

**NOVA TECNOLOGIA PARA VALORIZAÇÃO DO SORO DE QUEIJO ATRAVÉS DA
PRODUÇÃO DE BEBIDAS KEFIR FUNCIONAIS**

KARINA TEIXEIRA MAGALHÃES¹, GILBERTO VINÍCIUS DE MELO PEREIRA²; DISNEY
RIBEIRO DIAS³; LUCÍLIA DOMINGUES⁴; JOSÉ ANTÔNIO TEIXEIRA⁵; ROSANE FREITAS
SCHWAN⁶

RESUMO

Preocupações na valorização do soro de queijo conduziram à recente interesse na produção de bebidas fermentadas a partir deste substrato. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o uso dos grãos de kefir como cultura *starter* na produção de bebidas funcionais tendo o soro de queijo como substrato. A fermentação foi conduzida inoculando grãos de kefir em soro de queijo e soro de queijo desproteínizado. Por meio de microscopia de fluorescência, foi observada a presença de leveduras e bactérias habitando a matriz granular polissacarídica (kefiran). A diversidade microbiana foi monitorada através de análise em eletroforese de gel de gradiente desnaturante (DGGE) seguida de técnica de clonagem do gene 16S rRNA para procarioto e 18S rRNA para eucarioto, utilizando células super competentes *Escherichia coli* (JM109). Foram identificados os clones *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kazachstania unispora*, *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum*, *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* e uma bactéria não cultivável do gênero *Lactobacillus*. Lactose e etanol foram identificados e quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Os grãos de kefir consumiram lactose em 72 h de fermentação do soro de queijo e soro de queijo desproteínizado e produziram quantias semelhantes de etanol (~12 g/l). Características sensoriais mostraram boa aceitabilidade dos produtos. O presente estudo revelou que os grãos de kefir apresentam potencial como culturas iniciadoras no desenvolvimento de bebidas kefir funcionais de soro de queijo, resultando na introdução de novos produtos no mercado.

Palavras-chaves: Soro de queijo, bebidas Kefir, PCR-DGGE, Clonagem, HPLC

INTRODUÇÃO

Soro de queijo é um subproduto da indústria leiteira e sua disposição no ambiente sem tratamentos representa uma fonte principal de poluição. A fermentação do soro de queijo através de microrganismos é uma opção para sua valorização, pois diminui o conteúdo de lactose em soro de queijo, além de produzir metabólitos contribuindo para o sabor e textura do produto final (PESCUA et al., 2008). A produção de uma bebida funcional por fermentação de soro de queijo através de grãos de kefir poderia ser uma alternativa interessante para utilização do soro. Kefir é uma cultura de bactérias e leveduras envoltas por uma matriz granular polissacarídica chamada kefiran. Os grãos são utilizados para fermentação tradicional de leite, produzindo a "bebida kefir" com baixo conteúdo de álcool (MAGALHÃES et al., 2010).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o uso dos grãos de kefir como cultura *starter* na produção de bebidas fermentadas de soro de queijo e soro de queijo desproteínizado, a partir da elucidação das características microbiológicas, químicas e sensoriais.

¹ Doutoranda em Microbiologia Agrícola, DBI/UFLA e UMINHO/Portugal, gt-magalhaes@uol.com.br

² Mestrando em Microbiologia Agrícola, DBI/UFLA, gilbertovinicius@gmail.com

³ Professor UNILAVRAS, diasdr@uol.com.br

⁴ Professor Assistente UMINHO/Portugal, luciliad@deb.uminho.pt

⁵ Professor Catedrático UMINHO/Portugal, jateixeira@deb.uminho.pt

⁶ Professor Adjunto, DBI/UFLA, rschwan@dbi.ufla.br

MATERIAL E MÉTODOS

Fermentação do soro de queijo por grãos kefir

Dois substratos com concentração de 46 g/l foram usados para fermentação: soro de queijo (SQ) e soro de queijo desproteínizado (SQD). O soro de queijo em pó foi obtido da indústria leiteira Lagtocal, Porto/Portugal. O soro de queijo foi dissolvido em água destilada estéril até a concentração de lactose desejada. O soro de queijo desproteínizado foi preparado através de autoclavagem a 115°C por 10 min, seguido de centrifugação asséptica (2220 xg para 20 min). A confirmação da desproteínização foi realizada por método de Kjeldahl. Grãos de kefir de origem brasileira (12,5g) foram inoculados em 250 mL de SQ e SQD. Erlenmeyers foram incubados estaticamente por 72h a 25°C.

Análise microbiológica

A comunidade microbiana foi avaliada por eletroforese de gel em gradiente desnaturante (DGGE). Para bactérias o gene 16S rRNA foi amplificado com *primers* 27f (5'-AGAGTJTGATCCTGGCTCAG-3') e 1492r (5'-TACGGYTACC'ITGTTACGACTT-3'). Para amplificação da região ITS de leveduras, foram usados os *primers* ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). Os produtos foram purificados e transformados por técnica de clonagem usando células super competentes *Escherichia coli* (JM109). Os clones foram amplificados pelos primers SP6 (5'-CAT ACG ATT TAG GTG ACA CTA TAG-3') e T7 (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GA-3'). Reações de sequenciamento foram realizadas por BIOPREMIER (Lisboa, Portugal). A similaridade das sequências foram analisadas em GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Amostras dos grãos foram examinadas por microscopia de fluorescência usando microscópio confocal a laser (CLMS).

Análise química

Lactose e etanol foram quantificados através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (MAGALHÃES et al., 2010).

Análise sensorial

As bebidas de kefir (SQ e SQD) foram avaliadas por 25 degustadores destreinados, do sexo masculino e feminino em idade entre 25-35 anos (Estudantes do Centro de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Campus Gualtar, Braga, Portugal). Foi pedido aos degustadores que indicassem o quanto gostaram de cada produto em uma escala hedônica de 9-pontos (9 = gostei extremamente; 1 = desgostei extremamente) de acordo com coloração, sabor, aroma e características gerais de aceitabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estrutura de grãos de kefir reveladas por microscopia de fluorescência

Microscopia de fluorescência não revelou nenhuma diferença significativa entre a estrutura de grãos de kefir antes e após o processo de fermentação das bebidas (SQ, SQD). As Figuras 1a e 1b, mostram a estrutura dos grãos de kefir. O corante *Syto 9* revelou a presença de ácidos nucleicos (verde). *Calcofluor White* revelou a presença de leveduras, através da coloração azul da celulose e quitina pertencentes à parede de células leveduriformes. Com isso se pôde diferenciar a distribuição de bactérias (verde) e leveduras (azul) no grão de kefir. *ConA* associado a *Alexa 594* revelou a porção polissacarídica (kefiran) (vermelho) dos grãos de kefir. Portanto a técnica de fluorescência mostrou a distribuição de leveduras entre a matriz do grão essencialmente composto de polissacarídeo (kefiran) e bactérias.

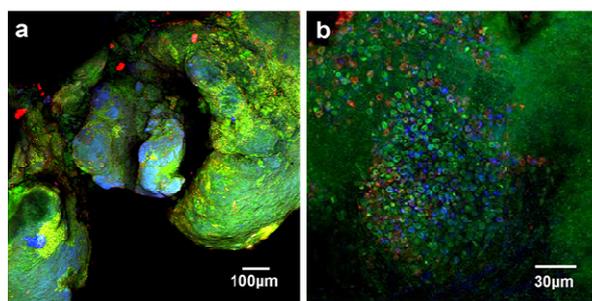


Figura 1 - Estrutura de grãos de kefir revelada por técnica de fluorescência. Verde = bactérias; Azul = leveduras; vermelho = polissacarídeo.

Comunidade microbiana

Os perfis microbianos de grãos e bebidas kefir gerados através da técnica de DGGE são mostrados nas figuras 2a e 2b. Não foi encontrada nenhuma diferença na estrutura da comunidade em todas as bebidas fermentadas e grãos de kefir, sugerindo o envolvimento dos mesmos grupos de microorganismos durante o processo fermentativo. Como as condições ecológicas permaneceram inalteradas, uma microbiota estável foi descoberta.

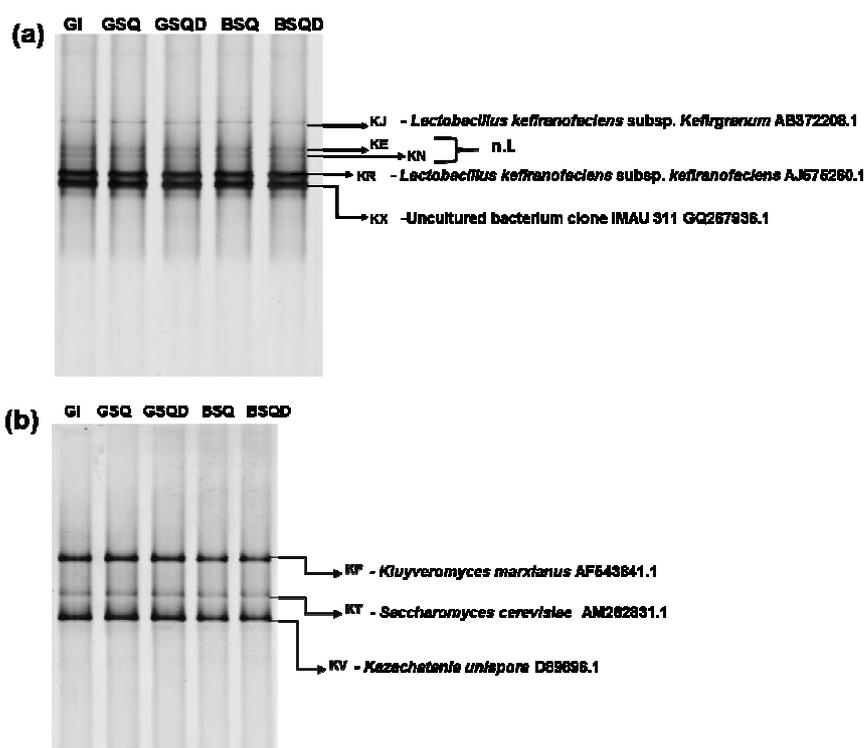


Figura 2 – Perfis microbianos de DGGE de grãos e bebidas kefir (SQ, SQD). (a) perfil bacteriano. (b) perfil de leveduras. (GI = grão kefir inoculo; GSQ = grão kefir fermentado em soro de queijo; GSQD = grão kefir fermentado em soro de queijo desproteínezado; BSQ = bebida kefir de soro de queijo; BSQD = bebida kefir de soro de queijo desproteínezado.) ni = não identificado.

Fragmentos de rDNA foram amplificados e construídas bibliotecas de clones bacterianos e leveduriformes. Clones bacterianos KJ e KR foram relacionados para *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum* (98%), *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens* (99%), respectivamente, considerando que KX se afiliou a uma bactéria não cultivável do gênero *Lactobacillus* (97%). Clones bacterianos KE e KN não foram achados. Eles não foram recuperados

para sequenciamento e podem representar outro ribotipo bacteriano, porém com baixa eficiência na amplificação de PCR. KE e KN são representados através de bandas de baixa intensidade em gel de DGGE (Figura 1a). Os clones de leveduras, KF, KT e KV foram relacionados para *Kluyveromyces marxianus* (99%), *Saccharomyces cerevisiae* (98%) e *Kazachstania unispora* (99%), respectivamente.

A espécie de levedura *Kluyveromyces marxianus*, identificada neste estudo, é caracterizada pelo uso de lactose como fonte de carbono e produz etanol e gás carbônico que proporciona sabor agradável às bebidas (MAGALHÃES et al., 2010). A levedura *Saccharomyces cerevisiae* contribui para qualidade organoléptica da bebida kefir (MAGALHÃES et al., 2010). Esta levedura reduz a concentração de ácido láctico, remove o peróxido de hidrogênio e produz combinações que estimulam o crescimento de outras bactérias, além de aumentar a produção de kefiran (CHEIRSILP et al., 2003). A levedura *Kazachstania unispora* também contribui com as características organolépticas de bebidas fermentadas, podendo ser associada à assimilação de ácido láctico (MAGALHÃES et al., 2010).

O grupo de *Lactobacillus* também foi identificado nos grãos e bebidas kefir. Espécies de *Lactobacillus* são importantes produtores de ácido láctico em bebidas fermentadas. Além de serem considerados probióticos (JIANZHONG et al., 2009) e produtores do polímero kefiran em kefir.

Análise química de bebidas kefir (SQ, SQD)

A Tabela 1 mostra os resultados de caracterização química da fermentação de bebidas kefir (SQ, SQD). Dois compostos (lactose e etanol) foram quantificados por HPLC. No presente trabalho, lactose foi consumida durante 72 h de fermentação e o conteúdo de etanol aumentou durante o processo de fermentação de kefir, alcançando concentração de 11,72 g/l e 11,86g/l em SQ e SQD respectivamente. *Saccharomyces cerevisiae* identificada neste trabalho é principalmente responsável pela produção de álcool em bebidas de kefir (MAGALHÃES et al., 2010). Porém, algumas bactérias do gênero *Lactobacillus* também possuem habilidade para produzir etanol, desde que eles possuam atividade da enzima álcool desidrogenase, uma enzima capaz de converter acetaldeído a etanol (BESHKOVA et al., 2003).

Tabela 1 – Concentração de lactose e etanol em bebidas kefir (SQ, SQD).

Tempo fermentação (h)	Soro de queijo		Soro de queijo desproteínizado	
	Lactose g/l	Etanol g/l	Lactose g/l	Etanol g/l
0	47.14±0.00	n.d.	47.14±0.00	n.d.
72	n.d.	11.72±0.77	n.d.	11.86±0.00

n.d. – não detectado; os dados são valores de duplicatas ± desvio padrão

Análise sensorial

As bebidas de kefir foram sujeitadas a análise sensorial para avaliar sua aceitação. A tabela 2 mostra a porcentagem de aceitação atribuída a cada bebida kefir (SQ, SQD) por 25 degustadores destreinados. Para todos os atributos avaliados as bebidas mostraram boa aceitação (pelo menos 5 pontos ou 50% de aceitação).

Tabela 2 – Avaliação sensorial na escala hedônica 9-pontos (9 = gostei extremamente; 1 = desgostei extremamente) das bebidas kefir (SQ, SQD).

Bebidas kefir	Propriedades sensoriais				
	Coloração	Aroma	Aparência	Gosto	Aceitabilidade geral
Soro de queijo	5.78	6.01	5.69	6.08	6.01
Soro de queijo desproteínizado	5.51	5.92	5.54	5.82	5.89

CONCLUSÃO

O potencial dos grãos de kefir como cultura *starter* na produção de bebidas funcionais de soro de queijo foi mostrado neste estudo. As bebidas kefir (SQ, SQD) produziram boas qualidades organolépticas. A fermentação do soro de queijo por grãos de kefir conduziu a um produto com sabor aumentado além de apresentar uma comunidade microbiana estável durante o processo de fermentação. Portanto os resultados deste estudo indicam que as bebidas kefir (SQ, SQD) podem ser produzidas, resultando na introdução de novos produtos no mercado.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES e CAPES/GRICES por suporte financeiro. À Lagtugal, Porto/Portugal por doação do soro de queijo. À CAARG/IPÊ, Lavras/MG/Brasil, por financiamento de leite para manutenção dos grãos de kefir.

REFERÊNCIAL BIBLIOGRÁFICO

BESHKOVA, D.M.; SIMOVA, E.D.; FRENGOVA, G.I.; SIMOV, Z.I.; DIMITROV, ZH.P. Production of volatile aroma compounds by kefir starter culture. **International Dairy Journal**, v. 13, p. 529–535. 2003.

CHEIRSILP, B.; SHIMIZU, H.; SHIOYA, S. Enhanced kefir production by mixed culture of *Lactobacillus kefirianofaciens* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biotechnology**, v. 100, p. 43-53. 2003.

JIANZHONG, Z.; XIAOLI, L.; HANHU, J.; MINGSHENG, D. Analysis of the microflora in Tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis. **Food Microbiology**, 1-6. 2009.

MAGALHÃES, K.T.; PEREIRA, G.V.M.; DIAS, D.R.; SCHWAN, R.F. Microbial communities and chemical changes during fermentation of sugary Brazilian kefir. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 1241–1250. 2010.

PESCUMA, M.; HEBERTA, E.M.; MOZZIA, F.; VALDEZ, G.F. Whey fermentation by thermophilic lactic acid bacteria: Evolution of carbohydrates and protein content. **Food Microbiology**, v. 25, p. 442–451. 2008.