determinado através da metodologia de Maldonado et al. (2020), utilizando os dados obtidos da pesagem das massas iniciais e finais da bebida fermentada de kefir nos substratos de EVHQ. Os resultados foram expressos em % de CO<sub>2</sub>, conforme a Equação 3.

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

### 3.2.2.6 Determinação de ácido láctico

Para determinar a produção de ácido láctico, na bebida fermentada de EVHQ foi utilizado o método de acidez titulável pelo método titulométrico da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2012).

### 3.2.2.7 Determinação de etanol

A produção de etanol originada da fermentação alcoólica foi calculada em quantidades estequiométricas (SOARES et al., 2011).

## 3.2.3 Caracterização das formulações selecionadas

### 3.2.3.1 Caracterização centesimal

As formulações selecionadas (F1 e F8) (não fermentada e fermentada) no planejamento experimental, assim como, os grãos de quinoa e a bebida base (quinoa e água) foram avaliados em triplicata em análise centesimal. A caracterização seguiu metodologias oficiais da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2012), sendo as mesmas caracterizadas quanto: umidade, cinzas, lipídios e proteínas. A determinação de carboidratos totais foi calculada pelo método de diferença.

### 3.2.3.2 Determinação de compostos orgânicos

A quantificação dos compostos orgânicos (ácido acético, celobiose, etanol, frutose, glicerol e glicose), produzidos durante a fermentação do EVHQ, foram obtidos por Cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE (HPLC; LCMS-2020, Shimadzu). Os ensaios foram conduzidos em um equipamento CLAE equipado com detector de índice de refração de RID10-A e uma coluna AMINEX® BIORAD HPX87H. A bebida fermentada previamente filtrada foi diluída em água destilada (1:5 v/v), com posterior injeção do volume de 20,0 µL da

amostra 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  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  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, conforme a metodologia de Bazoti et al. (2017).

### 3.2.3.3 Identificação dos microrganismos da cultura de kefir

Cem gramas dos grãos de kefir adaptados por 12 horas nas formulações F1F e F8F do EVHQ foram transferidos para frascos plásticos estéreis e transportados sob refrigeração. A identificação de bactérias foi realizada a partir da extração do material genético e utilizando o sequenciamento de alto desempenho das regiões V3/V4 do gene 16S rRNA. O preparo das bibliotecas seguiu um protocolo proprietário (Neoprosecta Microbiome Technologies, Brasil). As regiões V3-V4 foram amplificadas com os primers do gene rRNA 16S, 341F com sequência (CCTACGGGRSGCAGCAG), e 806R com sequência (GGACTACHVGGGTWTCTAAT) (CAPORASO et al., 2012; WANG; QIAN, 2009).

Já a identificação de fungos seguiu o sequenciamento de alto desempenho da região ITS1. O preparo das bibliotecas seguiu um protocolo proprietário (Neoprosecta Microbiome Technologies, Brasil). Foi realizada a amplificação com primers para a região ITS1, primer, ITS1 (GAACCGCGGARGGATCA) (SCHMIDT et al., 2013) e primer, ITS2 (GCTGCGTTCTTCATCGATGC) (WHITE et al., 1990).

Em ambos os casos, as bibliotecas foram sequenciadas em um sistema MiSeq Sequencing System (Illumina Inc., USA). 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.

### 3.2.3.4 Análise microbiológica para a determinação da segurança

As amostras fermentadas (F1F e F8F) foram preparadas para a contagem utilizando 25mL de água peptonada 0,1% homogeneizada em *Stomacher* por 2min a 231 rpm e realizada diluição seriada até  $10^{-3}$  utilizando o mesmo meio de diluição. Devido a isso, foi realizada a

contagem de *Escherichia coli* NMP APHA 9:2015 e APHA/AWWA/WEF9221:2012 pela técnica do número mais provável, utilizando caldo Lauril Sulfato triptose, a 35°C/24-48h, no teste presuntivo e caldo EC no teste confirmatório, a 44,5°C/24-48h (KORNACKI; GURTLER; STAWICK, 2015).

A contagem de *Bacillus cereus* APHA 31:61:2015 foi realizada pela técnica de espalhamento em superfície utilizando ágar manitol gema de ovo polimixina, incubada a 30°C/24h (BENNETT; LANCETTE, 2016). Para a contagem de estafilococos coagulase positiva APHA 39.63:2015 foi utilizado o ágar Baird-Parker, por plaqueamento em superfície, incubando as placas a 35-37°C/24h.

A determinação da presença/ausência de *Salmonella* foi realizada pelo método BAM/FDA:2016, utilizando água peptonada tamponada 0,1% a 37°C±1/18h, na etapa de pré-enriquecimento, caldo tetrionato a 37°C±1/24h e caldo *Rapaport-Vassilis* a 41,5°C±0,2/24h, para a etapa de enriquecimento, e os ágar XLD e *Hectoen* a 37°C±2/24h, na etapa de confirmação (ANDREWS; JACOBSON; HAMMACK, 2016). Todas as análises foram realizadas em duplicata e os resultados comparados com a Instrução Normativa nº161 do MAPA (BRASIL, 2022), a fim de determinar a segurança microbiológica das bebidas analisadas.

### 3.2.3.5 Análise sensorial

A análise sensorial foi previamente aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFFS CAAE: 54229621.8.0000.5564, Número do Parecer de aprovação no CEP/UFFS: 5.238.640, aprovado em 11 de fevereiro de 2022. A análise foi conduzida em cabines individuais, no Laboratório de Análise Sensorial da Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus* Laranjeiras do Sul, utilizando luz branca, com 39 consumidores entre 19 e 49 anos, sendo estes 70% do sexo feminino e 30% do sexo masculino, que tinham o hábito de consumir alimentos fermentados como: iogurte, leite fermentado, kefir, kombucha, entre outros e que já haviam consumido kefir de água ou de leite.

Os avaliadores receberam 20mL das bebidas em copos plásticos codificados com três algarismos numéricos aleatórios, a <10°C, servidos de forma aleatória nas cabines, provando as amostras da esquerda para a direita, utilizando água e bolacha *cream craker* entre as bebidas, para limpeza das papilas gustativas. Estes avaliaram a aceitação utilizando uma escala hedônica de 9 pontos (1- desgostei muitíssimo a 9- gostei muitíssimo) (JONES; PERYAM;

THURSTONE, 1955) avaliando os atributos: cor, aparência, aroma, acidez, doçura, sensação na boca, sabor, viscosidade e impressão global. O *Just About Right* (JAR), foi utilizado para avaliar a cor, a acidez, a doçura, o sabor e a viscosidade, utilizando uma escala de 5 pontos (1- muito menos que o ideal, 2- menos que o ideal, 3- ideal, 4 - mais que o ideal, 5- muito mais que o ideal) (ARES; BARREIRO; GIMÉNEZ, 2009). Para a análise de intenção de compra foi utilizada uma escala de ação de 5 pontos (1- provavelmente compraria a 5- provavelmente não compraria) (STONE; SIDEL, 2010).

### 3.2.4 Simulação de digestão gastrointestinal *in vitro*

Cinco gramas de cada formulação fermentada foram submetidos às etapas oral, gástrica e intestinal de digestão simulada baseada nos protocolos INFOGEST (BRODKORB et al., 2019; MINEKUS et al., 2014). O extrato biliar foi adicionado na concentração de 0,12 g de extrato biliar por g de alimento correspondendo a 21,30 mM de sais biliares na mistura de digestão final. Conforme recomendado por Minekus et al. (2014), a quantidade de pancreatina foi calculada com base na atividade de tripsina ( $100 \text{ U mL}^{-1}$  na mistura final de digestão), resultando em  $1.444 \text{ U mL}^{-1}$  de atividade da lipase pancreática na mistura final de digestão. Lipase gástrica de RGE foi adicionada na fase gástrica a  $60 \text{ U mL}^{-1}$  à mistura final da digestão gástrica, conforme recomendado pelo protocolo INFOGEST 2.0 (BRODKORB et al., 2019). As soluções estoque de saliva simulada (SSF), gástrica (SGF) e intestinal (SIF) fluidos foram preparados e diluídos de acordo com o protocolo INFOGEST para que o recomendado a composição iônica de cada etapa digestiva fosse alcançada (MINEKUS et al., 2014). Todos os volumes de fluidos simulados e soluções enzimáticas/biliares utilizadas no presente trabalho foram detalhadas no estudo conduzido por Petry e Mercadante (2020). As amostras foram mantidas a  $-30 \text{ }^\circ\text{C}$  até a análise. O quimo remanescente foi imediatamente resfriado em banho de gelo para análise de contagem microbiana.

Para análise da simulação de digestão gastrointestinal *in vitro* foi realizada a análise de atividade enzimática (amilase, celulase, lacase, lipase, protease e peroxidase) e contagem microbiológica (bactérias ácido láctica, leveduras e bactérias ácido acéticas) antes e depois do processo, para verificar a influência da digestão nesses parâmetros.

### 3.2.5 Determinação da atividade enzimática

A determinação da atividade enzimática foi realizada na bebida fermentada antes e após o processo de simulação de digestão *in vitro*, a fim de identificar quais as alterações enzimáticas, bem como o comportamento da bebida após o processo digestivo.

#### 3.2.5.1 Amilase

A atividade da enzima amilase foi determinada pela metodologia de Fuwa (1954) e Pongsawasdi e Yagisawa (1987) utilizando amido solúvel como substrato. Portanto, o amido solúvel foi diluído na proporção 1:100 (m:v) em tampão acetato 0,1 M pH 5,0. Após 1 mL dessa solução foi transferida para tubos de ensaio com mais 1 mL do extrato fermentado e mantido em banho termostático por 10 minutos a 38°C. Após esse tempo, a atividade enzimática foi quantificada por meio da liberação de açúcares redutores totais pelo método DNS (ácido 3,5-dinitrosalissílico) conforme metodologia de Miller (1959) em que 0,5 mL da solução reacional mais 0,5 mL de DNS serão adicionados a tubos de ensaio e mantidos em banho termostático a 100°C por 10 minutos. Em seguida, os tubos de ensaio foram mantidos em banho de gelo até atingir temperatura ambiente e será adicionado 8 mL de tartarato de sódio. Posteriormente, a absorbância foi determinada em espectrofotômetro utilizando comprimento de onda de 540 nm. Uma unidade da atividade de amilase (U) é definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1  $\mu\text{mol}$  de glicose por minuto nas condições de reação.

#### 3.2.5.2 Celulase

Para a quantificação de celulase foi utilizada a metodologia de Ghose (1987) com algumas modificações. Portanto, como fonte de celulose foi utilizado 50 mg de papel filtro Whatman número 1, os quais foram adicionados a tubos de ensaio contendo 2 mL de tampão acetato 0,2 M pH 5,5 e 1 mL do extrato fermentado e em seguida mantidos em banho a 50°C por 1 hora. Após o tempo de reação, a atividade de celulase foi determinada por meio de liberação de açúcares redutores totais pelo método DNS (ácido 3,5-dinitrosalissílico) (MILLER, 1959). A absorbância foi determinada em espectrofotômetro utilizando comprimento de onda de 540 nm. Os resultados foram expressos como atividade de celulase do papel filtro

(FPase), sendo assim, uma unidade da atividade de FPase (U) será definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1  $\mu\text{mol}$  de glicose por minuto nas condições de reação.

### 3.2.5.3 Lacase

A atividade de lacase foi determinada pela metodologia descrita por Hou et al., (2004) utilizando 2,2'-azino-di-3-etilbenzotiazolizina-6-sulfônico (ABTS) como substrato para a reação enzimática. O meio reacional foi composto por 0,4 mL de ABTS 0,01 M, 0,2 mL de extrato fermentado e 3,4 mL de tampão acetato de sódio 0,05 M pH 4,8. Os tubos de ensaio contendo o meio reacional foram mantidos em banho termostático a 40°C por 4 minutos e posteriormente, a absorbância foi quantificada em espectrofotômetro utilizando comprimento de onda de 420 nm. Uma unidade da atividade de lacase (U) é definida como a quantidade de enzima capaz de formar 1  $\mu\text{mol}$  de ABTS<sup>+</sup> por minuto nas condições de reação.

### 3.2.5.4 Lipase

A atividade de lipase foi determinada conforme a metodologia de Treichel et al. (2016) a qual foi utilizada uma emulsão de azeite de oliva a 10% (m/v) e goma arábica a 5% (m/v) diluídos em 90% (v/v) de tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 6. Portanto, o meio reacional foi composto de 1 mL de extrato fermentado e 9 mL de emulsão, o qual foi incubado em agitador orbital a 165 RPM, 35°C por 32 minutos. A reação foi cessada adicionando 10 mL de solução acetona/etanol (1:1 v/v). Posteriormente, o meio foi submetido ao processo de titulação, adicionando-se NaOH 0,049 M até o meio atingir pH 11. A determinação de atividade lipásica foi calculada por meio da equação 4.

$$At = \left( \frac{(Va - Vb) * M * 1000}{t * Vc} \right) * 1000 \quad \text{Equação 4}$$

Sendo:

$Va$  = O volume médio de NaOH utilizado na titulação das amostras (mL);

$Vb$  = O volume médio de NaOH utilizado na titulação do branco reacional (mL);

$M$  = A molaridade do NaOH;

$t$  = Tempo de reação (min);

$V_c$  = O volume de extrato enzimático bruto na reação (mL).

Uma unidade de atividade lipásica (U) é definida como a quantidade de enzima capaz de hidrolisar 1  $\mu$ mol de substrato por minuto nas condições de reação.

#### 3.2.5.5 Protease

A atividade de protease foi determinada por meio da metodologia de Waghmare et al. (2015), com algumas modificações. O meio reacional será composto por 1 mL de caseína, 1 mL do extrato microalgal e 0,5 mL de tampão Glicina NaOH 0,1M. O meio foi incubado em banho ultratermostático a 40°C por 30 minutos. Em seguida, a reação será cessada por meio da adição de 0,5 mL de ácido tricloroacético e coletada uma alíquota de 0,5 mL do meio reacional, a qual foi misturada com 2,5 mL de tampão carbonato de sódio 0,05 M pH 8,73 e 0,5 mL de reagente de Folin 1M. A mistura foi mantida em temperatura ambiente de 20 a 30 minutos e após determinada absorvância em espectrofotometro a 660 nm.

Uma unidade de atividade enzimática é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu$ g de resíduo de tirosina por minuto nas condições de ensaio (WAGHMARE et al., 2015).

#### 3.2.5.6 Peroxidase

A atividade de peroxidase foi determinada pela metodologia de Khan e Robinson (1994) e Devaiah e Shetty (2009), em que o meio reacional será constituído de 1,5 mL de tampão fosfato de sódio 0,005 M pH 5, 2 mL de água destilada, 0,5 mL de guaiacol 1% e 1 mL de peróxido de hidrogênio 0,08% (v/v). O meio reacional foi exposto a banho termostático a 35°C por 10 minutos, após a estabilização da temperatura foi adicionado 1mL do extrato fermentado, mantendo o meio reacional em banho por mais 20 minutos. A absorvância foi determinada em espectrofotômetro a 470 nm. Uma unidade de atividade de peroxidase (U) é definida como a quantidade de enzima capaz de causar incremento da unidade de absorvância em 0,001 por minuto nas condições de reação.

### 3.2.6 Caracterização microbiológica

Para a contagem, 25mL da bebida foi homogeneizada em 225mL de água peptonada 0,1%, homogeneizada em *Stomacher* por 2min a 231 rpm e realizada diluição seriada até  $10^{-8}$  utilizando o mesmo meio de diluição. A contagem de bactérias ácido lácticas foi realizada por plaqueamento em profundidade, utilizando ágar MRS, pH 5,5, incubando as placas em estufa bacteriológica a 35°C por  $48h \pm 3h$  (NJONGMETA et al., 2015).

A contagem das leveduras foi realizada em ágar glicose cloranfenicol pela técnica de espalhamento em superfície, incubando as placas a 25°C por 72h, método APHA 21:2015 (RYU; WOLF-HALL, 2015). A contagem das bactérias ácido acéticas foi realizada utilizando ágar GYC, contendo: 10% de glicose, 1.0% extrato de levedura, 2.0%  $CaCO_3$  e 1,5% ágar (GULLO et al., 2006) e incubadas, por plaqueamento em superfície, incubando as placas a 30°C durante 72h. As contagens foram realizadas para as diluições que apresentavam entre 25 e 250 colônias, sendo realizada a visualização morfológica de 5 colônias de cada contagem a fim de confirmar os resultados encontrados.

### 3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas 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 ( $p < 0,05$ ).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL (DCC)

O delineamento composto central (DCC) analisou o impacto das variáveis independentes concentração de sacarose, inulina e goma xantana nas variáveis dependentes crescimento celular dos grãos, rendimento da bebida, pH, sólidos solúveis, produção de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), ácido láctico e etanol (Tabela 2).

Avaliando os dados, é possível observar que os maiores valores de crescimento celular dos grãos de kefir (formulação 7 e 8) foram obtidos nas concentrações máximas de inulina (3,5% (m/v)) e goma xantana (0,16 % (m/v)), independente da concentração de sacarose. Resultados semelhantes foram obtidos por Alves et al. (2021) quando foi avaliado o crescimento celular dos grãos de kefir de água após fermentação em extrato hidrossolúvel vegetal de coco. Os autores relataram em seu trabalho que o crescimento máximo dos grãos de kefir foi em concentrações de inulina entre 2,8 a 3,0% (m/v) e de até 0,15% (m/v) de goma xantana. Ao mesmo tempo, as formulações F7F (95,78 g/100g) e F8F (96,69 g/100g) apresentaram menor rendimento. Assim, quanto maior o crescimento celular dos grãos, maior a demanda de consumo de substrato, o que impacta diretamente o rendimento das bebidas (NOGUEIRA et al., 2016).

Graça et al. (2018) em seu estudo do potencial do uso de uma bebida mista de extrato vegetal de cupuaçu e leite como substrato para fermentação usando kefir obtiveram resultados semelhantes. Os autores observaram que quanto maior foi a concentração de cupuaçu menor foi redução do pH e maior foi o rendimento e o crescimento celular dos grãos. Além disso, os autores observaram que houve uma diminuição do rendimento da bebida fermentada com o aumento do crescimento dos grãos na formulação com maior concentração de cupuaçu.

Tabela 2 – Variáveis resposta do delineamento fatorial das formulações de bebida fermentada com kefir em EVHQ

F*	Crescimento			dos grãos de						
	Sacarose	Inulina	Goma	Kefir	Rendimento	pH	Sólidos	Etanol	CO <sub>2</sub>	Ácido láctico
	(%m/v)	(%m/v)	(%m/v)	(g/100g)	(g/100g)	Final	Final	(g/100g)	(g/100g)	(g/100mL)
	(X1)	(X2)	(X3)	(Y1)	(Y2)	(Y3)	♦Brix	(Y5)	(Y6)	(Y7)
<b>F1F</b>	2 (-1)	2,5 (-1)	0 (-1)	41,79	96,28	4,5	4,7	0,80	0,77	0,09
<b>F2F</b>	10 (+1)	2,5 (-1)	0 (-1)	41,71	96,89	4,4	11,8	0,62	0,60	0,22
<b>F3F</b>	2 (-1)	3,5 (+1)	0 (-1)	30,83	97,06	4,2	5,6	0,71	0,68	0,18
<b>F4F</b>	10 (+1)	3,5 (+1)	0 (-1)	33,99	96,68	4,2	12,4	0,85	0,81	0,20
<b>F5F</b>	2 (-1)	2,5 (-1)	0,16 (+1)	31,20	96,29	4,4	4,4	1,15	1,1	0,20
<b>F6F</b>	10 (+1)	2,5 (-1)	0,16 (+1)	37,61	96,60	4,5	11,7	0,91	0,87	0,11
<b>F7F</b>	2 (-1)	3,5 (+1)	0,16 (+1)	48,05	95,78	4,3	5,3	0,93	0,89	0,18
<b>F8F</b>	10 (+1)	3,5 (+1)	0,16 (+1)	47,32	96,69	4,2	12	0,51	0,49	0,11
<b>F9F</b>	6 (0)	3 (0)	0,08 (0)	36,69	96,91	4,1	8,6	0,57	0,55	0,22
<b>F10F</b>	6 (0)	3 (0)	0,08 (0)	30,79	97,83	4,2	8,5	0,44	0,42	0,22
<b>F11F</b>	6 (0)	3 (0)	0,08 (0)	21,60	97,89	4,1	8,5	0,51	0,49	0,23

Sendo: \*F: Formulação;

O pH das formulações variou de 4,1 a 4,5 em 12 horas de fermentação. Wang et al. (2021) afirmam que a queda de pH ao longo do tempo de fermentação, é em função da fermentação láctica, em que parte dos açúcares fermentescíveis são convertidos em ácido láctico e CO<sub>2</sub>. As formulações com maiores crescimentos dos grãos (F7F e F8F) apresentaram pH final de 4,3 e 4,2, enquanto as formulações com menores crescimentos (F3F, F10F e F11F) obtiveram um pH de 4,2, 4,2 e 4,1. Graça et al. (2018) constataram que a adição de polpa de cupuaçu provocou uma redução no pH, e com isso houve um aumento da disponibilidade de monossacarídeos, tais como glicose e frutose, os quais podem ser mais facilmente assimilados em relação aos dissacarídeos (sacarose), que por consequência provocam o crescimento mais rápido de algumas espécies de microrganismos presentes nos grãos do kefir, como as leveduras. Tal fato não foi observado no presente trabalho provavelmente pela presença de inulina nas formulações.

Lopusiewicz et al. (2020) estudaram a influência de diversas concentrações de inulina em uma bebida fermentada à base de torta de óleo de linhaça. Os autores comentaram que a inulina pode atuar como espessante, logo, esse comportamento pode reduzir a mobilidade e a disponibilidade dos nutrientes na fermentação e por consequência reduzir o crescimento celular e aumentar o rendimento da bebida. Bernat et al. (2014) em estudo sobre o processo de fermentação do leite de avelã com *Lactobacillus rhamnosus* GG e inulina, observaram que o microrganismo utilizado não foi capaz de degradar a inulina, que permaneceu exercendo benefícios à saúde do hospedeiro. Os autores relataram que a inulina reduz a mobilidade e disponibilidade de nutrientes para o processo de fermentação. Ao mesmo tempo, a interação da inulina com algumas culturas de microrganismos pode ter um efeito sinérgico no tempo de fermentação devido as propriedades prebióticas inerente a inulina que afeta positivamente o crescimento de lactobacilos (KOLIDA; TUHOY; GIBSON, 2002).

Os sólidos solúveis foram influenciados diretamente pela concentração de sacarose adicionada, onde formulações com 10% (m/v) de sacarose apresentaram resultados superiores aos demais. Quando avaliamos os dados, estes vão de acordo com o esperado, uma vez que a análise de determinação de sólidos solúveis corresponde ao total de açúcares dispersos em solução aquosa. A concentração de sólidos solúveis em bebidas fermentadas possui a tendência de redução, uma vez que estes componentes atuam como substrato para a metabolização por microrganismos durante o processo, ocorrendo a biossíntese de ácidos orgânicos e consecutiva redução do pH (LIMBAD et al., 2023).

A legislação determina que a porcentagem de etanol nas bebidas fermentadas de kefir estejam entre 0,5 e 1,5 % m/v (BRASIL, 2007), porém para o kefir de água ainda não existe

especificações regulamentadas por lei. No presente trabalho, a produção de etanol nas formulações variou de 0,44 a 1,15 g/100g. As concentrações de etanol encontradas na literatura para kefir de água variam bastante, em virtude das bebidas produzidas com grãos de kefir possuírem microbiotas distintas (TZAVARAS; PAPADELLI; NTAIKOU, 2022). O conteúdo de etanol produzido deve ser suficiente para dar a bebida um leve sabor de bebida alcoólica e aroma de levedura (BESHKOVA et al., 2003).

A produção de CO<sub>2</sub> está relacionada à atividade das leveduras presentes na cultura de kefir. Durante a fermentação, os açúcares fermentáveis são convertidos em álcool etílico e CO<sub>2</sub>. Portanto, o teor de açúcar das bebidas diminui após a fermentação. Pode-se dizer que há uma diminuição nos valores °Brix devido a diminuição do açúcar (OZCELIK; AKAN; KINIK, 2021). Os resultados obtidos neste trabalho variaram de 0,42 a 1,1 (g/100g). A maior produção de CO<sub>2</sub> (1,1 g/100g) foi encontrada na formulação F5F com menor crescimento dos grãos (31,20 g/100g) e com menor valor para SS (4,4 °Brix). Este comportamento está relacionado com a diminuição do teor de sólidos solúveis durante o tempo de fermentação (PAREDES; ESCUDERO-GILETE; VICARIO, 2022).

A quantidade de ácido láctico variou de 0,09 a 0,23g/100g. Segundo 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 F9F, F10F e F11F (triplicatas – ponto central), obtiveram porcentuais médio de ácido láctico de 0,22%, estando dentro do limite estabelecido pela legislação. Apesar de todas as formulações estarem dentro da legislação, Silva et al. (2018) contribuem que valores de acidez titulável em torno de 0,9 % de ácido láctico são considerados apropriados para bebidas kefir, porque os produtos apresentam ácido láctico em concentrações adequadas para contribuir na formação de um sabor fresco e ligeiramente ácido.

Os resultados obtidos nas formulações determinadas através do DCC, foram submetidos à análise de regressão e não apresentou interações significativas ( $p \leq 0,05$ ) em um intervalo de confiança de 95% ( $\alpha = 5\%$ ). Desta forma, optou-se por utilizar as formulações que compreendem os extremos, sendo elas F1F (mínimo de sacarose e inulina e zero de goma xantana) e F8F (máximo de sacarose, inulina e goma xantana) a fim de avaliar as características sensoriais, físico-químicas e microbiológicas da bebida fermentada.

## 4.2 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

A avaliação da composição centesimal (Tabela 3) foi realizada na quinoa em grãos (Q), no extrato vegetal hidrossolúvel de quinoa base (EVHQ), na formulação F1 não fermentada (F1NF) e fermentada (F1F), na formulação F8 não fermentada (F8NF) e na fermentada (F8F).

Tabela 3 – Composição centesimal da quinoa em grãos (Q), no extrato vegetal hidrossolúvel de quinoa base (EVHQ), na formulação F1 não fermentada (F1NF) e fermentada (F1F), na formulação F8 não fermentada (F8NF) e na fermentada (F8F).

	<b>Umidade</b> % (m/m)	<b>Cinzas</b> % (m/m)	<b>Proteínas</b> % (m/m)	<b>Lipídios</b> % (m/m)	<b>Carboidratos</b> % (m/m)	<b>Acidez titulável total</b> mEq. kg <sup>-1</sup>
<b>Q</b>	10,2 ± 0,2	2,24 ± 0,06	13,63 ± 1,35	4,53 ± 0,39	69,40 ± 0,93	163,47 ± 9,63
<b>EVHQ</b>	99,3 ± 0,0	< 0,1	0,19 ± 0,06	0,02 ± 0,00	0,39 ± 0,00	1,62 ± 0,00
<b>F1NF</b>	94,9 ± 0,0	< 0,1	0,20 ± 0,05	0,03 ± 0,00	4,77 ± 0,00	0,79 ± 0,00
<b>F1F</b>	94,3 ± 0,1	< 0,1	0,26 ± 0,06	0,05 ± 0,00	5,29 ± 0,01	15,11 ± 0,79
<b>F8NF</b>	85,0 ± 0,1	< 0,1	0,21 ± 0,03	0,05 ± 0,01	14,64 ± 0,01	0,79 ± 0,02
<b>F8F</b>	86,9 ± 0,0	< 0,1	0,30 ± 0,05	0,06 ± 0,01	12,64 ± 0,00	18,83 ± 1,29

\*EVHQ: extrato elaborado com os grãos de quinoa e água; F1NF: EVHQ adicionado de 2,0% (m/v) sacarose; 2,5% (m/v) inulina; F1F: Formulação 1 após a fermentação; F8NF: EVHQ adicionado de 10,0% (m/v) sacarose; 3,5% (m/v) inulina; 0,16% goma xantana, F8F: Formulação 8 após a fermentação.

A quinoa em grãos (Q) apresentou os maiores valores em todos os parâmetros avaliados quando comparada com os extratos, uma vez que as bebidas elaboradas já estão em fase líquida/diluída. Estudos apontam que o teor de proteína na semente de quinoa pode variar de 12 a 15% (ALROSAN et al., 2022), o que vai de encontro com o valor obtido no presente estudo (13,63%). Seu conteúdo proteico é considerado uma das principais vantagens em seu consumo, pois contém aminoácidos essenciais em quantidade superiores que demais cereais, como milho, trigo, arroz e cevada (ZHU, 2020). A lisina e tirosina ficam em destaque, podendo representar 17,13 e 9,34 g/100 g, respectivamente, dos aminoácidos presentes na semente de quinoa. Além disso, quando avaliamos o conteúdo mineral as sementes de quinoa apresenta uma elevada quantidade de potássio, ferro, magnésio, cálcio e cobre, o que é nutricionalmente relevante (KONISHI et al., 2004).

Avaliando o EVHQ base elaborado apenas com a quinoa e água com as formulações ainda não fermentadas (F1NF e F8NF) adicionadas de sacarose, inulina e goma xantana é possível observar diferença nos teores de umidade, proteína, lipídios, carboidratos e acidez.

Na Tabela 3 é possível observar que os teores de umidade variaram de 10,2 a 99,3%. O menor valor foi encontrado para a quinoa em grãos (10,2%), o que era esperado afinal ela se encontrava na forma *in natura*. O maior valor foi observado no extrato de quinoa base (99,3%) que foi elaborado apenas com quinoa e água. Ao adicionar esses ingredientes (sacarose, inulina e goma xantana) foi possível observar uma redução na umidade da F1NF (94,9%) e da F8NF (85,0%). A F8NF obteve maior redução devido a formulação utilizar maiores concentrações de sacarose, inulina e goma xantana, os quais são capazes de ligar quimicamente com a água e reduzir a umidade do produto. Resultado semelhante foi obtido por Mesquita et al. (2020), onde quanto maiores as concentrações de açúcar adicionado na bebida fermentada vegana, menores foram os teores de umidade. O processo fermentativo reduziu a umidade da F1 de 94,9% para 94,3% e aumentou da F8 de 85,0% para 86,9%.

A concentração de cinzas variou de 0,1 (para todos os extratos elaborados) à 2,24% (quinoa em grãos). Logo, é possível observar que a adição de água na elaboração dos extratos provocou sua diluição, que resultou em redução dos valores. Mesquita et al., (2020), ao avaliarem bebidas fermentadas a base de extratos vegetais de coco e grão de bico encontraram 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.

Os teores de proteínas variaram de 13,63% (Q) à 0,30% (F8F). Essa redução no teor de proteína se deu pelo próprio processamento, no qual provocou diluição pela adição de água. O teor proteico de ambas as formulações aumentou após a fermentação, fator este que pode ser explicado pela alta atividade proteolíticas dos microrganismos presentes no kefir, capazes de realizar a hidrólise proteica do substrato e aumentar a disponibilidade de peptídeos bioativos e aminoácidos livres como fonte de nitrogênio. Estes, por sua vez, podem ser quantificados pelo método de *Kjedahl* como proteínas e otimizam o aporte proteico de bebidas fermentadas de kefir (FARNWORTH; MAINVILLE, 2003; SKRZYPCZAK et al., 2019). Resultado semelhante foi observado por Alrosan et al. (2021) durante a fermentação do extrato de lentilha, onde a concentração de proteínas aumentou de 76,4% para 84,2%.

Em relação a teores de lipídios a F8F (0,06%) foi a formulação que apresentou o maior valor. Da mesma forma, como ocorreu nas proteínas, o processo fermentativo provocou um pequeno aumento na concentração de lipídeos da formulação F1 (de 0,03 para 0,05%) e da formulação F8 (de 0,05 para 0,06%). Além disso, é possível observar que a adição de goma xantana (F8) aumentou a concentração de lipídios. Resultado semelhante foi obtido por Alves et al. (2021), onde no tempo 0 (início da fermentação), a formulação com maior concentração

de goma xantana (0,26% (m/v)) apresentou resultado superior de teor lipídico que a amostra com concentração de 0,01 % (m/v).

Quando avaliamos a variação da F1NF (0,03%) para F1F (0,05%), o aumento dos lipídios ocorreu de forma mais significativa. O aumento dos teores lipídicos após processo fermentativos pode ser explicado pela presença de algumas espécies de leveduras e bactérias ácido lácticas, as quais possuem atividade lipolítica através das enzimas presentes no processo (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006; OLATERU et al., 2020). Além disso, conforme relata Santos et al., (2019), a adição de inulina em extrato vegetal de soja fermentado com kefir aumenta o teor lipídico quando comparado com amostra controle (sem inulina), o que pode ser justificado por sua atividade prebiótica.

A formulação F8NF contém a maior concentração de sacarose (10%) adicionada, bem como há a presença de goma xantana (0,16%), que é isenta na formulação F1NF. Com isso, o percentual de carboidratos da F8NF (14,64%) foi superior a formulação F1NF (4,77%). Este resultado era esperado, uma vez que a concentração de sacarose, inulina e goma xantana adicionada eram superiores. Estes componentes disponibilizam maiores concentrações de hidratos de carbono, consecutivamente o teor de carboidratos na bebida fermentada (GRASSO et al., 2021).

Para as amostras fermentadas, observa-se um fenômeno distinto entre as duas amostras, pois, uma vez que a concentração de carboidratos da formulação F8F (12,64%) reduziu em relação a sua amostra equivalente F8NF (14,64%), já a amostra F1F (5,29%) aumentou sua concentração de carboidratos em relação a F1NF (4,77%). A redução que ocorreu na formulação F8 era o esperada, uma vez que ocorre o consumo de açúcares disponíveis pelos microrganismos, metabolizando em ácidos e compostos orgânicos.

Na formulação F1 foi adicionada uma menor quantidade de açúcar, logo, para a obtenção de substrato suficiente para realização da fermentação é necessário que ocorra a hidrólise de componentes como a inulina. A inulina é uma fibra alimentar complexa, composta por polímeros e oligômeros lineares de frutose (GUPTA et al., 2019). Quando não há disponível em quantidade suficiente monossacarídeos e dissacarídeos, como frutose e glicose, para a metabolização do microrganismo, pode ocorrer a metabolização de inulina para a obtenção de energia e liberação de derivados de inulina (BERNAT et al., 2014). Logo, a metabolização da inulina durante a fermentação pode viabilizar o aumento da concentração de carboidratos na bebida fermentada.

Já para acidez titulável total, é possível observar que o extrato base (EVHQ) apresentou um valor superior (1,62 mEq. kg<sup>-1</sup>) as formulações não fermentadas (F1NF e F8NF) (0,79

mEq. kg<sup>-1</sup>) adicionadas de sacarose, inulina e goma xantana. Isso ocorre devido ao aumento de hidroxilas disponíveis no meio, que ficam disponíveis para reação quando dissolvidas em meio aquoso, resultando na redução da acidez e aumento do pH (VOET; VOET; PRATT, 2002). Era esperado que com o processo fermentativo houvesse um aumento da acidez em virtude da formação de ácidos orgânicos como ácido acético, decorrentes da atividade bacteriana presente no kefir. A formulação F8F (18,83 mEq. kg<sup>-1</sup>) apresentou valores mais significativos para a acidez titulável que a formulação F1F (15,11 mEq. kg<sup>-1</sup>), devido a maior disponibilidade de substrato para a metabolização dos microrganismos presentes e evolução do processo fermentativo. Estudo realizado por Alves et al. (2021) apresentou resultado semelhante, onde a maior concentração de açúcar de coco apresentou maior impacto na acidificação de bebida fermentada com extrato hidrossolúvel de coco fermentado com kefir de água, mesmo em menor concentração de inulina. O mesmo foi evidenciado por Limbad et al. (2023) e Mesquita et al. (2020), onde maiores teores de açúcar em bebidas fermentadas a base de extratos vegetais de coco e grão de bico propiciaram maiores reduções de pH e aumento na acidez do produto.

#### 4.3 COMPOSTOS ORGÂNICOS

Os compostos orgânicos presentes em uma bebida fermentada podem variar de acordo com os processos metabólicos que os microrganismos presentes no meio, os quais dependentem da composição e nutrientes. Para compostos orgânicos tivemos os resultados apresentados na Tabela 4.

Conforme disposto, a celobiose, glicose e frutose foram utilizadas na metabolização em ácido acético, etanol e glicerol. A celobiose é um dissacarídeo presente em vegetais, metabolizada através da hidrólise da celulose em celodextrinas, compostas por duas moléculas de glicose. Estas, por sua vez, no processo fermentativo são convertidas principalmente em etanol (ZHANG; DONALDSON; MA, 2012). De acordo com os dados obtidos, pode-se concluir que a metabolização de celobiose ocorreu de forma mais intensa na F1F (0,32 g/L) que na formulação F8F (7,80 g/L), obtendo após 12h de fermentação a concentração 95% inferior. Considerando que a concentração de sacarose adicionada na formulação F8 é 80% superior a concentração de F1, as rotas metabólicas devem encontrar nutrientes secundários.

Tabela 4 – Concentrações de açúcares e compostos orgânicos nas F1F e F8F

<b>Açúcares</b>	F1F*	F8F**
	<b>g/L</b>	<b>g/L</b>
Celobiose	0,32	7,80
Glicose	4,80	27,64
Frutose	8,01	30,06
<b>Compostos orgânicos</b>		
Ácido acético	0,23	0,26
Etanol	3,65	4,50
Glicerol	0,12	0,23

\*F1F: EVHQ fermentado após adição de 2,0% (m/v) sacarose; 2,5% (m/v) inulina. \*\*F8F: EVHQ fermentado após adição de 10,0% (m/v) sacarose; 3,5% (m/v) inulina; 0,16% goma xantana.

\*\*\* Os elementos Arabinose, ácido fórmico, ácido cítrico e xilitol não foram detectados.

Quando avaliamos as concentrações de sacarose adicionadas nas formulações, sabendo que a sacarose é um dissacarídeo basicamente composto por moléculas de D-glicose e D-frutose (SIMONČIČ; LUKŠIČ, 2021), em sua hidrólise, os compostos possuem a tendência de estarem em concentrações semelhantes na bebida. Porém, a concentração de glicose após fermentação foi inferior a concentração de frutose em ambas as fermentações. Logo, pode-se constatar que a metabolização de glicose ocorreu de forma mais intensa quando comparada as concentrações de frutose observadas. Estudos demonstram que o consumo de glicose por microrganismos presentes no kefir pode ser responsável por metabolizar compostos orgânicos, como etanol e ácido acético (LIMBAD et al., 2023; NORBERTO et al., 2018; TU et al., 2019).

Quanto as concentrações de frutose, quando avaliamos os componentes adicionados ao extrato vegetal houve uma maior concentração de frutose na formulação F8F (30,06 g/L) que na F1F (8,01 g/L), uma vez que as concentrações adicionadas de sacarose e inulina eram superiores. A frutose quando metabolizada é revertida principalmente para a produção de etanol, o que corrobora com os dados encontrados na literatura. Alves et al. (2021) em seu estudo utilizando como base para fermentação extrato hidrossolúvel vegetal de coco constatou que formulação contendo maior concentração de inulina e frutose obteve após 24h de fermentação maior concentração de etanol que demais. Esta rota metabólica pode ocorrer devido ao metabolismo seletivo de microrganismos, como leveduras da espécie *Saccharomyces*, que produzem etanol em meios com maior disponibilidade de frutose (FIORDA et al., 2016).

A produção de etanol apresentou valores mais representativos que os demais compostos orgânicos resultantes de rotas metabólicas dos microrganismos presentes na cultura de kefir utilizada. Os microrganismos presentes na cultura de kefir, principais responsáveis pela

metabolização de etanol, são as leveduras da espécie *Saccharomyces*, seguido de bactérias da espécie *Lactobacillus* (ATALAR, 2019; MORRISSEY et al., 2004; NORBERTO et al., 2018). Esta informação corrobora com os dados encontrados no presente estudo, onde após 12h de fermentação, o grupo *Saccharomyces sp.* e *Lactobacillus* obtiveram maior contagem nos grãos de kefir.

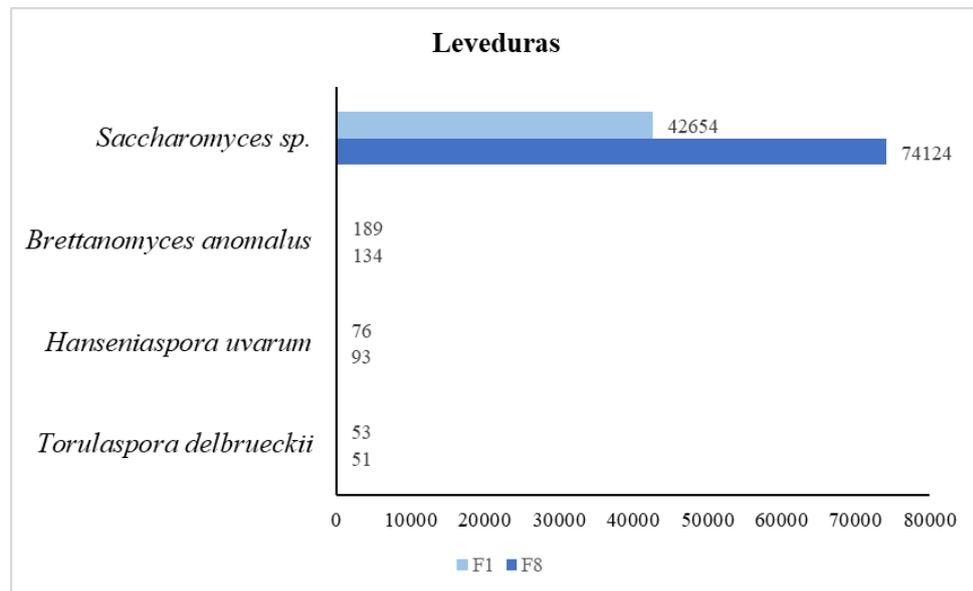
O ácido acético e glicerol podem ser metabolizados diretamente pelo consumo de açúcares disponíveis ou ainda por uma rota secundária geralmente realizada por bactérias heterofermentativas do gênero *Acetobacter*, capazes de realizar a conversão de etanol em acetaldeídos via desidrogenase (OJO; DE SMIDT, 2023). Portanto, nos trabalhos consultados onde utiliza-se kefir como cultura base para a fermentação, resultados semelhantes foram obtidos. Em seu estudo, Tzavaras et al. (2022) evidenciou concentrações entre 1,0 a 2,5% (m/v) de etanol e menos de 0,03%(m/v) de ácido acético durante a fermentação utilizando kefir em solução de sacarose e sucos de frutas. Já Maldonado et al. (2020) atingiu valores entre 1,54 a 2,00 g/L de ácido acético em bebida fermentada com kefir após 24h de fermentação. Não foram identificados valores representativos para arabinose, ácido cítrico, ácido fórmico e xilitol.

#### 4.4 IDENTIFICAÇÃO E VARIEDADE DOS MICRORGANISMOS DA CULTURA DE KEFIR

O grão de kefir consiste em um sistema simbiótico complexo de microrganismos, principalmente constituído de bactérias ácido lácticas, ácido acéticas e leveduras, incorporados a uma matriz de exopolissacarídeos insolúvel em água (MORETTI et al., 2022). Foi realizado o mapeamento dos microrganismos presentes na matriz após 12h de fermentação a partir da extração do material genético e classificação taxonômica sequenciadas com 99% de identidade de bancos de referência. Os dados estão apresentados nas Figuras 2 e 3.

Quando avaliamos a contagem de leveduras (Figura 2) presentes nos grãos de kefir após processo fermentativo, observamos que a contagem majoritária se encontra na família *Saccharomyces sp.*, de forma mais expressiva na F8F que na F1F. Este resultado pode ser explicado devido a maior quantidade de inulina e sacarose adicionadas e disponíveis para a metabolização, otimizando o crescimento celular das leveduras da espécie *Saccharomyces*. Além do mais, estes microrganismos são os principais responsáveis pela metabolização de etanol no meio, através do consumo de açúcares disponíveis (MORRISSEY et al., 2004; SANTOS et al., 2019) como glicose, frutose e celobiose, evidenciados no presente estudo.

Figura 2 – Identificação de leveduras presentes em grãos de kefir de água cultivados em substrato de extrato vegetal hidrossolúvel de quinoa

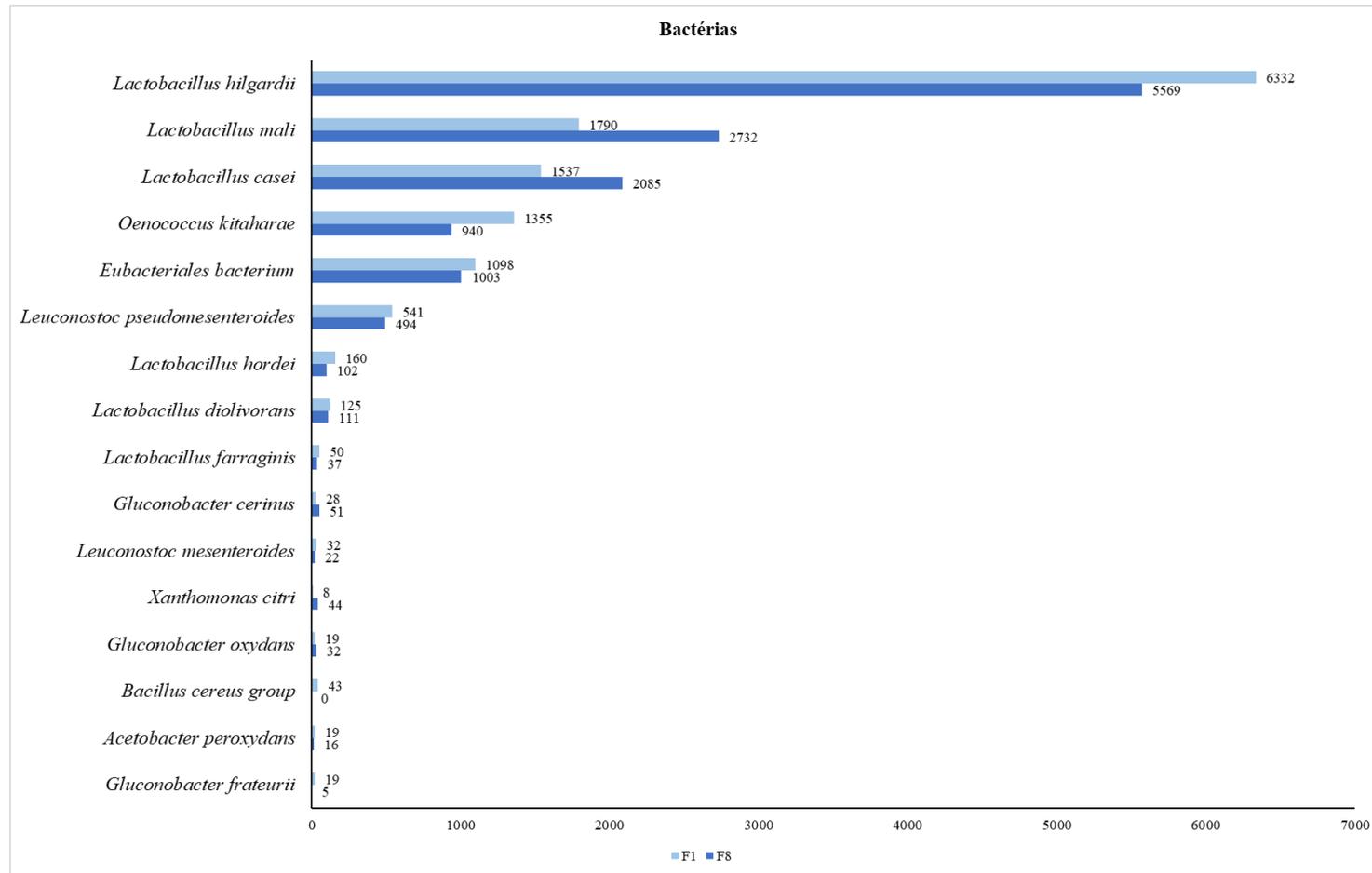


\*F1: Kefir fermentado em EVHQ após adição de 2,0% (m/v) sacarose; 2,5% (m/v) inulina. \*\*F8: Kefir fermentado em EVHQ fermentado após adição de 10,0% (m/v) sacarose; 3,5% (m/v) inulina; 0,16% goma xantana.

Quando realizamos a avaliação das bactérias presentes em ambos os meios, observamos uma prevalência de bactérias ácido lácticas (BAL), principalmente da espécie *Lactobacillus*. Ao contrário do crescimento de leveduras mais expressivo na formulação F8F, a formulação F1F apresentou maior representatividade de bactérias. As bactérias do gênero *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Oenococcus* podem ser encontrados comumente em grãos de kefir de água. Estas bactérias heterofermentativas são capazes de sintetizar ácido láctico, dióxido de carbono e etanol através de rota metabólica, ou ainda ácido acético na presença substratos específicos (ENDO; OKADA, 2006; FIORDA et al., 2016; GAO et al., 2013).

As bactérias do gênero *Xanthomonas* possuem metabolismo exclusivamente vegetal e são utilizadas na sintetização da goma xantana (PICCHI et al., 2021). Quando avaliamos os dados obtidos, pode-se observar que a formulação F8F apresentou valor 82% superior de *Xanthomonas citri*, o que pode ser justificado devido a adição de goma xantana, isenta na formulação F1F. Além disso, foram encontradas contagens superiores de bactérias do gênero *Leuconostoc* na formulação F1F quando comparada com a formulação F8F. Estes dados corroboram com o aumento do conteúdo lipídico obtido no presente estudo, pois possuem atividade lipolítica e aumentam as concentrações de ácidos graxos livres e glicerol através de sua atividade metabólica. Não foram encontrados estudos recentes referentes a *Eubacteriales bacterium* em produtos alimentícios fermentados.

Figura 3 – Identificação de bactérias presentes em grãos de kefir de água cultivados em substrato de extrato vegetal hidrossolúvel de quinoa



\*F1: Kefir fermentado em EVHQ fermentado após adição de 2,0% (m/v) sacarose; 2,5% (m/v) inulina. \*\*F8: Kefir fermentado em EVHQ fermentado após adição de 10,0% (m/v) sacarose; 3,5% (m/v) inulina; 0,16% goma xantana.

#### 4.5 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA PARA A DETERMINAÇÃO DA SEGURANÇA DAS BEBIDAS

Antes da realização da análise sensorial, as formulações F1F e F8F foram submetidas a análise microbiológica para determinar se estas estariam aptas a serem consumidas. Levando em consideração os limites estabelecidos para tofu e similares refrigerados descritos na IN 161 (BRASIL, 2022) e por se tratar de um alimento com pH igual ou menor que 4,4, as bebidas fermentadas foram consideradas aceitas dentro dos padrões estabelecidos (Tabela 5).

Tabela 5 – Parâmetros microbiológicos estabelecidos e obtidos através das análises microbiológicas das formulações de bebida fermentada de EVHQ

<b>Análise realizada</b>	<b>Valores de referência</b>	<b>Resultados</b>	<b>Unidade utilizada</b>
Contagem de <i>Escherichia coli</i>	10 - 10 <sup>2</sup> NMP/g ou mL	<3,0	NMP/mL
Contagem de <i>Bacillus cereus</i>	10 <sup>2</sup> – 10 <sup>3</sup> UFC/g ou mL	<1x10 <sup>1</sup>	UFC/mL
Contagem de Estafilococos coagulase positiva	10 <sup>2</sup> – 10 <sup>3</sup> UFC/g ou mL	<1x10 <sup>1</sup>	UFC/mL
Análise de <i>Salmonella</i>	Ausência em 25g	Ausente	Ausência e presença

#### 4.6 ANÁLISE SENSORIAL

Como pode ser observado na Figura 4-A, os atributos cor, aparência e viscosidade tiveram a maior parte das respostas concentradas entre as áreas de indecisão e aceitação. Os atributos aroma, acidez, doçura, sensação na boca, sabor e impressão global se localizaram entre as áreas de rejeição e indecisão. Para a amostra F8F (Figura 4-B) o atributo aroma apresentou notas distribuídas entre as áreas de rejeição, indecisão e aceitação, os demais atributos avaliados tiveram suas notas mais concentradas entre as áreas de indecisão e aceitação, mostrando que esta formulação foi mais bem avaliada, quando comparado a F1F. Essa diferença entre as formulações pode ser explicada pela concentração dos compostos orgânicos (ácido acético, etanol e glicerol), os quais estão em maior concentração na F8F. Adicionalmente, uma das possíveis causas para esta segmentação dos resultados é o desconhecimento da amostra, pois,

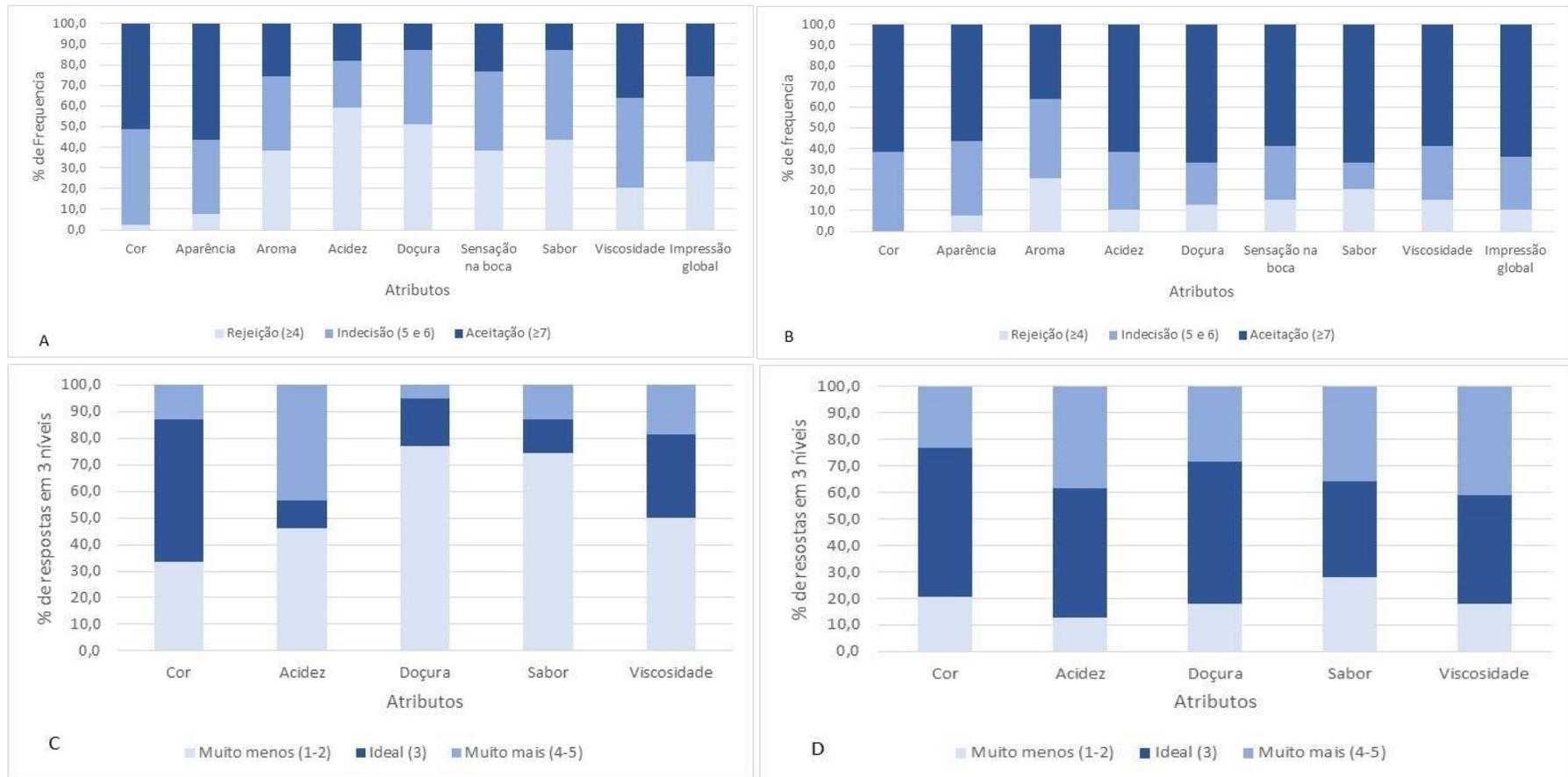
embora os avaliadores já tenham consumido extratos vegetais, eles não eram usuários frequentes deste tipo de produto, bem como, muitos deles nunca consumiram bebida fermentada a base de extratos vegetais com kefir, logo, sugere-se uma familiarização dos consumidores ao produto ou adição de um sabor conhecido.

Para o JAR, observou-se que os atributos cor, acidez e viscosidade, para a amostra F1F (Figura 4-C) apresentaram segmentação dos resultados e para os atributos doçura e sabor os avaliadores determinaram que estava abaixo do ideal, uma vez que mais de 70% dos avaliadores tiveram esta impressão. Para a amostra F8F (Figura 4-D) todos os resultados apresentaram segmentação, no entanto, a maior parte se concentraram entre ideal e acima do ideal, indicando que ambos os produtos necessitarão de ajustes para melhorar a sua aceitação. Tal fato foi comprovado na análise de compostos orgânicos (Tabela 4), os quais demonstram que a F1F apresentou menores valores de celobiose, glicose e frutose, que impactou na doçura do produto ao comparar com a F8F.

Tu et al. (2019) em sua análise sensorial de uma bebida de soro de soja fermentada com kefir de água observaram que as amostras fermentadas por mais de 2 dias tinham um sabor amargo intenso e penetrante que as tornavam inaceitáveis para os provadores, e as amostras que foram submetidas a 2 dias fermentação receberam pontuações mais altas para aceitabilidade geral. Esatbeyoglu et al. (2023) estudaram as propriedades sensoriais do kefir de água produzido a partir de suco de bagaço de Aronia melanocarpa. A bebida elaborada apresentou resultados médios na área de rejeição para os atributos turbidez, doçura, acidez, sabor e aceitação global, e médias aceitáveis para cor e atratividade óptica e média na área de indecisão para odor. Quando foram avaliados o bagaço e o suco desta fruta, estes tiveram pontuações mais altas do que o produto fermentado, afirmando que o produto fermentado era espumoso e levemente ácido, semelhante as bebidas testadas no presente trabalho.

Se avaliarmos a média dos resultados alcançados para o teste de aceitação do presente trabalho, verifica-se que os atributos aparência ( $6,6 \pm 1,6$ ) e cor ( $6,6 \pm 1,4$ ) da amostra F1F foram acima de 6,0 assim como os atributos cor ( $6,9 \pm 1,4$ ), aparência ( $6,8 \pm 1,5$ ), aroma ( $5,9 \pm 1,8$ ), acidez ( $6,9 \pm 1,7$ ), doçura ( $6,8 \pm 1,8$ ), sensação na boca, sabor ( $6,6 \pm 1,7$ ), viscosidade ( $6,8 \pm 2,1$ ) e impressão global ( $6,7 \pm 2,1$ ) para a amostra F8F. Vários estudos sobre bebida fermentada com kefir de água afirmam que as notas obtidas nas análises sensoriais variam com o tipo e quantidade de cultura de kefir de água, temperatura de fermentação e armazenamento, a matéria-prima utilizada na produção e o conteúdo de substância solúvel em água (CORONA et al., 2016; PUERARI; MAGALHÃES; SCHWAN, 2012; RANDAZZO et al., 2016).

Figura 4 - Análises de pesquisa com o consumidor de intenção de compra das amostras F1F (A) e F8F (B) e *Just about right* das amostras F1F (C) e F8F (D).

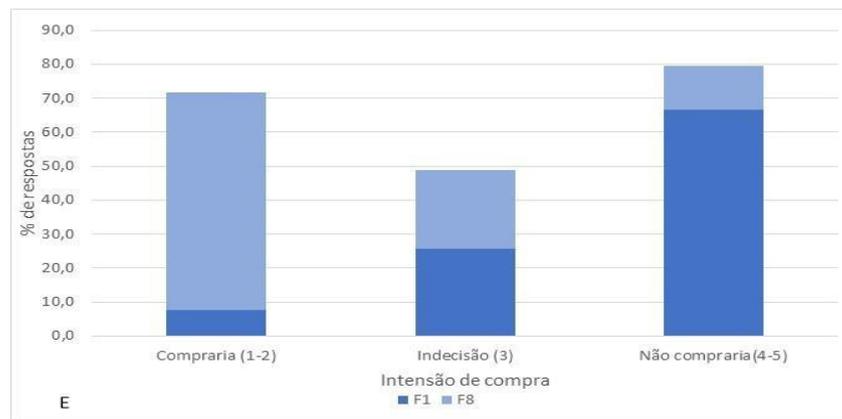


\*F1F: EVHQ fermentado após adição de 2,0% (m/v) sacarose; 2,5% (m/v) inulina. \*\*F8F: EVHQ fermentado após adição de 10,0% (m/v) sacarose; 3,5% (m/v) inulina; 0,16% goma xantana.

Por fim, para a intenção de compra (Figura 5), 64% dos consumidores disseram que provavelmente comprariam a amostra F8F, com média (2,4±1,0) e 66% dos provavelmente não comprariam a amostra F1F, com média de 3,8±0,9. Logo, considera-se que se deve investir na formulação F8F, realizando ajustes neste protótipo, a fim de alcançar a sua aceitação.

Segundo alguns autores em termos de sabor, elaborar misturas com polpas de frutas e outros extratos vegetais têm uma alternativa para tornar as bebidas mais atraentes e agradáveis ao paladar (ALBUQUERQUE et al., 2015; CHAVAN et al., 2018; NORBERTO et al., 2018). Para Panghal et al. (2018) mascarar o sabor dos extratos vegetais para torná-los aceitáveis, assim como, manter a estabilidade microbiana durante o armazenamento é um desafio na indústria de bebidas

Figura 5 - Análises de intenção de compra para ambas as amostras (F1F e F8F).



\*F1F: EVHQ fermentado após adição de 2,0% (m/v) sacarose; 2,5% (m/v) inulina. \*\*F8F: EVHQ fermentado após adição de 10,0% (m/v) sacarose; 3,5% (m/v) inulina; 0,16% goma xantana.

#### 4.7 CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA E ENZIMÁTICA APÓS SIMULAÇÃO DE DIGESTÃO GASTROINTESTINAL *IN VITRO*

A análise de digestão *in vitro* busca simular as condições gastrointestinais que os componentes presentes na bebida fermentada serão submetidos após ingestão e como estes componentes irão se comportar quanto biodisponibilidade e absorção pelo organismo humano. Na Tabela 6 estão apresentados os resultados obtidos para análise enzimática da bebida fermentada antes e após simulação de digestão gastrointestinal *in vitro*.

Alguns autores relatam que o kefir tem papel importante na digestão (HERTZLER; CLANCY, 2003), pois é caracterizado como prebiótico que auxilia na prevenção e tratamento de disbiose intestinal, como também podem apresentar propriedades antimicrobianas e auxiliar

na modulação da resposta do sistema imune (HAMIDA et al., 2021). Além disso, seu poder de síntese de exopolissacarídeo é um indicativo de que esses os micro-organismos são produtores de enzimas extracelulares. Adicionalmente, as bactérias ácido lácticas presentes nos grãos de kefir tem a capacidade de produzir enzimas que podem transformar substâncias complexas em compostos com atividade biológica (DOAN, et al., 2017; NIEVES et al., 2017). No perfil enzimático houve redução de todas as enzimas analisadas para ambas as formulações, exceto para a amilase na F1F, que foi de 14,05 U/mL para 39,41 U/mL (Tabela 6).

A maioria dos trabalhos apresentam uma redução para todas as enzimas analisadas (SEYHANEYILDIZ CAN et al., 2014), mesmo sendo possível que ocorra aumento de atividade de algumas enzimas digestivas durante o processo de digestão (SUZER et al., 2008). Uma possível explicação para o aumento de amilase ter ocorrido após a digestão simulada em F1F e não em F8F, é a diferença na concentração de carboidratos e polissacarídeos complexos ter sido maior na segunda formulação, o pode ter demandado maior ação enzimática e conseqüentemente, consumo. A amilase é capaz de modificar a disponibilidade do perfil metabólico da digestão do amido trazendo vantagens no processo de fermentação (GALLO et al., 2016; TRICARICO; JOHNSTON; DAWSON, 2008).

Tabela 6 – Perfil enzimático das formulações de bebida fermentada de EVHQ antes e após da simulação de digestão gastrointestinal *in vitro*

Enzima	F1F*		F8F**		Unidade
	Antes	Depois	Antes	Depois	
Amilase	14,05	39,41	423,85	98,73	U/ml
Celulase	19,87	8,00	101,54	16,59	U/ml
Lacase	0,04	0,00	0,04	0,00	U/ml
Lipase	0,58	0,00	0,00	0,00	U/ml
Peroxidase	53,75	3,32	59,58	3,30	U/ml
Protease	56,11	0,00	51,39	0,00	U/ml

\*F1F: EVHQ fermentado após adição de 2,0% (m/v) sacarose; 2,5% (m/v) inulina. \*\*F8F: EVHQ fermentado após adição de 10,0%(m/v) sacarose; 3,5% (m/v) inulina; 0,16% goma xantana.

A digestão gastrointestinal *in vitro* evidenciou a redução de bactérias ácido lácticas e leveduras e aumento de bactérias ácido acética na fase líquida para ambas as formulações (Tabela 7). Já para parte sólida (Tabela 8), houve o aumento bactérias ácido lácticas e leveduras e as bactérias ácido acética mantiveram-se altas.

Tabela 7 – Característica microbiológica das formulações de bebida fermentada de EVHQ antes e após da simulação de digestão gastrointestinal *in vitro*

Microrganismo	F1F*		F8F**		Unidade
	Antes	Depois	Antes	Depois	
BAL	2,2x10 <sup>8</sup>	<10	5,5x10 <sup>8</sup>	4,2x10 <sup>2</sup>	UFC/mL ou g
BAA	1,4x10 <sup>8</sup>	2,6x10 <sup>8</sup>	4,2x10 <sup>8</sup>	1,9x10 <sup>9</sup>	UFC/mL ou g
LEV	4,9x10 <sup>6</sup>	<10	6,2x10 <sup>6</sup>	<10	UFC/mL ou g

Sendo: BAL – bactérias ácido lácticas, BAA- bactérias ácido acéticas e LEV – leveduras

\*F1F: EVHQ fermentado após adição de 2,0% (m/v) sacarose; 2,5% (m/v) inulina. \*\*F8F: EVHQ fermentado após adição de 10,0%(m/v) sacarose; 3,5% (m/v) inulina; 0,16% goma xantana.

Com base nos resultados pode-se observar que a contagem das BAL e de LEV foi maior para a amostra sólida do que a líquida (Tabela 8), provavelmente devido a composição da amostra proporcionar uma proteção a estas bactérias e leveduras, no entanto, podem-se observar que a diversidade de leveduras diminuiu quando se comparou o aspecto visual das colônias da amostra antes e após a digestão (dados não mostrados).

Tabela 8 – Característica microbiológica do resíduo sólido da simulação de digestão gastrointestinal *in vitro*

Microrganismo	F1F*	F8F**	Unidade
BAL	3,8x10 <sup>1</sup>	7,4x10 <sup>3</sup>	UFC/mL ou g
BAA	>10 <sup>9</sup>	>10 <sup>9</sup>	UFC/mL ou g
LEV	8,0x10 <sup>3</sup>	6x10 <sup>7</sup>	UFC/mL ou g

Sendo: BAL – bactérias ácido lácticas, BAA- bactérias ácido acéticas e LEV - leveduras

\*F1F: EVHQ fermentado após adição de 2,0% (m/v) sacarose; 2,5% (m/v) inulina. \*\*F8F: EVHQ fermentado após adição de 10,0%(m/v) sacarose; 3,5% (m/v) inulina; 0,16% goma xantana.

Isso foi observado para BAA, onde a característica das colônias destas bactérias mudou do primeiro para o segundo experimento e, embora o número fosse elevado, a diversidade das morfologias apresentadas diminuiu do primeiro para o segundo experimento, provavelmente, devido a parte da microbiota presente não ter resistido ao processo de digestão.

As leveduras, em função da sua fonte ser o kefir, podem ter um possível comportamento de probiótico (LIMA et al., 2017). Isso pode trazer resistência às condições do trato gastrointestinal, tanto em relação aos pHs de cada etapa da digestão como também da presença enzimática (GIL-RODRÍGUEZ; CARRASCOSA; REQUENA, 2015). A grande importância de as leveduras terem sido quantificadas em contagem alta em ambas as formulações (na ordem

de  $10^3$  e  $10^7$ , respectivamente) é a possibilidade de agirem de forma competitiva contra patógenos, reduzindo e até evitando a adesão e translocação deles. Para que haja ação no hospedeiro é preciso que as espécies bacterianas dominantes (entre  $10^9$  e  $10^{11}$  UFC/g) e subdominantes ( $10^6$  e  $10^8$  UFC/g) estejam presentes em quantidades suficientes (BINETTI et al., 2013).

É possível que as BAL, BAA e LEV presentes na bebida fermentada de ambas as formulações sejam fonte de enzimas, assim como microrganismos comprovadamente probióticos, trazendo benefícios à saúde do hospedeiro. Esses benefícios são referentes a otimização da absorção de nutrientes ao longo do trato digestivo (HAWAZ, 2014; LIMA et al., 2017).

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo evidenciou que a utilização do EVHQ como base para a fermentação com kefir de água, adicionado de prebiótico, obteve vantagens relevantes para o seguimento de bebidas fermentadas. Uma vez que não houve interação significativa entre as variáveis independentes, pode-se trabalhar com diversas possibilidades de formulação visando aspectos como custo e aceitação sensorial, além de considerar o baixo período de fermentação (12h) quando comparadas a demais estudos utilizando kefir como cultura *starter*. As amostras F1F e F8F apresentaram aumento na concentração de proteínas e teor lipídico, além de mostrar-se como meio viável para manutenção de leveduras *Saccharomyces sp.*, e BAL. A digestão gastrointestinal *in vitro* evidenciou a redução de BAL e LEV e aumento de BAA na fase líquida para ambas as formulações, além redução de todas as enzimas analisadas para ambas as formulações, exceto para a amilase na F1F, que foi de 14,05 U/mL para 39,41 U/mL, possivelmente decorrente da menor quantidade de substrato disponível para reação e arraste durante processo digestivo, uma vez que se trata de uma das principais enzimas presentes no processo digestivo. Portanto, diante do exposto, conclui-se que a utilização de EVHQ como substrato para a produção de bebida fermentada com cultura de kefir de água mostra-se como uma alternativa viável para atendimento de um nicho específico de mercado, com vantagens nutricionais e tecnológicas.

## **6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

Visto as diversas vantagens nutricionais evidenciadas no presente trabalho, sugere-se que seja realizado ajustes sensoriais, a fim de aumentar a aceitação do produto desenvolvido. Além disso, realizar estudo de durabilidade da bebida fermentada, bem como condições ideais para maximizar sua vida de prateleira.

## REFERÊNCIAS

- ADEBO, J. A. et al. Fermentation of Cereals and Legumes: Impact on Nutritional Constituents and Nutrient Bioavailability. **Fermentation**, v. 8, n. 2, p. 63, 30 jan. 2022.
- ALBUQUERQUE, E. M. B. et al. Production of “peanut milk” based beverages enriched with umbu and guava pulps. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, v. 14, p. 61–67, 2015.
- ALROSAN, M. et al. Effects of Fermentation on the Quality, Structure, and Nonnutritive Contents of Lentil (*Lens culinaris*) Proteins. **Journal of Food Quality**, v. 2021, 2021.
- ALROSAN, M. et al. Mechanisms of molecular and structural interactions between lentil and quinoa proteins in aqueous solutions induced by pH recycling. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 57, n. 4, p. 2039–2050, 5 abr. 2022.
- ALVES, V. et al. Development of fermented beverage with water kefir in water-soluble coconut extract (*Cocos nucifera L.*) with inulin addition. **LWT**, v. 145, p. 111364, jun. 2021.
- ANDREWS, W. H.; JACOBSON, A.; HAMMACK, T. S. *Salmonella*. **Food and Drug Administration, Bacteriological Analytical Manual Online**, ago. 2016.
- AOAC. Official methods of analysis. **Association of Official Analytical Chemistry**, 2012.
- ARES, G.; BARREIRO, C.; GIMÉNEZ, A. Comparison of attribute liking and JAR scales to evaluate the adequacy of sensory attributes of milk desserts. **Journal of Sensory Studies**, v. 24, n. 5, p. 664–676, out. 2009.
- ATALAR, I. Functional kefir production from high pressure homogenized hazelnut milk. **LWT**, v. 107, p. 256–263, jun. 2019.
- AYDAR, E. F.; TUTUNCU, S.; OZCELIK, B. Plant-based milk substitutes: Bioactive compounds, conventional and novel processes, bioavailability studies, and health effects. **Journal of Functional Foods**, v. 70, p. 103975, jul. 2020.
- 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, mar. 2020.
- BAZOTI, S. F. et al. Second-generation ethanol from non-detoxified sugarcane hydrolysate by a rotting wood isolated yeast strain. **Bioresource Technology**, v. 244, p. 582–587, 2017.
- BENNETT, R. W.; LANCETTE, G. A. *Staphylococcus aureus*. **U S Food and Drug Administration (FDA), Bacteriological Analytical Manual**, mar. 2016.
- BERNAT, N. et al. Hazelnut milk fermentation using probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG and inulin. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 49, n. 12, p. 2553–2562, dez. 2014.
- BESHKOVA, D. M. et al. Production of volatile aroma compounds by kefir starter cultures. **Int. Dairy J.**, v. 13, n. 7, p. 529–535, 2003.
- BIANCHI, F. et al. Potentially synbiotic fermented beverage with aqueous extracts of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) and soy. **Food Science and Technology International**, v. 21, n. 6, p. 403–415, 23 set. 2015.
- BINETTI, A. et al. Yeasts from autochthonal cheese starters: technological and functional properties. **Journal of Applied Microbiology**, v. 115, n. 2, p. 434–444, ago. 2013.

- BRASIL. Resolução nº 46, de 23 de outubro de 2007. Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ) de Leites Fermentados. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial da União**, p. 4, 23 out. 2007.
- BRASIL. Instrução Normativa nº 161, de 1 de julho de 2022. Padrões Microbiológicos dos Alimentos. **Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diário Oficial da União**, 1 jul. 2022.
- BRODKORB, A. et al. INFOGEST static *in vitro* simulation of gastrointestinal food digestion. **Nature Protocols**, v. 14, n. 4, p. 991–1014, 18 abr. 2019.
- CAPORASO, J. G. et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **The ISME Journal**, v. 6, n. 8, p. 1621–1624, 8 ago. 2012.
- CARULLO, G. et al. Milk kefir enriched with inulin-grafted seed extract from white wine pomace: chemical characterisation, antioxidant profile and *in vitro* gastrointestinal digestion. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 57, n. 7, p. 4086–4095, 1 jul. 2022.
- CHAVAN, M. et al. Development of non-dairy fermented probiotic drink based on germinated and ungerminated cereals and legume. **LWT - Food Science and Technology**, v. 91, p. 339–344, 2018.
- CO, J. et al. 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, 30 jun. 2020.
- CORONA, O. et al. Characterization of kefir-like beverages produced from vegetable juices. **LWT - Food Science and Technology**, v. 66, p. 572–581, mar. 2016.
- DEVAIAH, S. P.; SHETTY, H. S. Purification of an infection-related acidic peroxidase from pearl millet seedlings. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 94, p. 119–126, 2009.
- DINIZ, L. G. T. et al. Production and characterization of mixed water-soluble plant extracts. **Brazilian Journal of Food Research**, v. 11, n. 3, p. 94–106, 2020.
- DINIZ, R. C.; COURA, F. M.; RODRIGUES, J. F. Effect of different gluten-free flours on the sensory characteristics of a vegan alfajor: Vegan gluten-free Alfajor development. **Food Science and Technology International**, v. 27, n. 2, p. 145–150, 12 mar. 2020.
- DOAN, H.V., HOSEIINIFAR, S.H., TAPINGKAE, W., KHAMTAVEE, P. The effects of dietary kefir and low molecular weight sodium alginate on serum immune parameters, resistance against *Streptococcus agalactiae* and growth performance in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Fish & shellfish Immunology**, v.62, p. 139-146, 2017
- EGEA, M. B. et al. Physicochemical Characteristics and Rheological Properties of Soymilk Fermented with Kefir. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v. 13, n. 2, 15 abr. 2022.
- ENDO, A.; OKADA, S. *Oenococcus kitaharae* sp. nov., a non-acidophilic and non-malolactic-fermenting oenococcus isolated from a composting distilled shochu residue. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. 10, p. 2345–2348, 1 out. 2006.
- ESATBEYOGLU, T. et al. Physical, chemical, and sensory properties of water kefir produced from Aronia melanocarpa juice and pomace. **Food Chemistry: X**, v. 18, p. 100683, jun. 2023.
- FACIONI, M. S. et al. Nutritional management of lactose intolerance: the importance of diet and food labelling. **Journal of Translational Medicine**, v. 18, n. 1, p. 260, 26 dez. 2020.
- FARNWORTH, E. D.; MAINVILLE, A. Kefir: A Fermented milk product. Em: FARNWORTH, E. D. (Ed.). **Handbook of fermented functional foods**. [s.l.] CRC PRESS, 2003. v. 2p. 89–128.

- FIORDA, F. A. et al. 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, 9 dez. 2016.
- FUWA, H. A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amylose as the substrate. **Journal of Biochemistry**, v. 41, n. 5, p. 583–603, 1954.
- GALLO, A. et al. Short communication: The effect of an exogenous enzyme with amylolytic activity on gas production and *in vitro* rumen starch degradability of small and large particles of corn or barley meals. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 5, p. 3602–3606, maio 2016.
- GANATSIOS, V. et al. Kefir as a Functional Beverage Gaining Momentum towards Its Health Promoting Attributes. **Beverages**, v. 7, n. 3, p. 48, 6 jul. 2021.
- GAO, J. et al. Metagenome analysis of bacterial diversity in Tibetan kefir grains. **European Food Research and Technology**, v. 236, n. 3, p. 549–556, 23 mar. 2013.
- GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure & Applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257–268, 1987.
- GIL-RODRÍGUEZ, A. M.; CARRASCOSA, A. V.; REQUENA, T. Yeasts in foods and beverages: *In vitro* characterisation of probiotic traits. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, n. 2, p. 1156–1162, dez. 2015.
- GÖKIRMAKLI, Ç.; GÜZEL-SEYDIM, Z. B. Water kefir grains vs. milk kefir grains: Physical, microbial and chemical comparison. **Journal of Applied Microbiology**, v. 132, n. 6, p. 4349–4358, 1 jun. 2022.
- GRAÇA, A. P. O. DA. et al. Cupuassu as a potential substrate for fermentation using kefir grains. **European International Journal of Science and Technology**, v. 7, n. 6, p. 9–20, ago. 2018.
- GRASSO, N. et al. Composition and physicochemical properties of commercial plant-based block-style products as alternatives to cheese. **Future Foods**, v. 4, p. 100048, dez. 2021.
- GULLO, M. et al. Characterization of acetic acid bacteria in “traditional balsamic vinegar”. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, n. 2, p. 209–212, fev. 2006.
- GUPTA, N. et al. Inulin: A novel and stretchy polysaccharide tool for biomedical and nutritional applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 132, p. 852–863, jul. 2019.
- HAMIDA R. S., SHAMI A., ALI M. A., ALMOHAWES Z. N., MOHAMMED A. E., BIN-MEFERIJ M. M. Kefir: A protective dietary supplementation against viral infection. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 133, p. 110974, Jan. 2021
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235–251, jun. 2006.
- HAWAZ, E. Isolation and identification of probiotic lactic acid bacteria from curd and *in vitro* evaluation of its growth inhibition activities against pathogenic bacteria. **African Journal of Microbiology**, v. 8, n. 13, p. 1419–1425, 2014.
- HERTZLER, S. R.; CLANCY, S. M. Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 103, n. 5, p. 582–587, maio 2003.
- HOU, H. et al. Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1415–1419, 2004.

- HOU, J.-W.; YU, R.-C.; CHOU, C.-C. Changes in some components of soymilk during fermentation with bifidobacteria. **Food Research International**, v. 33, n. 5, p. 393–397, jun. 2000.
- JESKE, S.; ZANNINI, E.; ARENDT, E. K. Evaluation of Physicochemical and Glycaemic Properties of Commercial Plant-Based Milk Substitutes. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 72, n. 1, p. 26–33, 5 mar. 2017.
- JONES, L. V.; PERYAM, D. R.; THURSTONE, L. L. Development of a scale for measuring soldiers' food preferences<sup>b</sup>. **Journal of Food Science**, v. 20, n. 5, p. 512–520, set. 1955.
- KHAN, A. A.; ROBINSON, D. S. Hydrogen donor specificity of mango isoperoxidases. **Food Chemistry**, v. 49, n. 4, p. 407–410, jan. 1994.
- KOLIDA, S.; TUHOY, K.; GIBSON, G. R. Prebiotic effects of inulin and oligofructose. **British Journal of Nutrition**, v. 87, p. S193–S197, 2002.
- KONISHI, Y. et al. Distribution of Minerals in Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) Seeds. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 68, n. 1, p. 231–234, 22 jan. 2004.
- KORNACKI, J. L.; GURTLER, J. B.; STAWICK, B. A. Enterobacteriaceae, Coliforms, and *Escherichia coli* as Quality and Safety Indicators. Em: SALFINGER, Y.; TORTORELLO, M. L. (Eds.). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 5. ed. Washington, D. C.: American Public Health Association, 2015. p. 103–120.
- LEITE, A. M. D. O. et al. Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 341–349, 2013.
- LIMA, M. DOS S. F. DE et al. *Saccharomyces cerevisiae* from Brazilian kefir-fermented milk: An *in vitro* evaluation of probiotic properties. **Microbial Pathogenesis**, v. 110, p. 670–677, set. 2017.
- LIMBAD, M. et al. Microbial and Chemical Changes during Fermentation of Coconut Water Kefir Beverage. **Applied Sciences**, v. 13, n. 12, p. 7257, 18 jun. 2023.
- LÓPEZ-MARTÍNEZ, M. I.; MORENO-FERNÁNDEZ, S.; MIGUEL, M. Development of functional ice cream with egg white hydrolysates. **International Journal of Gastronomy and Food Science**, v. 25, p. 100334, out. 2021.
- LOPUSIEWICZ, L. et al. 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.
- MALDONADO, R. R. et al. Application of soluble fibres in the osmotic dehydration of pineapples and reuse of effluent in a beverage fermented by water kefir. **LWT**, v. 132, p. 109819, out. 2020.
- MARTÍNEZ-PADILLA, E. et al. *In vitro* protein digestibility and fatty acid profile of commercial plant-based milk alternatives. **Foods**, v. 9, n. 12, 1 dez. 2020.
- MESQUITA, M. C. et al. 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**, v. 132, p. 109834, out. 2020.
- MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.
- MINEKUS, M. et al. A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food – an international consensus. **Food Funct.**, v. 5, n. 6, p. 1113–1124, 2014.

- MORETTI, A. F. et al. Water kefir, a fermented beverage containing probiotic microorganisms: From ancient and artisanal manufacture to industrialized and regulated commercialization. **Future Foods**, v. 5, 1 jun. 2022.
- MORRISSEY, W. F. et al. The role of indigenous yeasts in traditional Irish cider fermentations. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, n. 3, p. 647–655, set. 2004.
- MOSSO, A. L. et al. Effect of fermentation in nutritional, textural and sensorial parameters of vegan-spread products using a probiotic folate-producing *Lactobacillus sakei* strain. **LWT**, v. 127, p. 109339, jun. 2020.
- NAVRUZ-VARLI, S.; SANLIER, N. Nutritional and health benefits of quinoa ( *Chenopodium quinoa* Willd.). **Journal of Cereal Science**, v. 69, p. 371–376, maio 2016.
- NIEVES, D.C., RUIZ, H.A., AGUILAR, C.N., ILYINA, A., SALDIVAR, P.R., TORRES, J.A., HERNÁNDEZ, J.L.M. Process alternatives for bioethanol production from mango stem bark residues. **Bioresour Technol.**, v.2, p. 430-436, 2017.
- NJONGMETA, N. A. et al. Acid-Producing Microorganisms. Em: **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 5. ed. Washington, D. C.: American Public Health Association, 2015. p. 229–236.
- NOGUEIRA, L. K. et al. Milk and açai berry pulp improve sensorial acceptability of kefir-fermented milk beverage. **Acta Amazonica**, v. 46, n. 4, p. 417–424, dez. 2016.
- NORBERTO, A. P. et al. Impact of partial and total replacement of milk by water-soluble soybean extract on fermentation and growth parameters of kefir microorganisms. **LWT**, v. 93, p. 491–498, jul. 2018.
- OJO, A. O.; DE SMIDT, O. Lactic Acid: A Comprehensive Review of Production to Purification. **Processes**, v. 11, n. 3, p. 688, 24 fev. 2023.
- OLATERU, C. T. et al. 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.
- OZCELIK, F.; AKAN, E.; KINIK, O. Use of Cornelian cherry, hawthorn, red plum, roseship and pomegranate juices in the production of water kefir beverages. **Food Bioscience**, v. 42, p. 101219, ago. 2021.
- PABLO, A. G. P.; CIMA FRANCA, L. C. Development of a Water Kefir Beverage Made From Jackfruit Processing By-product and Its Potential Probiotic Property. **Philippine Journal of Science**, v. 151, n. 5, p. 1589–1598, 2022.
- PANDEY, S.; RITZ, C.; PEREZ-CUETO, F. J. A. An Application of the Theory of Planned Behaviour to Predict Intention to Consume Plant-Based Yogurt Alternatives. **Foods**, v. 10, n. 1, p. 148, 12 jan. 2021.
- PANGHAL, A. et al. Potential non-dairy probiotic products – A healthy approach. **Food Bioscience**, v. 21, p. 80–89, fev. 2018.
- PAREDES, J. L.; ESCUDERO-GILETE, M. L.; VICARIO, I. M. A new functional kefir fermented beverage obtained from fruit and vegetable juice: Development and characterization. **LWT**, v. 154, 15 jan. 2022.
- PENDÓN, M. D. et al. Water kefir: Factors affecting grain growth and health-promoting properties of the fermented beverage. **Journal of Applied Microbiology**, v. 133, n. 1, p. 162–180, 1 jul. 2022.

- PETRY, F. C.; MERCADANTE, A. Z. Addition of either gastric lipase or cholesterol esterase to improve both  $\beta$ -cryptoxanthin ester hydrolysis and micellarization during *in vitro* digestion of fruit pulps. **Food Research International**, v. 137, p. 109691, nov. 2020.
- PICCHI, S. C. et al. Modified Monosaccharides Content of Xanthan Gum Impairs Citrus Canker Disease by Affecting the Epiphytic Lifestyle of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Microorganisms**, v. 9, n. 6, p. 1176, 29 maio 2021.
- PONGSAWASDI, P.; YAGISAWA, M. Screening and Identification of a Cyclomaltodextrin Glucanotransferase-Producing Bacteria. **J. Ferment. Technol**, v. 65, n. 4, p. 463–467, 1987.
- PUERARI, C.; MAGALHÃES, K. T.; SCHWAN, R. F. New cocoa pulp-based kefir beverages: Microbiological, chemical composition and sensory analysis. **Food Research International**, v. 48, n. 2, p. 634–640, out. 2012.
- RANDAZZO, W. et al. Development of new non-dairy beverages from Mediterranean fruit juices fermented with water kefir microorganisms. **Food Microbiology**, v. 54, p. 40–51, abr. 2016.
- RINCON, L.; BOTELHO, R. B. A.; DE ALENCAR, E. R. Development of novel plant-based milk based on chickpea and coconut. **LWT**, v. 128, p. 109479, jun. 2020.
- RYU, D.; WOLF-HALL, C. Yeasts and Molds. Em: SALFINGER, Y.; TORTORELLO, M. L. (Eds.). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 5. ed. Washington, D. C.: American Public Health Association, 2015. p. 277–286.
- SANCHES, F. L. et al. Creamy coconut milk dessert with cocoa flavor: Proximate composition, texture profiling, and sensory evaluation. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 46, n. 1, 22 jan. 2022.
- SANTOS, D. C. DOS et al. Optimization of soymilk fermentation with kefir and the addition of inulin: Physicochemical, sensory and technological characteristics. **LWT**, v. 104, p. 30–37, 1 maio 2019.
- SCHMIDT, P.-A. et al. Illumina metabarcoding of a soil fungal community. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 65, p. 128–132, out. 2013.
- SETHI, S.; TYAGI, S. K.; ANURAG, R. K. Plant-based milk alternatives an emerging segment of functional beverages: a review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 9, p. 3408–3423, 2 set. 2016.
- SEYHANEYILDIZ CAN, S. et al. Effect of dietary kefir on the digestive and liver enzymes activities, and glucose level of Coruh trout, *Salmo coruhensis* (Actinopterygii: Salmoniformes: Salmonidae). **Acta Ichthyologica et Piscatoria**, v. 44, n. 2, p. 167–170, 30 jun. 2014.
- SHARMA, S. et al. Structure and function of proteins involved in milk allergies. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 756, n. 1–2, p. 183–187, maio 2001.
- SILVA, A. T. DA et al. Physical-chemical profile and bioactive compounds of water-soluble baru extract (*Dipteryx alata* Vogel). **Research, Society and Development**, v. 9, n. 5, p. e199953294, 5 abr. 2020.
- SILVA, C. F. G. DA et al. Development and characterization of a soymilk Kefir-based functional beverage. **Food Science and Technology**, v. 38, n. 3, p. 543–550, 22 mar. 2018.
- SIMONČIČ, M.; LUKŠIČ, M. Mechanistic differences in the effects of sucrose and sucralose on the phase stability of lysozyme solutions. **Journal of Molecular Liquids**, v. 326, p. 115245, mar. 2021.

- SKRZYPCZAK, K. et al. 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. 01–12, 31 mar. 2019.
- SOARES, I. B. et al. Ethanol Production by Enzymatic Hydrolysis of Elephant Grass. **Journal of Life Sciences**, v. 5, p. 157–161, 2011.
- STATISTA RESEARCH DEPARTMENT. **Veganism and vegetarianism in the United States - statistics & facts**. Disponível em: <<https://www.statista.com/topics/3377/vegan-market/#topicOverview>>. Acesso em: 16 set. 2023.
- STONE, H.; SIDEL, J. **Sensory evaluation practices**. 3. ed. New York: Academic Press, 2010. v. 16
- SUZER, C. et al. *Lactobacillus spp.* bacteria as probiotics in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) larvae: Effects on growth performance and digestive enzyme activities. **Aquaculture**, v. 280, n. 1–4, p. 140–145, ago. 2008.
- TREICHEL, H. et al. Lipase production from a newly isolated *Aspergillus niger* by solid state fermentation using canola cake as substrate. **Current Biotechnology**, v. 5, p. 1–7, 2016.
- TRICARICO, J. M.; JOHNSTON, J. D.; DAWSON, K. A. Dietary supplementation of ruminant diets with an *Aspergillus oryzae*  $\alpha$ -amylase. **Animal Feed Science and Technology**, v. 145, n. 1–4, p. 136–150, ago. 2008.
- TU, C. et al. Quality and metagenomic evaluation of a novel functional beverage produced from soy whey using water kefir grains. **LWT**, v. 113, p. 108258, out. 2019.
- TZAVARAS, D.; PAPADELLI, M.; NTAIKOU, I. From Milk Kefir to Water Kefir: Assessment of Fermentation Processes, Microbial Changes and Evaluation of the Produced Beverages. **Fermentation**, v. 8, n. 3, 1 mar. 2022.
- UJIROGHENE, O. J. et al. Potent  $\alpha$ -amylase inhibitory activity of sprouted quinoa-based yoghurt beverages fermented with selected anti-diabetic strains of lactic acid bacteria. **RSC Advances**, v. 9, n. 17, p. 9486–9493, 2019.
- VÄKEVÄINEN, K. et al. Potential of quinoa in the development of fermented spoonable vegan products. **LWT**, v. 120, p. 108912, fev. 2020.
- VANGA, S. K.; RAGHAVAN, V. How well do plant based alternatives fare nutritionally compared to cow's milk? **Journal of Food Science and Technology**, v. 55, n. 1, p. 10–20, 2 jan. 2018.
- VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentals of Biochemistry**. New York: Wiley, 2002.
- WAGHMARE, S. R. et al. Purification and characterization of novel organic solvent tolerant 98 kDa alkaline protease from isolated *Stenotrophomonas maltophilia* strain SK. **Protein Expression and Purification**, v. 107, p. 1–6, 2015.
- WANG, Y. et al. Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and the Expanding Applications in Food Industry. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, 12 maio 2021.
- 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, 9 out. 2009.
- WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Em: **PCR Protocols**. [s.l.] Elsevier, 1990. p. 315–322.
- ZHANG, Y. Y.; HUGHES, J.; GRAFENAUER, S. Got mylk? The emerging role of australian plant-based milk alternatives as a cow's milk substitute. **Nutrients**, v. 12, n. 5, 1 maio 2020.

ZHANG, Z.; DONALDSON, A. A.; MA, X. Advancements and future directions in enzyme technology for biomass conversion. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 4, p. 913–919, jul. 2012.

ZHU, F. Dietary fiber polysaccharides of amaranth, buckwheat and quinoa grains: A review of chemical structure, biological functions and food uses. **Carbohydrate Polymers**, v. 248, p. 116819, nov. 2020.