

Otimização do processo de fermentação do kefir no extrato aquoso de *C. esculenta* em temperaturas controladas

Optimization of the kefir fermentation process in the extract of *C. esculenta* at controlled temperatures

Tainá Pinheiro de Oliveira¹, Claryssa Santos dos Passos², Rayane de Souza³, Nathane Brito Ferreira Santos⁴, Deborah Murowaniecki Otero⁵, Laise Cedraz Pinto^{6*}

¹pinheirotaina12@gmail.com, ²clarys_p@hotmail.com, ³rayanesouza@usp.br, ⁴nathane.brito@gmail.com,

⁵deborah.m.otero@gmail.com, ⁶lcedraz@hotmail.com*

^{1,2,4,5,6} Escola de Nutrição, Universidade Federal da Bahia, Campus Canela, Salvador, Bahia, 40110907, Brasil.

³Departamento de Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade São Paulo, Campus Butantã, São Paulo, 05508-000, Brasil. ⁵Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Campus Ondina, Salvador, Bahia, 40170-115, Brasil. ^{5,6}

Programa de Pós-Graduação em Alimentação, Nutrição e Saúde, Escola de Nutrição, Universidade Federal da Bahia, Campus Canela, Rua Basílio da Gama, s/n, Salvador, Bahia, 40110907, Brasil.

Resumo

Os objetivos deste estudo foram avaliar a variabilidade das temperaturas nos extratos da *C. esculenta* fermentado por kefir a temperatura ambiente para obtenção da bebida fermentada (CeKB) artesanal, e analisar a cinética de fermentação do kefir para obtenção da CeKB em temperaturas controladas. Os procedimentos para preparo do extrato, adaptação do kefir e inoculação dos grãos seguiram a metodologia padronizada para obtenção da bebida. As temperaturas dos extratos fermentados à temperatura ambiente foram mensuradas em três diferentes períodos do ano. Para avaliação da cinética de fermentação, os grãos de kefir adaptados foram inoculados ao extrato de *C. esculenta* (10%, m:v) e submetidos à fermentação em sistema de banho-maria a 25°, 30° e 35°C. Temperatura e pH foram mensurados periodicamente durante 4 horas de fermentação. O teor etanólico (g/L) da CeKB foi determinado em 4 h por CG-FID. As temperaturas dos extratos na CeKB artesanal apresentaram variações significativas entre 22,5°C a 28,4°C. Durante a fermentação em temperaturas controladas, antes de 0,5 h e em 2,5h, os extratos atingiram pH padronizado de 5,0 respectivamente para 35°C e 30°C, e a 25°C não atingiu este pH durante todo o processo. A incubação a 30°C propiciou melhor linearidade na velocidade de fermentação do kefir de inhame e menor variação de temperatura entre extrato e incubação. O estudo evidenciou uma variabilidade de 10% de perda de calor do extrato de *C. esculenta* durante a fermentação que deve ser considerada na elaboração das CeKB em diferentes temperaturas, bem como pode ser aplicável a outros substratos de kefir.

Palavras-chave: Taro, kefir de água, cinética de fermentação, etanol, cultura simbiótica

Abstract

This study aimed to evaluate the variability of temperatures in the kefir-fermented *C. esculenta* extracts (CeKB) at room temperature for obtaining the artisanal fermented beverage, and the kefir fermentation kinetics at controlled temperatures for CeKB production. Procedures for extract preparation, kefir grain adaptation, and inoculation followed the standardized methodology of CeKB. Room temperatures of

fermented extracts were measured at three different annual periods. To evaluate the fermentation kinetics, the adapted kefir grains were inoculated with *C. esculenta* extract (10%, w:v) and subjected to fermentation in a water bath system at 25°, 30°, and 35°C. Temperature and pH were measured periodically for 4 hours. The ethanol content (g/L) in CeKB was performed by GC-FID. The temperatures of the extracts in the artisanal CeKB showed significant variations (22.5°C to 28.4°C). During fermentation at controlled temperatures, before 0.5 h and at 2.5 h, the extracts reached a standardized pH of 5.0 respectively for 35°C and 30°C, and at 25°C they did not reach this pH. Incubation at 30°C provided better linearity in kefir fermentation speed and lower temperature variation between extract and incubation. The study showed a variability of 10% in temperature loss of the *C. esculenta* extract during fermentation, which must be considered in the elaboration of CeKB at different temperatures, as well as applying to other kefir substrates.

Keywords: Taro, water kefir, fermentation kinetics, ethanol, symbiotic culture

Introdução

Kefir é o nome tradicional dado às bebidas obtidas através do processo de fermentação por grãos de kefir em substrato lácteo de origem animal ou em substrato vegetal, e sua composição microbiológica pode variar de acordo com a origem territorial [1,2]. O kefir de água, ou kefir açucarado, é assim denominado quando a bebida é produzida pela inoculação dos grãos em uma solução de água e sacarose [3], o qual, durante a fermentação, produz ácido lático, CO₂, etanol, ácido acético e vários outros produtos, incluindo compostos aromáticos voláteis, formados pela associação simbiótica dos microrganismos presentes [2].

Em geral, no kefir de água estão presentes bactérias ácido-acéticas, ácido-láticas, bifidobactérias [4] e, de forma dominante, as leveduras *Saccharomyces* sp., devido ao alto teor de sacarose que favorece a sua multiplicação [5]. A presença desses microrganismos, especialmente com ação probiótica, confere à bebida propriedades funcionais e nutricionais que vão desde a proteção do trato gastrointestinal, modulação da resposta imune [6], além de efeitos anticarcinogênicos, antiinflamatórios [7], prevenção de doenças crônicas não transmissíveis como diabetes e hipertensão [8] e efeito positivo nos parâmetros sanguíneos de colesterol total e LDL-Colesterol de indivíduos dislipidêmicos [9,10].

Dentre as opções de substratos de origem vegetal utilizados para a produção de kefir estão as frutas, vegetais [11] e tubérculos, como a *Colocasia esculenta* [12]. A *C. esculenta*, uma variedade de inhame conhecida como taro ou inhaminho, além de ser um alimento de fácil cultivo, apresenta um elevado rendimento e um alto valor como matéria-prima alimentícia devido as suas características de fácil digestibilidade, alto valor energético, alto conteúdo de vitaminas do complexo B, cálcio, fósforo, ferro [13], alto teor de fibras [14] antocianinas e fitoesteróis [15]. O extrato desse tubérculo é utilizado como substituto do leite de vaca em variadas preparações [11] e as suas características nutricionais podem contribuir para agregar ainda mais qualidade nutricional e funcional à bebida produzida com kefir [16].

Embora a grande maioria da produção de kefir seja de forma artesanal e em pequena escala em alguns países, a tendência é que a produção dessa bebida ganhe cada vez mais espaço no cenário industrial, isso porque a nível global, é possível observar um crescimento na procura por alimentos saudáveis com propriedades funcionais [17] e um crescente investimento da indústria alimentícia em pesquisas e tecnologias visando ampliar os efeitos benéficos desses alimentos à saúde do consumidor [18].

No Brasil, a indústria de alimentos saudáveis vem assumindo crescimento médio de 12,3% ao ano, com destaque para os setores de alimentos que utilizam matéria-prima de origem vegetal [19]. Esta tendência, estimulado pelo aumento das doenças crônicas não transmissíveis, pode estar associada ao aumento do interesse da população em práticas alimentares saudáveis [20], reflexões éticas que envolvem o bem-estar

animal e a procura por outros estilos de vida que se isentam do consumo de alimentos de origem animal como o vegetarianismo e o veganismo ou ainda por limitações fisiológicas, intolerância ou alergias alimentares [11].

Neste contexto de alimentos veganos, Pinto et al. [12] descreveram que a bebida vegetal de *C. esculenta* fermentada por kefir (CeKB) apresentou potencial para produção em escala industrial, especialmente em temperaturas controladas, já que, de forma artesanal, é realizada em temperatura ambiente e pode apresentar variabilidade e influência no produto final, especialmente nos parâmetros-físico-químicos durante a fermentação. O conhecimento acerca da modulação do processo de fermentação, como a análise cinética e seus parâmetros (como pH, temperatura e concentração de nutrientes) contribui para os processos biotecnológicos [11] e permite traçar condutas de intervenção para otimizar os produtos desejáveis pelas indústrias, possibilitando cada vez mais a criação de alimentos singulares e variados.

Considerando o aumento crescente da indústria de alimentos saudáveis, o grande potencial do extrato de inhame (*C. esculenta*) para o desenvolvimento de bebidas fermentadas e a importância de compreender os parâmetros de modulação do processo de fermentação deste substrato pelos grãos de kefir de água, o presente trabalho teve como objetivos analisar a variação da temperatura ambiente para obtenção da CeKB de forma artesanal e analisar a cinética de fermentação do kefir no extrato aquoso de *C. esculenta* para obtenção da CeKB em temperaturas controladas.

Metodologia

Preparo da bebida de *C. esculenta* fermentada por kefir (CeKB) artesanal

Inicialmente foi elaborado um extrato aquoso de *C. esculenta*. O tubérculo foi higienizado e colocado em remolho por 24 horas, para redução no teor de oxalato, conforme sugere o método de processamento padronizado por Pinto et al.[12]. Após o processo, foi triturado em água e filtrado, constituindo o extrato aquoso de *C. esculenta*.

Para a produção da bebida fermentada, os grãos de kefir passaram previamente pela etapa de adaptação que consiste na inoculação dos grãos (10%, m:v) no extrato aquoso adicionado de 5% de sacarose (m:v), durante três dias consecutivos, com troca do substrato a cada dia, conforme descrito por Pinto et al.[12]. Após a etapa de adaptação, os grãos (10%, m:v) foram inoculados ao extrato de *C. esculenta* adicionado de 5% de sacarose (m:v), acondicionados em recipiente fechado e ambiente escuro, durante 4 h de fermentação, para

obtenção da CeKB [12]. Toda a descrição do processo está sob registro de depósito de patente (BR10202001428).

Avaliação da variabilidade de temperatura de fermentação da CeKB artesanal

A elaboração e mensuração das temperaturas da CeKB artesanal foram realizadas em três diferentes períodos do ano, sendo eles junho, outubro e março, compreendendo 3 diferentes estações do ano e categorizados em Período 1 a 3, respectivamente.

Durante as 4 h de fermentação à temperatura ambiente, as temperaturas dos substratos com os grãos inoculados foram mensuradas em sete replicatas, de forma aleatória, durante o processo.

Avaliação da cinética de fermentação do kefir para obtenção da CeKB em temperaturas controladas

Mensuração de pH e temperatura

Após a etapa de adaptação, descrita anteriormente, os grãos de kefir foram inoculados ao extrato de *C. esculenta* em 10% (m:v), e submetidos à fermentação em um sistema isolante térmico com banho-maria nas temperaturas de 25°, 30° e 35°C, controladas por termostato M14 20-120°C (Resispar). A temperatura e o pH dos extratos fermentados foram mensuradas de forma periódica, em duplicata, a cada 30 minutos durante 4 horas (tempo padronizado para obtenção da CeKB segundo Pinto et al., [12]. Para esta análise, os extratos foram inoculados em recipientes fechados e as leituras realizadas individualmente, para cada replicata. As temperaturas apresentadas no termostato também foram registradas de forma periódica para avaliação da variabilidade entre a temperatura do sistema banho-maria e a apresentada nos substratos em fermentação.

A temperatura no extrato fermentado foi mensurada termômetro Culinário Digital KP-8007 (Luatak) e a determinação do pH foi feita utilizando um pHmetro de (Akso – Ak90) (0,0 a 14 pH), devidamente calibrado de acordo com instruções do fabricante. Foram identificados o tempo necessário de fermentação em cada temperatura para que a bebida atingisse pH de 5,0, conforme a bebida padronizada à temperatura ambiente durante 4 horas de fermentação [12].

Quantificação de etanol

A determinação do teor de etanol (g/L) foi realizada nos extratos fermentados no tempo de 4 h, submetidos às temperaturas controladas (25°, 30° e 35°C), segundo método adaptado de Martinez-Torres et

al. [21]. As amostras foram homogeneizadas, centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos e retirado o sobrenadante. Os vials de Headspace foram preparados com a adição da amostra e padrão interno de 1-Propanol e foram submetidos a 70 °C por 30 minutos. A fração volátil foi injetada no sistema Cromatografia Gasosa com detector de Ionização por Chama (FID) com coluna inox (2 m x 2 mm) empacotada com Carbowax 1500. As temperaturas da coluna, injetor e detector foram de 120 °C, 150 °C e 150 °C respectivamente. O N₂ foi o gás carreador e o H₂ foi o gás da chama com fluxo de 15 mL/min. As amostras foram analisadas em quatro replicatas e o sinal analítico convertido através de uma curva de calibração, em triplicata, de 1 a 10 g/L ($R^2 = 0,9962$).

Análise Estatística

Para avaliar diferenças e o nível de significância entre as temperaturas ambientes registradas nos três períodos do ano, foi aplicado o teste de *Kruskal –Wallis* (pós-hoc) e *Dunn's Multiple comparison test* como pós-teste. A análise de regressão linear foi aplicada para identificação da equação da reta e R^2 e posterior avaliação da curva de fermentação do Kefir em temperaturas controladas (25, 30 e 35°C). Para avaliação do nível de significância da variação percentual do teor de etanol e da temperatura interna do extrato e a registrada no termostato durante a fermentação (25, 30 e 35°C) foi aplicado One-Way (ANOVA) e Teste *Tukey* como pós-teste. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad V5. (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Os resultados foram considerados significativos no intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$).

Resultados e Discussão

A Figura 1 apresenta a variação das temperaturas no extrato de *C. esculenta* durante a fermentação do kefir à temperatura ambiente para obtenção da CeKB artesanal. As temperaturas no extrato apresentaram variações, com média de 22,5°C ± 1,2 para o período 1; 28,3°C ± 1,4 para o período 2 e 28,4°C ± 1,1 para o período 3. Houve diferença estatística entre o período 1 comparado com o 2 e o 3 ($p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente). As menores temperaturas registradas no extrato durante a fermentação no período 1, observada pelos dois pontos mais distantes da média (Figura 4) foi de 22,6°C, seguida de 23,3°C, enquanto para os períodos 2 e 3 a menor temperatura foi de 25,7°C e 26,5°C, respectivamente.

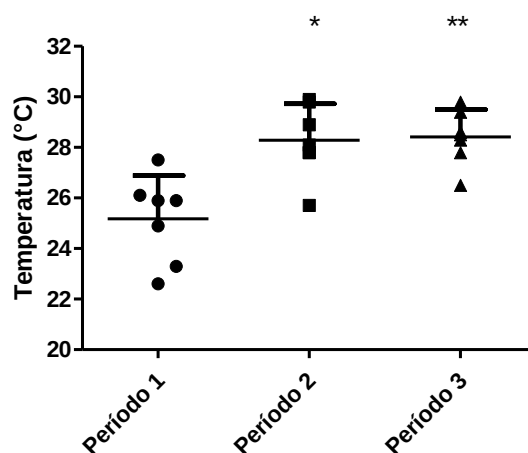


Figura 1. Variação das temperaturas do extrato de *C. esculenta* durante a fermentação do kefir em temperatura ambiente para obtenção da CeKB artesanal. Período 1, 2 e 3, respectivamente inverno (Junho), primavera (Outubro) e outono (Março) no hemisfério Sul. (*) $p < 0,05$ e (**) $p < 0,001$ em comparação com o Período 1 (Kruskal- Wallis e Test de Dunn).

A temperatura e o tempo de fermentação são parâmetros importantes no processo de obtenção da bebida fermentada por kefir, pois influenciam os componentes potenciais de promoção da saúde e os benefícios associados ao seu consumo, tais como unidades de microrganismos, ácidos orgânicos e metabólitos gerados. A relação entre tempo e temperatura é inversamente proporcional e quanto menor a temperatura, mais estendido será o processo fermentativo e maior será a conversão do substrato em ácidos, resultando em uma bebida com características sensoriais mais próximas ao vinagre [22,23].

Durante os períodos do ano é possível observar uma variação nas temperaturas ambientes em decorrência das mudanças climáticas características das estações do ano. Segundo o Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais [24], entre junho e agosto, predomina no Nordeste do Brasil, temperaturas amenas típicas do inverno da região, com temperatura máxima de aproximadamente 26,5 °C e mínima de 22,1°C. Em março, no outono, ocorre a transição entre o verão e inverno e é possível notar temperaturas mais homogêneas variando em torno de 24,1°C (mínima) e 30-32°C (máxima), e em outubro, na primavera, nota-se temperaturas com valores mais elevados em função da forte radiação solar e da maior frequência de dias com céu claro, com temperaturas máximas e mínimas nessa época que variam de 28,1°C e 22,5°C respectivamente.

Os resultados apresentados na Figura 1 se aproximam das médias das temperaturas máxima e mínima, características das estações do ano nos períodos em que foram mensuradas, evidenciando a variação das temperaturas ambiente ao longo do ano. Dada essa influência, pode-se inferir que o processo fermentativo sob temperaturas controladas pode contribuir para a otimização da fermentação e, conseqüentemente, favorecer as características finais das bebidas fermentadas de forma mais padronizada.

A Figura 2A apresenta a curva de fermentação do kefir no extrato de *C. esculenta* submetidos às temperaturas de 25°, 30° e 35°C, durante 4 horas de fermentação, em função dos valores de pH. Inicialmente, os valores de pH nos extratos foi de $5,5 \pm 0,2$ reduzindo ao longo do tempo, conforme já esperado em fermentações envolvendo microrganismos que realizam fermentação ácido-láctica ou ácido-acética [25]. O pH inicial dos extratos está em concordância com o pH relatado na literatura acerca dos grãos de kefir utilizados para obtenção das bebidas fermentadas [12]. A análise de regressão indicou R^2 de 0,9000 para 25°C, R^2 de 0,9148 para 30° e R^2 de 0,8033 para 35°C, indicando melhor linearidade na temperatura de 30°C quanto à redução do pH e, consequentemente, na velocidade de fermentação.

Como a redução do pH na CeKB artesanal foi associado estatisticamente com o crescimento dos microrganismos com potencial probiótico e também foi o fator crítico para delimitação do tempo de fermentação, o que envolvia aspectos sensoriais da bebida [12], este pH 5,0 foi considerado como parâmetro limite para estabelecer o tempo de fermentação da CeKB em temperatura controlada.

Assim, é possível observar que o tempo necessário para a produção da bebida variou nas diferentes temperaturas avaliadas. Antes dos primeiros 30 minutos de fermentação (0,5 hora) à temperatura de 35°C, o extrato apresentou pH de 5,0 (Figura 5). É provável que nesta temperatura, os nutrientes estejam sendo mais bem aproveitados pelos microrganismos fermentadores e haja otimização do crescimento e multiplicação dos mesmos, o que aumenta a produção de metabólitos responsáveis pela diminuição do pH de forma mais rápida, como é o caso das bactérias ácido-láticas que apresentam crescimento ótimo em temperaturas de 35 a 45°C [26].

Graça et al.[27] observaram a influência dos nutrientes presentes no substrato vegetal (polpa de cupuaçu) no processo de fermentação. Os autores descreveram que a redução do pH pela adição da polpa promove um aumento da disponibilidade de glicose e frutose e estes nutrientes podem ser metabolizados com facilidade devido ao seu rearranjo molecular contribuindo para o crescimento mais rápido de algumas espécies de microrganismos presentes nos grãos do kefir, como as leveduras.

No entanto, esse rápido abaixamento do pH pode implicar na seleção de alguma espécie de microrganismo e na redução da velocidade de crescimento de outras espécies presentes na bebida, que também podem ser de interesse, como probiótico, durante seu acondicionamento. Também pode interferir na etapa de maturação, a qual se configura um importante ambiente redutor para incorporação de substâncias sensoriais ao produto que impactam diretamente na vida útil e na aceitabilidade do mesmo [28,29] etapa esta que ocorre na CeKB após a fermentação.

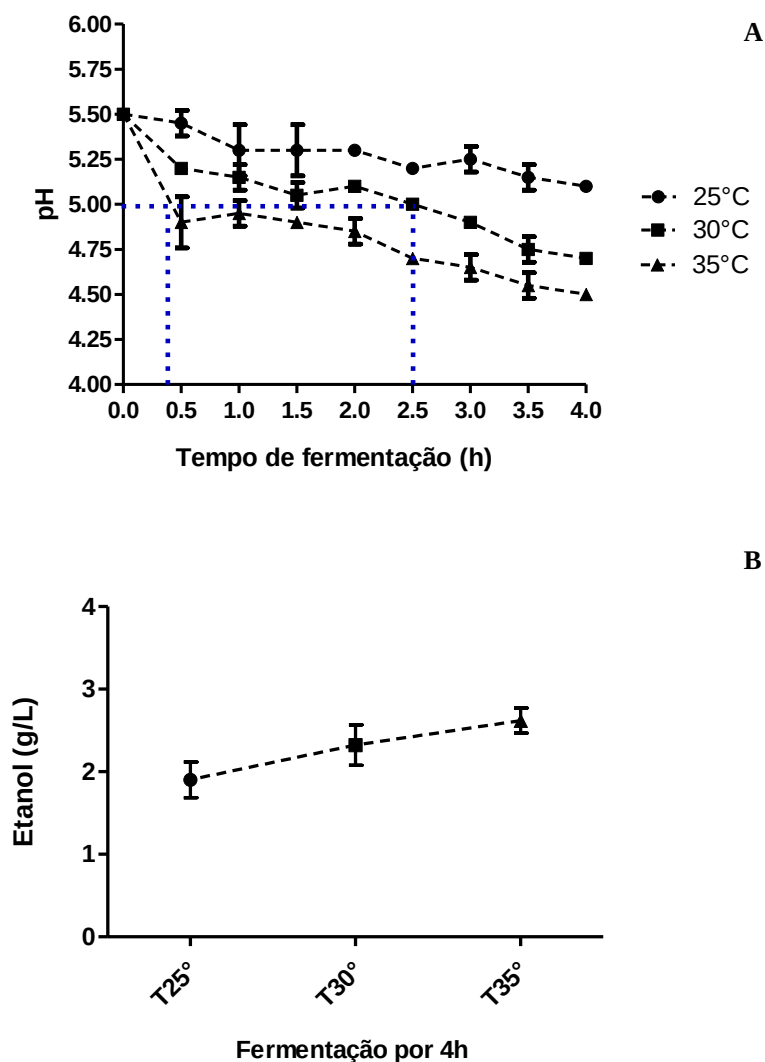


Figura 2. A: Curva de fermentação do kefir no extrato da *C. esculenta* em função do valor de pH em temperaturas controladas. Linhas pontilhadas em azul indicam tempo necessário para a bebida atingir pH 5,0. Valores de R^2 para 25°C: 0,9000, 30°C: 0,9148 e 35°C: 0,8033. **B:** Teor de etanol (g/L) na CeKB após 4 h de fermentação em temperaturas controladas.

Para a temperatura de 30°C, a obtenção da CeKB ocorre em aproximadamente 2 horas e meia de fermentação (Figura 2A), esse processo pode ser beneficiado por estar na faixa média de temperatura ótima para o crescimento de variadas espécies presentes no kefir. O tempo maior para atingir o pH 5,0 em comparação com a temperatura de 35°C pode estar relacionado a uma redução da atividade metabólica dos microrganismos em razão do distanciamento da faixa de temperatura considerada como ótima para o desenvolvimento dessas atividades [11].

Fiorda et al. [25] desenvolveram uma bebida utilizando o mel como substrato para a fermentação a partir dos grãos de kefir de água a 30°C e observaram a necessidade de manter a fermentação durante 24h. O crescimento dos grãos e aumento na contagem de bactérias ácido-láticas e leveduras permaneceu constante até o final do período de armazenamento (35 dias). Testes anteriores de otimização da fermentação foram feitos nesse estudo e evidenciaram a temperatura de 30°C, além da concentração do substrato, como melhor condição para a produção da bebida fermentada com mel. Outro estudo envolvendo a otimização do cultivo de grãos de kefir por fermentação utilizando lentilhas como substrato observou que a temperatura de 30°C promoveu maiores propriedades antioxidantes [30]. Sendo assim, além da temperatura de 30°C indicar uma curva de fermentação mais estável no presente estudo, nesta temperatura, algumas propriedades funcionais podem ainda ser mais favorecidas.

No que diz respeito à temperatura de 25°C, notou-se que ao longo das 4 horas de fermentação, o extrato não atingiu o pH necessário para a obtenção da bebida, indicando que essa temperatura não foi favorável à otimização do processo (Figura 2A). A partir da análise de temperatura ótima para o desenvolvimento de microrganismos específicos, é possível inferir que esta temperatura pode favorecer um desenvolvimento maior de leveduras em comparação com as bactérias ácido-láticas e ácido-acéticas, sendo essas últimas consideradas microrganismos-chave no processo de fermentação do kefir de água [31].

Ao utilizar a equação da reta obtida através da análise de regressão linear para fermentação a 25°C ($y = -0,09x + 5,4633$; $r^2 = 0,9$), pode-se identificar, hipoteticamente, que o extrato poderia atingir pH 5,0 após 5,15h de fermentação. Outros estudos, que abordam a utilização de diferentes substratos para a elaboração de bebidas fermentadas de kefir, descrevem um tempo necessário para fermentação igual ou superior a 24h. Como exemplos podem ser citados o extrato de figo cujo processo de fermentação se estende de 3 a 8 dias à 21°C [32,33], o extrato de pequi durante 24h à 22°C [34] e a bebida com mel durante 24h a 30°C [25]. No entanto, o curto intervalo de fermentação e elaboração da bebida à base de *C. esculenta* fermentada por kefir, sugere que o tubérculo possua em sua composição nutrientes que favoreçam esse processo [12] e que ainda não foram identificados tais como tipos de polissacarídeos, vitaminas e minerais. Laureys et al. (35) descobriram que a concentração de cálcio possui uma influência no crescimento dos grãos de kefir de água. O aumento da massa dos grãos e o metabolismo dos microrganismos também podem estar associados ao conteúdo de nitrogênio e carbono [36], confirmando a importante participação do substrato nos processos de obtenção da bebida.

A média do teor de etanol determinado (g/L), respectivamente para 25°C, 30°C e 35°C, após 4h de fermentação foi de $1,90 \pm 0,14$, $2,32 \pm 0,16$ e $2,62 \pm 0,07$ (Figura 2B). Apesar dos teores apresentarem uma curva ascendente com o aumento da temperatura, não houve diferença estatística no teor etanólico da CeKB nas diferentes temperaturas. Estes valores foram similares aos observados por Bueno et al. [37] na produção da bebida de polpa de pitaya fermentada por kefir à 25° por 24h atingindo uma concentração de etanol de 0,22g/mL (2,2g/L).

A concentração de etanol em bebidas fermentadas por kefir de água varia de acordo com as condições de fermentação, como a concentração de sacarose e dos grãos utilizados, o tipo de substrato, tempo e temperatura de fermentação [38,39,40] e, a partir das variações dos metabólitos, é possível determinar as características sensoriais da bebida fermentada [33].

Na produção artesanal, o açúcar mascavo, é a fonte de carbono mais utilizada na fermentação do kefir de água, quando esta é gradativamente substituída por glicose e frutose durante o processo de fermentação, observa-se um declínio nas taxas de produção de etanol [41]. Isso explica no geral a baixa concentração de etanol nas bebidas fermentadas por kefir, que podem variar de 0,2%-2% (p/v) [40], o que corroborou com os dados do presente estudo que identificou 0,24 a 0,33% (ABV% ou álcool por peso) na CeKB nas diferentes temperaturas. Diferentemente, bebidas lácteas fermentadas, de acordo com a Resolução nº 46 de 23 de outubro de 2007 e o *Codex Alimentarius*, apresentam teores maiores de etanol com limites entre 0,5% a 1,5% [42; 43].

A disponibilidade de oxigênio também pode afetar a composição química do produto final, uma vez que condições aeróbicas também favorecem a proliferação de bactérias ácido-acéticas resultando em um aumento na concentração de ácido acético e o que sugere oxidação do etanol e diminuição do seu teor [34], embora o crescimento das leveduras, que também são responsáveis pela produção de etanol como subproduto de seu metabolismo, se mantenha durante o processo [44]. Neste contexto, a acidificação rápida promovida no extrato de *C. esculenta* a 35°C pode ter contribuído para a hidrólise da sacarose e aumento da disponibilidade de glicose e frutose, conforme relatado por Graça et al. [27], e isso pode não ter favorecido uma produção de etanol mais expressiva frente às outras temperaturas avaliadas de 25 e 30°C. Assim, o controle do pH ácido, pela temperatura e velocidade de fermentação, pode ser um fator crítico para a produção de bebidas mais alcólicas de kefir.

A Tabela 1 apresenta as variações de temperaturas registradas nos sistemas de incubação e as médias das temperaturas dos extratos fermentados, durante o período de análise. Os sistemas de incubação apresentaram temperatura média de 25,1°C $\pm$ 0,1, 29,9°C $\pm$ 0 e 34,2°C $\pm$ 0,2, respectivamente para programação de 25°C, 30°C e 35°C. Foi observado que em todas as situações, os extratos apresentaram temperatura inferior à da incubação e variação percentual de 10,9 $\pm$ 1,9 para 25°C, 8,8 $\pm$ 0,8 para 30°C e 9,6 $\pm$ 0,9 para a temperatura de 35°C Houve diferença entre a variação das temperaturas dos extratos em graus (°C) na incubação a 25°C ($p < 0,05$) e a 30°C ($p < 0,01$) em comparação com a de 35°C. Em relação à variabilidade percentual, houve diferença estatística entre as variações da incubação a 25°C e 30°C ($p < 0,05$). Considerando os três sistemas de incubação, a temperatura a 30°C foi a que apresentou menor variação no extrato e foi observada uma tendência de variação média de 2,9°C $\pm$ 0,3 e diferença percentual de 9,8 $\pm$ 1 menor na temperatura do extrato em relação a da incubação.

O recipiente utilizado para acondicionar o extrato durante a fermentação poderia influenciar na resistência da transferência de calor ao mesmo, especialmente no início do processo. No entanto, as variações

de temperaturas ao longo do tempo de fermentação do extrato, no sistema de incubação (Tabela 1), seguiram uma tendência de variação do início ao final do processo. Sendo assim, é possível deduzir, através disso, que a possibilidade de interferência do recipiente na variabilidade entre a temperatura do extrato e a da incubação foi mínima.

Partindo da compreensão da natureza das reações de fermentação que ocorrem no processo de obtenção da bebida e que, de maneira geral, assumem o caráter exotérmico, ou seja, liberam calor através das reações para o ambiente [35], pode-se compreender que o padrão de variação de temperatura apresentado possivelmente acontece em razão da energia liberada através dessas reações. Esta situação indica que ao trabalhar com temperaturas controladas para obtenção da CeKB, deve-se considerar uma variação média aproximada de 10% relativo à perda desta temperatura. Sendo assim, a temperatura de incubação a 30°C indicada neste presente estudo como promotora de estabilidade da curva de fermentação e otimização do processo de elaboração da bebida em temperaturas controladas, reflete em uma temperatura diretamente da CeKB de, aproximadamente, 27°C.

Assim, para processos industriais que visem o uso concomitante de outras tecnologias inovadoras como o ultrassom para otimizar ainda mais a fermentação, ou visem a seleção e controle de crescimento de determinadas espécies de microrganismos da cultura simbiótica, esta variação interna do substrato também deve ser considerada.

Tabela 1. Variação de temperatura do sistema de incubação e do Extrato de *C.esculenta* durante a fermentação do Kefir.

Temperatura 25°C					Temperatura 30°C				Temperatura 35°C			
Tempo (h)	Incubaça o (°C)	Extrat o (°C)	Variação		Incubaça o (°C)	Extrato (°C)	Variação		Incubaça o (°C)	Extrat o (°C)	Variaçã o	
			°C	%			°C	%			°C	%
0,5	25,1	23,0 ±1,0	2,1	8,4	29,8	27,1 ± 1,0	2,7	9,1	34,4	30,7 ±0,6	3,8	10,9
1	25,4	23,2 ±0,1	2,3	8,9	29,9	27,1 ±0,9	2,9	9,5	34,1	30,5 ±1,1	3,6	10,6
1,5	25,1	21,9±0,2	3,2	12,7	29,9	27,5 ± 1,1	2,5	8,2	34	30,7±1,6	3,4	9,9
2	25	22,3 ±0,4	2,7	10,8	29,9	27,2 ±0,7	2,7	9,0	34,1	31,3±1,1	2,8	8,2
2,5	25,2	21,7 ±0,1	3,5	13,7	30	27,2 ± 1,6	2,8	9,3	34,4	31,1±0,8	3,2	9,5
3	24,9	22,4 ±0,7	2,5	9,8	30	27,2 ± 1,4	2,9	9,5	34,2	30,9±0,1	3,4	9,8
3,5	25,4	22,8 ±0,6	2,6	10,2	29,9	27,8 ±1,1	2,1	7,0	34,1	30,8±1,2	3,4	9,8
4	25,3	22,1 ±0,2	3,2	12,6	29,9	27,3 ±1,0	2,6	8,7	34,4	31,6 ±0,7	2,8	8,1
Average ±SD	25,2 ±0,2	22,4 ±0,4	2,7 ±0,5 ^a	10,9±1,9 ^a	29,9 ±0,1	27,3 ± 1,09	2,6±0,3 ^a	8,8±0,8 ^b	34,2 ±0,2	30,9 ±0,5	3,3±0,3 ^b	9,6±1,0 ^{ab}
Variação média											2,9±0,3 °C	9,8±1,0%

Sistema de incubação à Banho-Maria. Temperaturas programadas com termostato a 25°C, 30°C e 35°C. Temperaturas do extrato apresentadas como média e desvio padrão de duplicata. Letras diferentes na média de variação em graus (°C) e percentual indicam diferença estatística entre as temperaturas controladas (p<0,5, One-Way ANOVA e Teste Tukey).

Considerações Finais

A análise das temperaturas mensuradas no extrato de *C. esculenta* durante fermentação à temperatura ambiente, nos diferentes períodos anuais, evidenciou a importância do controle dos parâmetros de temperatura e tempo para padronização e consequente provável preservação das características sensoriais desejáveis ao produto e a manutenção do potencial probiótico da bebida.

O tempo necessário para obtenção da CeKB a 30°C foi de aproximadamente 2 horas e meia, sendo esta temperatura a que apresentou melhor linearidade de velocidade de fermentação e menor variabilidade entre a temperatura do extrato e o sistema de incubação. O teor de etanol não variou significativamente entre os extratos fermentados a diferentes temperaturas. O estudo evidenciou uma variabilidade de 10% de perda de calor durante a fermentação que deve ser considerada na elaboração da CeKB, sendo um dado de aplicação que também pode se estender a outros substratos e bebidas fermentadas por kefir, quando o controle da temperatura no substrato for crítico para estabilidade e padronização desses produtos.

Dados adicionais sobre a composição química do extrato aquoso de *C. esculenta* e a sua relação quanto ao favorecimento da fermentação do kefir em curto tempo poderá auxiliar na compreensão da dinâmica de fermentação de culturas simbióticas e a otimização de processos fermentativos na indústria de alimentos.

Referências

- [1] M.V. Silva; E.C.S. Nascimento; E.C.N. Ferreira; S.L. Silva; V.C.A Galúcio, Análise de crescimento do Kefir em polpa de açaí. Revista Saber Científico, v.9, n.2, p.1–10, 2020
- [2] V. Alves et.al, Development of fermented beverage with water kefir in water-soluble coconut extract (*Cocos nucifera* L.) with inulin addition. LWT. V.145, n 111364, 2021.
- [3] M. Gonda; G. Garmendia; C. Rufo; A.L. Pelaez; M. Wisniewski; S. Droby; S. Vero, Biocontrol de *Aspergillus flavus* em Ensiled Sorghum por Water Kefir Microorganisms. Microorganisms, v.7 (8), p. 253, 2019
- [4] N.F Azizi; M.R. Kumar; S.K. Yeap; J.O. Abdullah; M. Khalid; A.R. Omar; M.A. Osman; S.A.S. Mortadza; N.B. Alitheen. Kefir and its biological activities. Foods, v. 10, n. 6, p. 1210, 2021
- [5] F.O. Gomes; M. D. C. M. Da Silva; P. B. De Sousa; T. K. T. Freitas; D.J. S. Silva; R.S.D.R.M. Araujo, Avaliação físico-química de uma bebida à base de kefir saborizada com pequi. Brazilian Journal of Development, v.6 (3) p.10755-10762, 2020

- [6] R. S. Hamida; A. Shami; M. A. Ali; Z. N. Almohawes; A.E. Mohammed; M. Bin-Meferij, Kefir: A protective dietary supplementation against viral infection. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 133, p. 110974, 2021.
- [7] D.D. Rosa; M.M.S. Dias; E.U.M; Grzeškowiak; S.A. Reis; L.L. Conceição; M.D.C.G. Peluzio, Milk kefir: nutritional, microbiological and health benefits. *Nutr. Res. Ver*, 2017
- [8] B.C.T. Bourrie; C. Richard; B.P. Willing, Kefir in the prevention and treatment of obesity and metabolic disorders. *Current Nutrition Reports*, v. 9, n. 3, p. 184-192, 2020.
- [9] A. Rocha-Gomes; A. Escobar; J.S. Soares; A.A. Da Silva; N.A.V. Dessimoni- Pinto; T.R. Riul, Chemical composition and hypocholesterolemic effect of milk kefir and water kefir in Wistar rats. *Rev. Nutr*, v.31, p.137–145, 2018
- [10] I. Yilmaz; B. Arslan, The effect of kefir consumption on the lipid profile for individuals with normal and dyslipidemic properties: a randomized controlled trial. *Rev Nutr*. 2022
- [11] K.M. Lynch; S. Wilkinson; L. Daenen; E.K. Arent, An update on water kefir: Microbiology, composition and production. *Food Microbiology*, v. 345, 2021
- [12] L.C. Pinto; T.P. De Oliveira; R. De Souza, et al., Probiotic kefir-fermented beverage-based *Colocasia esculenta* L.: Development, characterization, and microbiological stability during chilled storage. *Journal of food processing and preservation*, v.45, n. 2, 2020
- [13] J.B.M. Miamoto; J. Pereira; S.K.V. Bertolucci, Obtaining and characterization of freeze-dried whole taro root (*Colocasia esculenta*), mucilage and residue as functional food. *Revista Nutrição Brasil*, v. 17 n. 1, 2018
- [14] M.C. M. Batista; K.A. De Jesus; F.M. N. De Oliveira, Evaluation of the effects of Kefir on the Intestinal Microbiota. *Brazilian Journal of Development*, v. 7, n. 9, p. 93727-93744, 2021.
- [15] A.R.A. Sá.; M.B.D. Lima; E.I.G.E. Silva; M.L.M. Mendes; C.M.B.D.O. Messias, Caracterização físico-química e nutricional de farinhas obtidas de inhame (*Dioscorea* spp.) e taro (*Colocasia esculenta*) comercializados em Petrolina-PE. *Revista Saúde*, v.44, p.3, 2018
- [16] J. Calle; N. Gasparre; Y. Benavent-Gil.; C.M. Rossel, Aroids as underexplored tubers with potential health benefits. *Advances in Food and Nutrition Research*, v. 97, p. 319-359, 2021.
- [17] V.S. Silva; R.C. Orlandelli, Desenvolvimento de alimentos funcionais nos Últimos anos: uma revisão, *Revista Uningá*, 56, 182-194, 2019
- [18] H.C. Tesser; E.C. Bueno; L.A.N. Nesello; A. Geraldo, Avaliação do consumo e percepção dos efeitos dos probióticos por universitários com diferentes fenótipos ABO. *R. bras. Tecnol. Agroindustr.*, Francisco Beltrão, 14(2), 3418-3434, 2020
- [19] J. Carreiro, Alimentos saudáveis estão entre as principais tendências do mercado, *Jornal Estadão* 2019. Disponível em:< <https://emails.estadao.com.br/blogs/comida-deverdade/alimentos-saudaveis-estao-entre-as-principais-tendencias-do-mercado/>>. Acesso em: 20 set. 2019
- [20] W.C. Dias; A.D. De Oliveira Martins; S.M. Junior, Kefir: Características e Benefícios.

Alimentos: Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente, v. 1, n. 7, p. 22-42, 2020

[21] A. Martínez-Torres, et al., Inferring the role of microorganisms in water kefir fermentations. *Int. J. Food Sci. Technol.*, v.52, p. 559–571, 2017

[22] K.M. Lynch; E. Zannini; S. Wilkinson; L. Daenen; E.K. Arendt, Physiology Of acetic acid bacteria and their role in vinegar and fermented beverages. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 2019

[23] H.E. Romero-Luna; A. Peredo- Lovillo; A. Hernández-Mendoza; H. Hernández-Sánchez; P.I. Cauich-Sánchez; R.M. Ribas-Aparicio; G. Dávila-Ortiz, Probiotic potential of *Lactobacillus paracasei* CT12 isolated from water kefir grains (Tibicos) *Curr. Microbiol.* p. 2584-2592, 2020

[24] Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE) – Centro de previsões de tempo e estudo climáticos – CPTEC, 2021

[25] F.A. Fiorda; G.V. De Melo Pereira; V. Thomaz- Soccol; S.K. Rakshit; M.G.B. Pagnoncelli; L.P.S. De Vandenbergh, C.R. Soccol, Microbiological, biochemical, and functional aspects of sugary kefir fermentation: A review, *Food Microbiol.*, V.66, p.86–95, 2017

[26] A.Y. Tamine; A. Skriver; L.E. Nilsson, Starter cultures. *Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk*, v.1, p. 11–52, 2006

[27] A.P.P. Graça; T.C. Maria; E. Aguiar-Oliveira; M.A. Deziderio; M.R. Mazalli.; E.S. Kamimura; R.R. Maldonado, Cupuassu as a potential substrate for fermentation using kefir grains. *European International Journal of Science and Technology*, v. 7, n. 6, 2018.

[28] F.A. Fiorda; G.V.M. Pereira; V. Thomaz-Soccol; S.K. Rakshit; C.R; Soccol, Evaluation of a potentially probiotic non-dairy beverage developed with honey and Kefir grains: Fermentation kinetics and storage study. *Food Science and Technology International*, v. 22, n. 8, p. 732 742, 2016.

[29] A. Kayacier; M. Dogan, Rheological properties of some gums-salep mixed solutions, *Journal of Food Engineering*, v.72 (3), p.261-265, 2006

[30] L.M.A. Oliveira; R.J.S. Castro, Kefir fermentation as a bioprocess to improve lentils antioxidants properties. *Braz. J. Food Technol.*, v. 23, e2019120, 2020 |

[31] R.R. Gamba; T. Koyanagi; A.L. Peláez; G. De Antoni; T. Enomoto, Changes in microbiota during multiple fermentation of kefir in different sugar solutions revealed by high-throughput sequencing *Curr. Microbiol.* 78 (6), pp. 2406-2413, 2021

[32] M. Verce; L. De Vuyst; S. Weckx, Shotgun metagenomics of a water kefir fermentation ecosystem reveals a novel *Oenococcus* species. *Front. Microbiol.*, 2019

[33] D. Laureys; M. Aerts; P. Vandamme; L. De Vuyst, Oxygen and diverse nutrients influence the water kefir fermentation process. *Food Microbiol.* 73, 351–361, 2018 doi: 10.1016/j.fm.2018.02.007

[34] D. Laureys; M. Aerts; P. Vandamme; L. De Vuyst, The buffer capacity and calcium concentration of water influence the microbial species diversity, grain growth, and metabolite production during water kefir fermentation. *Front. Microbiol.*, v.10, p.2876. 2019

[35] D. Laureys; A. Van Jean; J. Dumont; L. De Vuyst, Investigation of the instability and low water kefir

grain growth during an industrial water kefir fermentation process. Appl. Microbiol. Biotechnol, v.101, p.2811–2819, 2017

[36] J.Stadie; A. Gulitz; M.A. Ehrmann; R.F. Vogel, Atividade metabólica e semi- interações bióticas de bactérias de ácido láctico e leveduras isoladas de kefir de água. Food Microbiol, v.35, p.92-98, 2013

[37] R.S. Bueno et al., Quality and shelf life assessment of a new beverage produced from water kefir grains and red pitaya..Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie, v. 140, p. 110770, 2021

[38] Atalar. Functional kefir production from high pressure homogenized hazelnut milk Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie, v.107, p. 256-263, 2019

[39] A.P. Norberto; R.P. Marmentini; P.H. Carvalho; F.B. Campagnollo; H.H. Takeda, et al, Impact of partial and total replacement of milk by water-soluble soybean extract on fermentation and growth parameters of kefir microorganisms. Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie, V. 93, p. 491-49, 2018

[40] M.D. Pendon; A.A. Bengoa; C. Iraporda; M. Medrano; G.L. Garrote; A.G. Abraham, Water kefir: Factors affecting grain growth and health- promoting properties of the fermented beverage. Journal of Applied Microbiology, p.162– 180, 2022

[41] T.M. Destro; D.D.F. Prates; L.S. Watanabe; S. Garcia; G. Biz; W.A. Spinosa, Organic brown sugar and jaboticaba pulp influence on water kefir fermentation. Ciência e Agrotecnologia, São Paulo, 2022

[42] Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Resolução nº. 46 de 23 de outubro de 2007, Brasília, 2007

[43] FAO/WHO, Food and agriculture organization of the united nations and world health organization. Milk and Milk Products - CODEX STAN 243–2003, 2^a ed., 2011.

[44] Di, Xu et al. Lifestyle of *Lactobacillus hordei* isolated from water kefir based on genomic, proteomic and physiological characterization. International journal of food microbiology, v. 290, p. 141-149, 2019.