

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DOS ALIMENTOS**

Daniela Buzatti Cassanego

**BIOPROSPECÇÃO DE LEVEDURAS ISOLADAS DE KEFIR PARA
APLICAÇÃO EM SORVETES PROBIÓTICOS**

**Santa Maria, RS
2017**

Daniela Buzatti Cassanego

**BIOPROSPECÇÃO DE LEVEDURAS ISOLADAS DE KEFIR PARA APLICAÇÃO
EM SORVETES PROBIÓTICOS**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Área de Concentração em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutor em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**.

Orientadora: Prof^a Dr^a Neila S.P.S. Richards
Co-orientador: Prof Dr. Marcio Antonio Mazutti

Santa Maria, RS
2017

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Cassanego, Daniela Buzatti

Bioprospecção de leveduras isoladas de Kefir para aplicação em sorvetes probióticos / Daniela Buzatti Cassanego.- 2017.

89 f.; 30 cm

Orientadora: Neila Silvia Pereira dos Santos Richards
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, RS, 2017

1. Potencial probiótico 2. In vitro 3. Leveduras 4. Sobrevivência 5. Alimento probiótico I. Richards, Neila Silvia Pereira dos Santos II. Título.

© 2017

Todos os direitos autorais reservados a Daniela Buzatti Cassanego. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: danybuzatti@yahoo.com.br

Daniela Buzatti Cassanego

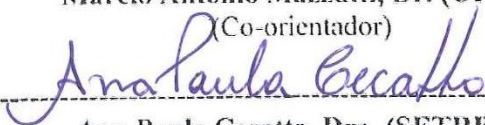
**BIOPROSPECÇÃO DE LEVEDURAS ISOLADAS DE KEFIR PARA APLICAÇÃO
EM SORVETES PROBIÓTICOS**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Área de Concentração em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutor em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**.

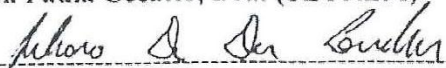
Aprovado em 21 de setembro de 2017:

Neila S. P. Santos Richards, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Marcio Antonio Mazzutti, Dr. (UFSM)
(Co-orientador)



Ana Paula Cecatto, Dra. (SETREM)



Juliano de Dea Lindner, PhD. (UFSC) - Videoconferência



Liliâne de Freitas Bauermann, Dra. (UFSM)



Osmar Damían Prestes, Dr. (UFSM)

Santa Maria, RS
2017

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por proteger, guiar e iluminar minha caminhada, por ter me dado força nos momentos em que precisei.

À professora, orientadora, Neila S. P. S. Richards pela compreensão, apoio, carinho e dedicação, também pelos “puxões de orelha”, dados apenas quando necessários, e, principalmente, por sua confiança em mim, “Prof” a senhora é um exemplo e muito obrigada por tudo!

Aos meus pais Claudia e Jorge, por TUDO, vocês sempre me apoiaram, sempre colocaram os estudos em primeiro lugar e muitas vezes se sacrificaram por isso, sempre fizeram de tudo para que suas filhas fossem pessoas dignas, e sempre nos deram bons exemplos, eu não chegaria aonde cheguei e aonde espero chegar sem o apoio, incentivo, dedicação e amor de vocês, meus mais do que sinceros agradecimentos, espero ter dado motivos para vocês estarem orgulhosos. Minha irmã Gabriela que me ajudou quando precisei e sei que posso contar sempre.

A toda minha família, que sempre esteve ao meu lado torcendo pelo meu sucesso e realizações dos meus sonhos, principalmente ao meu amado primo e afilhado Bernardo, que alegra meus dias e de todos que o cercam.

As minhas amigas que sempre me apoiam e torcem pelo meu sucesso, Teka, Ligi, Monica, Mari, Flávia, Fran, foram tantas as vezes que vocês me ajudaram.

As amigas, companheiras e colegas de pós-graduação, Ana, Fran e Mari, que me acompanharam por todo esse período e tornaram possível a execução deste trabalho, com quem vivi um ambiente de verdadeira aprendizagem colaborativa regado com muito mate, café e risadas.

À banca avaliadora, pela disposição, ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria, seus professores e funcionários, por auxiliarem no meu crescimento profissional. Agradeço também à CAPES pela concessão da bolsa de doutorado.

A todos os colegas, professores e funcionários que passaram pela pós durante minha trajetória, obrigada pela convivência e tolerância diária.

Meus sinceros agradecimentos aos meus colegas, amigos, familiares e todos que, de alguma forma, contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

RESUMO

BIOPROSPECÇÃO DE LEVEDURAS ISOLADAS DE KEFIR PARA APLICAÇÃO EM SORVETES PROBIÓTICOS

AUTORA: Daniela Buzatti Cassanego

ORIENTADOR: Neila Silvia Pereira dos Santos Richards

O kefir é considerado um alimento probiótico, diferenciando-se dos demais por apresentar em sua composição, bactérias, leveduras e alguns fungos. Há uma grande variedade em relação às leveduras que fazem parte do complexo simbiótico dos grãos de kefir e, tal diversidade depende do tipo de substrato em que os grãos são cultivados, do local, da temperatura e outros fatores. Em relação às leveduras probióticas, estudos podem ser encontrados sobre possíveis cepas com tal potencial, porém, a *Saccharomyces boulardii* é a principal representante das mesmas. Possivelmente, diferentes leveduras presentes no kefir podem apresentar potencial probiótico semelhante ou melhor do que à *Saccharomyces boulardii*. O uso de leveduras probióticas em alimentos é restrito, devido a formação de álcool e CO₂, porém, o sorvete apresenta-se como uma boa forma de utilização das mesmas, uma vez que o mesmo não sofre processo de fermentação e as leveduras podem ser adicionadas ao alimento na forma liofilizada. Neste sentido, objetivou-se isolar leveduras provenientes de amostras de kefir da cidade de Santa Maria, RS, e identificá-las geneticamente, por meio de PCR, a fim de, posteriormente, avaliar o potencial probiótico, *in vitro*, das cepas de leveduras identificadas. Dezenove cepas de leveduras foram isoladas de seis diferentes amostras de kefir, porém, apenas três espécies destes micro-organismos foram identificadas; *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniospora uvarum* e *Kazachstania unispora*. Ao simular a passagem das cepas isoladas pelo ambiente gastro-intestinal observou-se que as mesmas não poderiam ser consideradas probióticas, uma vez que não resistiram à digestão pancreática, de acordo com a metodologia proposta. Com tais resultados, o objetivo inicial de administrar uma ou mais cepas de leveduras isoladas do kefir e que apresentassem potencial probiótico na matriz alimentícia sorvete não foi possível. Entretanto, elaborou-se um sorvete probiótico, utilizando como micro-organismo a levedura *Saccharomyces boulardii*, a mesma é utilizada desde os anos 50 como probiótico, sendo utilizada na forma liofilizada na recomposição da flora intestinal após terapia com antibióticos, como medicamento. Nesse contexto, foram elaboradas e avaliadas duas formulações de sorvetes, SC – sorvete controle e SP – sorvete probiótico. Os testes de sobrevivência da levedura *Saccharomyces boulardii* foram realizados até os 120 dias de armazenamento do produto. Os resultados indicaram que as amostras de sorvete (SC – controle e SP – probiótico) estão de acordo com parâmetros preconizados pela legislação brasileira e assemelham-se com resultados encontrados na literatura. Em relação aos testes de sobrevivência da *Saccharomyces boulardii*, observou-se que a mesma apresentou viabilidade por até 90 dias de armazenamento do sorvete, em temperatura de -18 °C. Os resultados mostraram que, apesar das leveduras isoladas e identificadas no kefir regional não apresentarem potencial probiótico, a utilização da levedura probiótica *Saccharomyces boulardii*, apresentou resultados satisfatórios quando avaliou-se sua sobrevivência em sorvete probiótico, porém, mais estudos sobre o assunto devem ser elaborados para a comercialização do sorvete probiótico inovador.

Palavras-chave: Potencial probiótico. *In vitro*. Leveduras. Sobrevivência. Alimento probiótico.

ABSTRACT

BIOPROSPECTING OF YEASTS ISOLATED FROM KEFIR FOR APPLICATION IN PROBIOTIC ICE CREAMS

AUTHOR: DANIELA BUZATTI CASSANEGO

ADVISER: NEILA SILVIA PEREIRA dos SANTOS RICHARDS

Kefir is considered a probiotic food, being different as it presents in its composition bacteria, yeasts and some fungi. From the literature review, it was concluded that there is a great variety when it comes to the yeasts that are part of the symbiotic complex of kefir grains, and such diversity depends on the type of substrate in which the grains are grown, as well as location, temperature and other factors. In relation to probiotic yeasts, there are many studies on possible strains with such potential; however, *Saccharomyces boulardii* is the largest representative of them. Possibly, different yeasts present in kefir may present a similar or better probiotic potential than *Saccharomyces boulardii*. The use of probiotic yeasts in food is restricted, however, ice-cream is presented as a good probiotic food carrier, since it does not undergo the fermentation process and yeasts can be added to the food in the lyophilized form. Thus, the aim was to isolate the yeasts from the kefir samples from the city of Santa Maria/RS, and identify them genetically through PCR for the purpose of, later, evaluate the probiotic potential of the identified yeast strains by in vitro technique. Nineteen yeast strains were isolated from six different kefir samples; but only three species from these microorganisms were identified: *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniospora uvarum* and *Kazachstania unispora*. By simulating the passage of isolated strains through the gastrointestinal environment, it was observed that they could not be considered probiotics, once they did not show resistance to pancreatic digestion, according to the proposed methodology. With such results, the initial objective of managing one or more yeast strains isolated from kefir that presented probiotic potential in the ice-cream as food matrix was not possible. However, a probiotic ice-cream was elaborated using *Saccharomyces boulardii* yeast as a microorganism. This yeast has been already used since the 1950s as a probiotic, but in the lyophilized form as a medicine. In this context, two formulations of ice-cream were elaborated and evaluated, the control ice-cream and probiotic ice-cream. Survival tests of *Saccharomyces boulardii* yeast were performed up to 120 days of product storage. The results indicated that the ice-cream samples (control ice-cream and probiotic ice-cream) are in accordance with parameters recommended by the Brazilian legislation and are similar to results found in the literature. In relation to the survival tests of *Saccharomyces boulardii*, it was observed that it presented viability for up to 90 days of ice-cream storage, at temperature -18 °C. The results showed that even though yeasts isolated and identified in regional kefir do not present probiotic potential, the use of the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* presented satisfactory results when evaluating its survival in probiotic ice-cream. Nevertheless, further studies on the subject must be carried out for the commercialization of this innovative probiotic ice-cream.

Keywords: Probiotic potential. *In vitro*. Yeasts. Survival. Probiotic food.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Frequência de distribuição média da população microbiana predominante em kefir tradicional em diferentes dias (A-dia 20), (B-dia 25) e (C-dia 30), as figuras D, E e F representam o kefir cultivado em massa onde D representa dia 3, E dia 10 e F dia 30.....	13
Figura 2 –	Esquema do trato intestinal, ilustrando os diferentes mecanismos de ação de <i>Saccharomyces boulardii</i> (Sb). À esquerda, os efeitos de diferentes microorganismos patogênicos são retratados. À direita, sete diferentes efeitos protetores de <i>S. boulardii</i> são retratados	17
Figura 3 –	Fluxograma das etapas da fabricação de sorvetes	18
Figura 4 –	Consumo de sorvete <i>per capita</i> em litros/ano. Fonte: ABIS - Associação Brasileira das Indústrias e do Setor de Sorvetes (2016).....	19

MANUSCRITO 3

Figura 1 –	Fluxograma da elaboração das amostras de sorvetes (SP = sorvete probiótico (com adição de <i>S. boulardii</i>); SC = sorvete controle).....	69
------------	--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Micro-organismos usados como probióticos.....	15
--	----

MANUSCRITO 2

Tabela 1 – Microbiological evaluation of six kefir samples donated by locals of Santa Maria, RS. Results expressed as CFU.mL ¹	52
Tabela 2 – Genetic identification of the species with their edited sequences assembled and compared to sequences of TIPO strains deposited in GenBank using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) algorithm. Identities between 99 and 100% allowed identification at the taxonomic level of species	54
Tabela 3 – Results of probiotic potential of yeasts used in vitro tests	57

MANUSCRITO 3

Tabela 1 – Resultados das análises físico-químicas realizadas nas duas amostras de sorvetes. Santa Maria, RS, 2017	71
Tabela 2 – Resultados das análises microbiológicas de amostras de sorvete.....	73
Tabela 3 – Avaliação da sobrevivência da <i>Saccharomyces boulardii</i> no sorvete probiótico (SP)	74

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1	KEFIR	12
2.2	LEVEDURAS PROBIÓTICAS	14
2.3	SORVETES PROBIÓTICOS	17
3	DESENVOLVIMENTO	21
3.1	MANUSCRITO 1	22
3.2	MANUSCRITO 2	47
3.3	MANUSCRITO 3	64
4	DISCUSSÃO GERAL.....	82
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	84
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85

1 INTRODUÇÃO

O kefir é uma solução viscosa, acidificada e ligeiramente alcoólica, produzido através da fermentação de leite por meio de grãos como cultura starter (FAO/WHO, 2003). Os grãos de kefir consistem em uma rica flora microbiológica, responsável pela produção desta tradicional bebida fermentada de leite, com propriedades e sabor único. Os compostos voláteis de amostras de kefir são diversos e estão relacionados à diversidade microbiana de grãos dos grãos, compostos por bactérias, leveduras e fungos o que faz do produto um alimento diferenciado (DERTLI; ÇON, 2017).

Além de ser elaborado comumente a partir de leite, a síntese de certas vitaminas, hidrólise de proteínas e lactose, e a formação de compostos bioativos durante a produção leva ao aumento do valor nutricional do kefir (KESENKAS et al., 2017). O kefir já é conhecido como complexo probiótico e sua resistência às condições severas do trato gastrointestinal são bem estudadas e conhecidas (LIMA et al., 2017).

Probióticos são micro-organismos vivos, os quais administrados em quantidades adequadas conferem benefícios á saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2001). A maioria dos probióticos são bactérias, sendo que as bactérias ácido lácticas (BAL) são as mais conhecidas e utilizadas em muitos alimentos, tais como leites fermentados, queijos e alimentos à base de vegetais (CHEN et al., 2014). O uso terapêutico de probióticos contra distúrbios gastrointestinais é uma tendência atual e as aplicações emergentes ganharam popularidade devido aos seus benefícios às atividades microbiológicas nos processos digestivos (LIMA et al., 2017).

Cepas probióticas de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Saccharomyces* possuem um extenso histórico de segurança para o seu consumo pela população saudável, de modo geral, sendo consideradas GRAS (*General Recognized as Safe*) (SAAD et al., 2011).

Saccharomyces boulardii é praticamente a única levedura comercializada na medicina integrativa com função probiótica (MCFARLAND, 2010 e 2017), apresentando propriedades probióticas benéficas para a saúde, já relatados em estudos, e é comumente utilizada como medicamento contra distúrbios gastrointestinais (ARSLAN et al., 2015).

A demanda de alimentos funcionais probióticos está crescendo rapidamente devido à maior conscientização dos consumidores sobre o impacto dos alimentos na saúde. Os probióticos estão sendo inclusos em diferentes sistemas alimentares, além dos tradicionais produtos lácteos fermentados, inúmeros alimentos funcionais estão disponíveis no mercado atualmente, no entanto, o principal desafio é manter o número elevado viável desses

probióticos em alimentos durante o processamento e armazenamento, uma vez que doses insuficientes no momento do consumo não fornecerão o benefício de saúde desejado (TRIPATHI; GIRI, 2014).

O veículo alimentício escolhido para a incorporação de cepas probióticas deve ser cuidadosamente estudado, particularmente em relação aos produtos fermentados, os quais a multiplicação de micro-organismos probióticos pode resultar em características não peculiares ou mesmo indesejáveis ao produto (KOMATSU et al., 2008).

Apesar do congelamento e descongelamento causar injúrias às células dos micro-organismos probióticos (SAAD et al., 2011) estudos mostram que o sorvete é um excelente veículo para bactérias probióticas, quando comparado aos produtos lácteos fermentados (RANADHEERA et al., 2012).

Cruz et al. (2009) afirmaram que a incorporação de bactérias probióticas em sorvetes é vantajosa, pelo fato dessa categoria de alimentos ser rica em nutrientes e consumida pelo público em geral.

Tendo em vista esses apontamentos, o objetivo da tese foi identificar e avaliar o potencial probiótico de leveduras isoladas de amostras de kefir adquiridas na cidade de Santa Maria, RS, bem como a elaboração de um sorvete inovador, utilizando a levedura *Saccharomyces boulardii* como micro-organismo probiótico. Dentre os objetivos específicos podemos listar:

- ✓ Multiplicar diferentes amostras de kefir da cidade de Santa Maria – RS;
- ✓ Verificar a qualidade microbiológica das amostras;
- ✓ Isolar leveduras presentes nas amostras;
- ✓ Identificar geneticamente as leveduras isoladas;
- ✓ Simular a sobrevivência das leveduras em ambiente gástrico;
- ✓ Elaborar um sorvete probiótico;
- ✓ Determinar as características físico-químicas (pH, acidez titulável, cinzas, gordura, umidade, proteína, densidade aparente) do(s) sorvete(s);
- ✓ Avaliar microbiologicamente a(s) amostra(s) de sorvete(s);
- ✓ Avaliar a sobrevivência das leveduras na amostra de sorvete probiótico.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 KEFIR

Dentre aos vários tipos de leites fermentados existentes no mundo, o kefir destaca-se pelo seu alto potencial como alimento funcional, devido sua microbiota simbiótica ser dotada de características probióticas. Comparado ao iogurte, o kefir, além de possuir uma escala maior e mais diversificada de micro-organismos viáveis em sua cultura inicial, também apresenta um nível de atividade da β -galactosidase 60% mais elevado, contribuindo para um aumento significativo da digestão da lactose do leite (HERTZLER; CLANCY, 2003).

O kefir é o único produto lácteo cultivado devido a combinação de fermentação ácido láctica e alcoólica (TAS et al., 2012). É produzido pela atividade microbiana simbiótica dos grãos de kefir que têm um equilíbrio relativamente estável e específico de bactérias do ácido láctico e leveduras (GUZEL-SEYDIM et al., 2010; LEITE et al., 2013).

Segundo Plessas et al. (2005) os grãos podem ser definidos como aglomerados de micro-organismos onde os mesmos são mantidos unidos por uma matriz de polissacarídeos, apresentando uma relação simbiótica entre bactérias e leveduras (LOPITZ-OTSOA et al., 2006). Outra característica particular do kefir é que seus grãos podem ser recuperados inúmeras vezes após a fermentação, tornando o processo rentável (SATIR; SEYDIM, 2016).

Em geral, o kefir possui $1,98 \text{ g.L}^{-1}$ de dióxido de carbono e 0,48% de álcool, sendo que o conteúdo de CO_2 aumenta com a elevação da concentração de grãos de kefir (SARKAR, 2007).

A origem do kefir ainda é incerta, autores afirmam que trata-se de uma bebida originária das montanhas do Cáucaso (WITTHUHN et al., 2005; LOPITZ-OTSOA et al., 2006), entretanto este produto pode ter surgido, independentemente, em diferentes regiões, resultando populações microbianas específicas e distintas, que produziam bebidas com diferentes propriedades sensoriais e microbiológicas (MIGUEL et al., 2010).

Em estudo realizado por Yang et al. (2014), foram encontrados vestígios de kefir em tumbas no cemitério de Xiaohe na China, os autores evidenciaram a utilização do kefir nos anos de 1450-1980 a.C. No estudo, há relatos que as tribos locais consumiam o kefir como uma alternativa ao leite, já que as mesmas apresentavam intolerância à lactose.

Além dos benefícios nutricionais e da alta atividade da β -galactosidase, acredita-se que os micro-organismos do kefir possuam várias outras propriedades terapêuticas, tais como: atividade antibacteriana, atuação no trato gastrointestinal, efeito hipocolesterolêmico, efeito

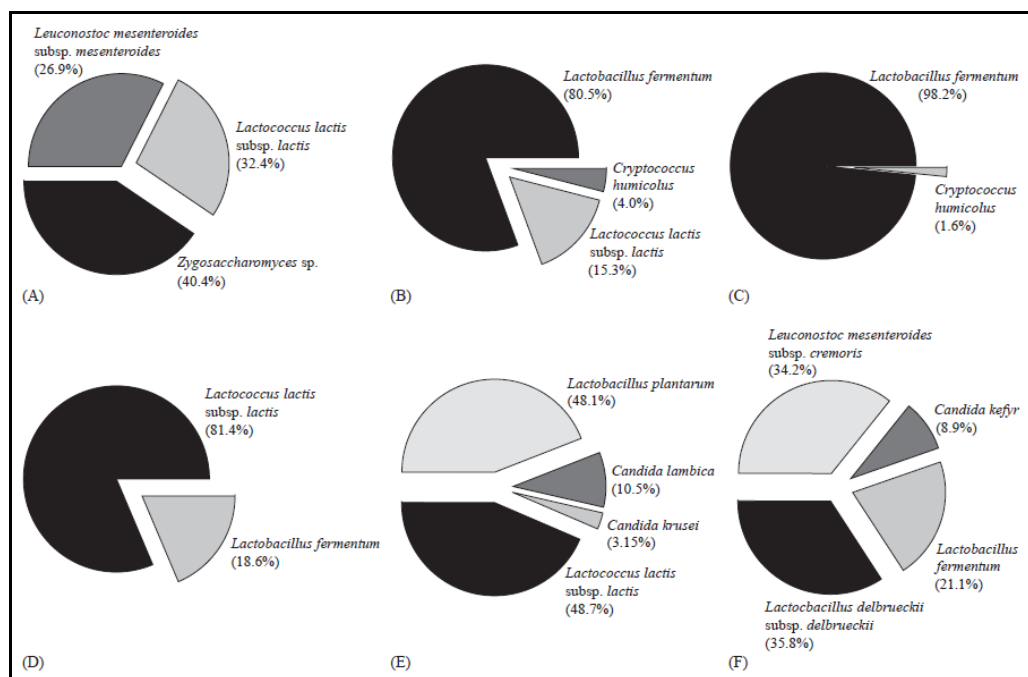
anticarcinogênico e estimulação do sistema imune (OTLES; CAGINDI, 2003; FARNWORTH, 2005; SARKAR, 2007).

O kefir, como bebida láctea fermentada, tem divulgação precária no Brasil, sua fabricação e consumo são exclusivamente artesanais, sendo obtido pela fermentação do grão em leite ou em água adicionada de açúcar mascavo. A maioria das pessoas em nosso país desconhece o produto, bem como os possíveis benefícios da inclusão deste alimento potencialmente probiótico na dieta (CARNEIRO, 2010).

A composição microbiana dos grãos de kefir varia conforme a região de origem, o tempo de utilização, o substrato utilizado para proliferação dos grãos e as técnicas usadas em sua manipulação (WITTHUHN et al., 2004). Incluem-se, na composição microbiológica do kefir, bactérias ácido lácticas, leveduras e alguns fungos miceliais (WITTHUHN et al., 2005). Estima-se que entre 65 e 80% dos micro-organismos presentes nos grãos de kefir representam o gênero *Lactobacillus* (WOUTERS et al., 2002).

Witthuhn et al. (2004) avaliaram a população microbiana em diferentes estágios da produção de kefir tradicional e kefir cultivado em massa de grãos, e os micro-organismos diferenciaram-se em relação aos dias de cultivo e aos diferentes tipos de cultivo do kefir, os resultados estão representados na Figura 1.

Figura 1 – Frequência de distribuição média da população microbiana predominante em kefir tradicional em diferentes dias (A-dia 20), (B-dia 25) e (C-dia 30), as figuras D, E e F representam o kefir cultivado em massa onde D representa dia 3, E dia 10 e F dia 30



Fonte: Witthuhn et al. (2004).

Através de sua composição microbiológica e química, o kefir pode ser considerado um produto probiótico complexo, possuindo em sua composição micro-organismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal, produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo que o consome (WESCHENFELDER et al., 2009).

Em estudo realizado por Vinderola et al. (2006), os autores observaram que diferentes componentes de kefir apresentavam substâncias bioterapêuticas orais capazes de estimular células do sistema imunológico e promover respostas imunes mediadas por células contra tumores e também contra infecções intracelulares patogênicas.

Embora a maior parte dos micro-organismos presentes nos grãos de kefir sejam representados por bactérias, as leveduras são importantes para o equilíbrio microbiológico e desenvolvimento das características físico-químicas e sensoriais do produto final. Conforme Farnworth (2005), as leveduras desempenham um papel importante na preparação de kefir, fornecendo nutrientes essenciais para o crescimento das bactérias ácido lácticas, tais como aminoácidos e vitaminas, e liberam metabólitos que contribuem para o sabor e sensação do kefir, como etanol e CO₂.

2.2 LEVEDURAS PROBIÓTICAS

O termo probiótico significa "para a vida" e é usado para nomear micro-organismos associadas a efeitos benéficos para humanos e animais (FAO/WHO 2001). A legislação brasileira define probiótico como micro-organismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo (ANVISA, 2002).

Apontamentos feitos por pesquisadores como Metchnikoff, no início do século XX, deram origem à chamada "teoria da longevidade", a qual afirmava que o consumo de leite fermentado por *Lactobacillus spp.* daria origem a competição deste micro-organismo benéfico com outras bactérias putrefativas do intestino as quais abreviariam a vida humana por produzirem substâncias tóxicas. Essa teoria foi baseada na constatação de que camponeses búlgaros tinham vida longa e sua dieta era rica em leites fermentados (VASILJEVIC; SHAH, 2008).

De acordo com McFarland (2010) as variedades de produtos probióticos são reguladas de acordo com diferentes diretrizes de acordo com as formas de uso (alimento, suplemento dietético, uso sem receita ou prescrição). Diferentes padrões de garantia de qualidade também variam com o tipo de produto, indicação para uso e país.

Os alimentos probióticos são utilizados por fornecer vários benefícios para a saúde, pois ajudam na manutenção de um bom equilíbrio e composição da flora intestinal e aumentam a resistência contra a invasão de agentes patogênicos (TRIPATHI; GIRI, 2014).

Há vários desafios na escolha do probiótico apropriado; incluindo a grande diversidade de cepas probióticas, controle de qualidade de produtos probióticos comercialmente disponíveis e provas científicas baseadas em evidências para cada doença e probiótico (MCFARLAND, 2010).

Membros do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são os principais representantes e os mais utilizados, mas não são exclusivos, e há uma grande gama de alimentos probióticos disponíveis ao consumidor (FAO/WHO 2001), como mostra a Tabela 1.

Tabela 1 – Micro-organismos usados como probióticos

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Outras BAL*	Outros
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Escherichia coli</i> strain Nissle
<i>L. casei</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. curvatus</i>	<i>B. breve</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	
<i>L. delbrueckii</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	
<i>L. farciminis</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Streptococcus diacetylactis</i>	
<i>L. fermentum</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>	
<i>L. gasseri</i>	<i>B. thermophilum</i>		
<i>L. johnsonii</i>			
<i>L. paracasei</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhamnosus</i>			

Fonte: Saad et al. (2013).

*BAL – Bactérias ácido lácticas

Os probióticos aprovados até o momento no Brasil, pela ANVISA (Agência nacional de Vigilância Sanitária) não incluem leveduras, a lista segue abaixo (ANVISA, 2002):

Lactobacillus acidophilus;

Lactobacillus casei shirota;

Lactobacillus casei var. *rhamnosus*;

Lactobacillus casei var. *defensis*;

Lactobacillus paracasei;

Lactococcus lactis;

Bifidobacterium bifidum;

Bifidobacterium animalis (incluindo a subespécie *B. lactis*);

Bifidobacterium longum;

Enterococcus faecium.

As leveduras apresentam, geralmente, maior resistência a mudanças ambientais abruptas (mudanças de pH, alterações osmóticas, etc.) do que as bactérias lácticas, também apresentam menores exigências nutricionais, o que pode gerar custos reduzidos nos processos de produção (PARDO et al., 2009).

As mesmas têm sido consideradas seguras para aplicações como probióticos (DIOSMA et al., 2014). Os parâmetros mais importantes para a seleção destes micro-organismos com potencial probiótico e *starter* devem ser os seguintes: viabilidade tecnológica (crescimento em função da temperatura, do pH, teor de sal, atividades enzimáticas e performances tecnológicas) e características funcionais (sobrevivência em pH baixo e em presença de sais biliares, resistência a antibióticos, adesão e/ou a permanência no intestino) (BEVILACQUA et al., 2009).

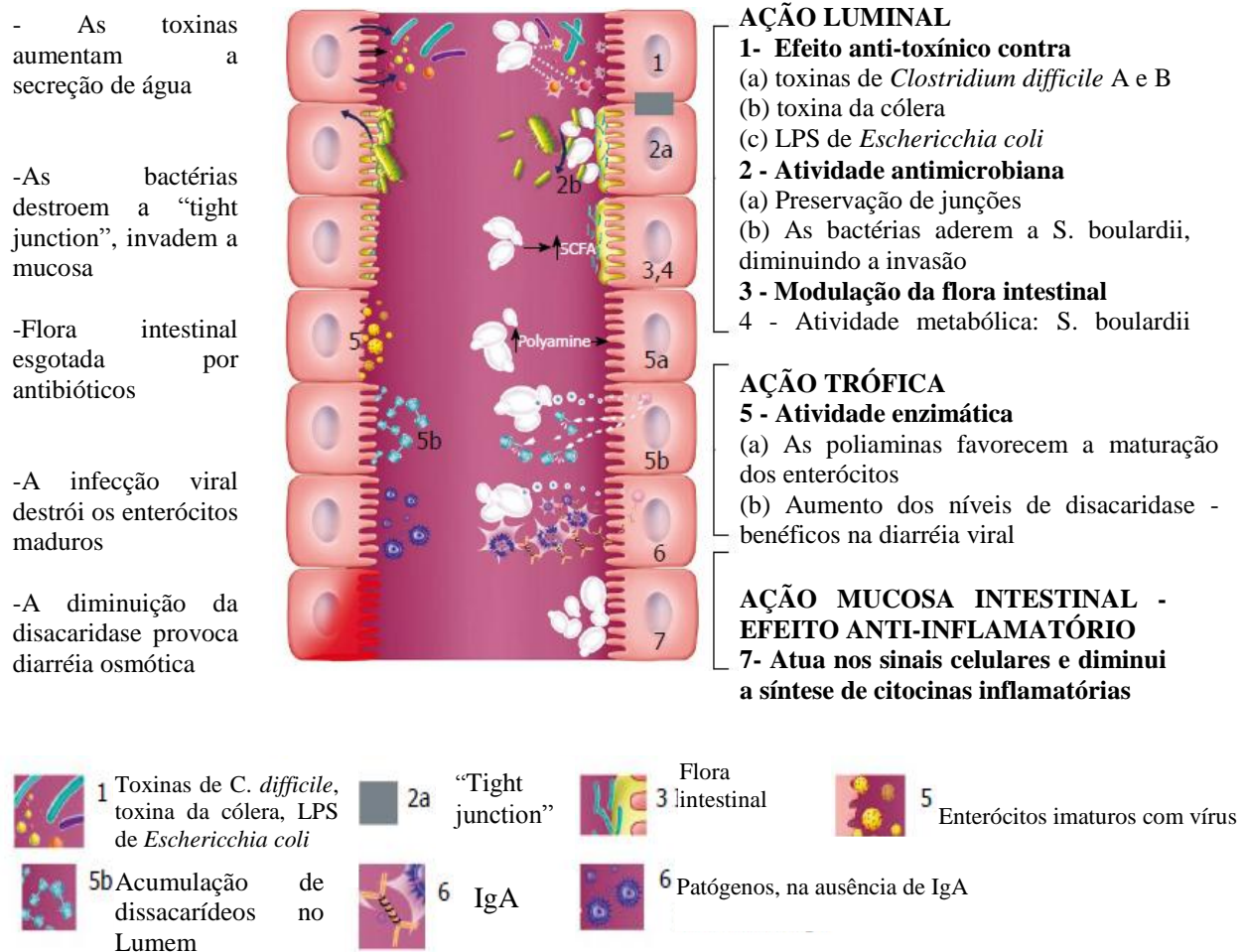
A *Saccharomyces boulardii* tem sido utilizada, como probiótico, desde a década de 50 (YI et al., 2016), sendo difundida na forma liofilizada e utilizada para a prevenção de diarreia em crianças e adultos, incluindo associada a infecção por *Clostridium difficile*.

Os principais mecanismos de ação da *S. boulardii* incluem a inibição de atividades de produtos patogênicos bacterianos, efeitos tróficos na mucosa intestinal, bem como modificação das vias de sinalização do hospedeiro envolvidas em doenças intestinais inflamatórias e não inflamatórias (POTHOULAKIS, 2010).

A levedura *Saccharomyces boulardii* é praticamente a única comercializada na medicina integrativa, sendo um dos tipos de leveduras probióticas mais estudadas, uma vez que, de 1976 a 2015, foram realizados 90 ensaios controlados com a levedura *Saccharomyces boulardii* que abrangeram 15 diferentes tipos de doenças (MCFARLAND, 2017).

A *S. boulardii* possui diversos tipos de mecanismos de ação que podem ser classificados em três áreas principais; ação luminal, ação trófica e efeitos anti-inflamatórios na mucosa intestinal, como pode ser observado na Figura 2.

Figura 2 – Esquema do trato intestinal, ilustrando os diferentes mecanismos de ação de *Saccharomyces boulardii* (Sb). À esquerda, os efeitos de diferentes micro-organismos patogênicos são retratados. À direita, sete diferentes efeitos protetores de *S. boulardii* são retratados



Fonte: McFarland (2010).

Dentro do lúmen do intestino, *S. boulardii* pode degradar toxinas de agentes patogênicos, interferir na aderência patogênica, modular a microbiota normal e preservar a fisiologia intestinal. *S. boulardii* também pode restaurar, indiretamente, o equilíbrio normal de ácidos graxos de cadeia curta, pode aumentar os níveis secretórios de IgA (imunoglobulinas) ou atuar como um regulador imunológico ao influenciar os níveis de citocinas (peptídeos que exercem a função de comunicação do sistema imunológico) (MCFARLAND, 2010).

2.3 SORVETES PROBIÓTICOS

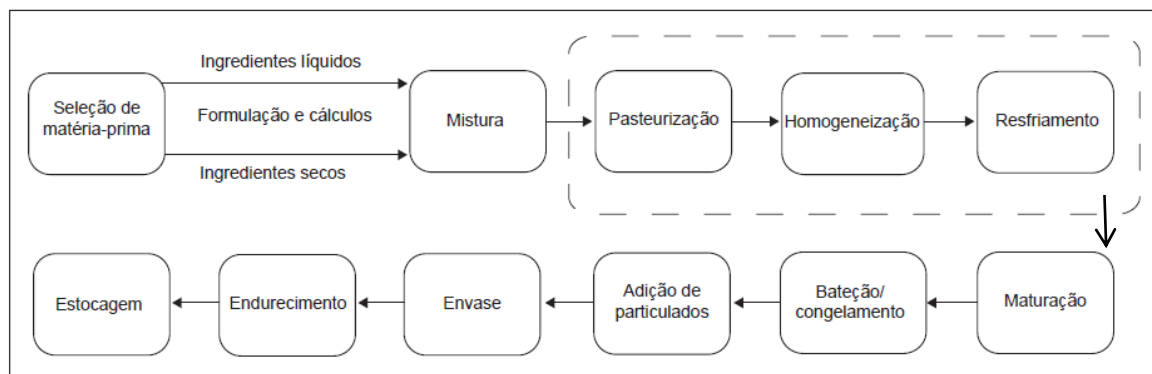
Segundo a Resolução RDC nº 266, de 22 de setembro de 2005, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) os sorvetes se enquadram dentro da legislação de gelados

comestíveis, onde são definidos como produtos congelados, obtidos a partir de uma emulsão de gorduras e proteínas; ou de uma mistura de água e açúcar(es). Podem ser adicionados de outro(s) ingrediente(s) desde que não descaracterize(m) o produto (BRASIL, 2005).

Já Ordóñez (2005) define sorvete como um preparado alimentício levado a um estado sólido, semissólido ou pastoso por congelamento simultâneo ou posterior à mistura das matérias-primas e complementa que deve-se manter o grau de plasticidade e de congelamento suficiente até o momento de sua venda ao consumidor.

A produção de gelados comestíveis aparenta ser simples, porém, alguns cuidados durante a fabricação são fundamentais, não só para a garantia da segurança do consumidor, mas também para a obtenção de um produto de qualidade (RENHE et al., 2015). O fluxograma de elaboração de gelados comestíveis pode ser visualizado na Figura 3.

Figura 3 – Fluxograma das etapas da fabricação de sorvetes



Fonte: Renhe et al. (2015).

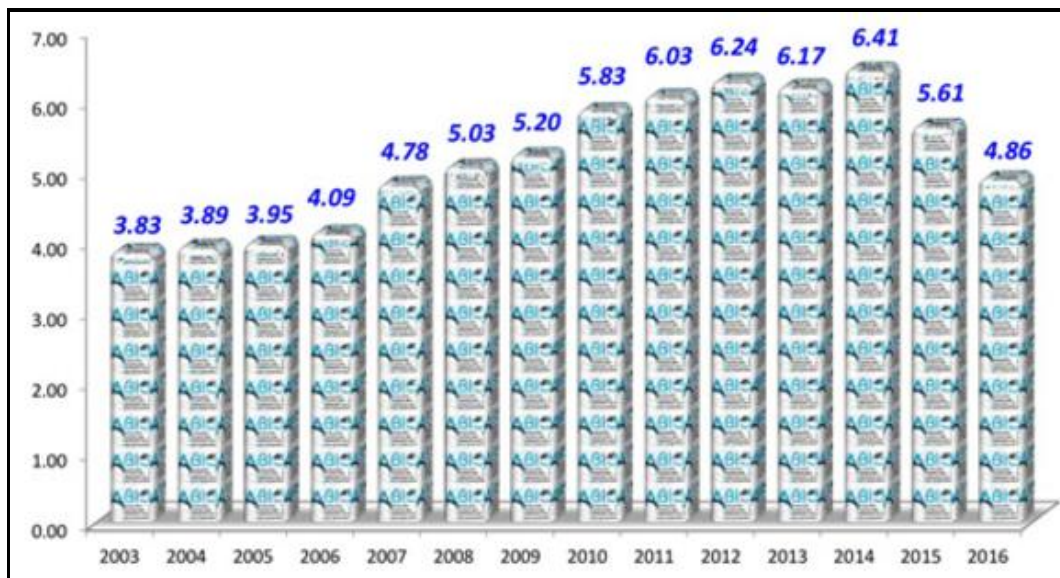
O principal ingrediente do sorvete é o leite em todas as suas formas, representando 60% da mistura. Seguem-se, em ordem de importância quantitativa, os açúcares, as gorduras, as proteínas, os estabilizantes e outros ingredientes (ORDÓÑEZ, 2005).

No Brasil, por causa das grandes quantidades de açúcar e baixos teores de sólidos lácteos no sorvete, este é, normalmente, visto como guloseima e sobremesa. Já em outros países, o sorvete é considerado um alimento rico e nutritivo, e é essa mudança de visão que deve ser trabalhada com o consumidor brasileiro (RENHE et al., 2015).

O mercado de gelados comestíveis é abrangente e, além do sorvete, contempla outros produtos, como picolés, sobremesas, tortas, bolos gelados, softs (sorvetes produzidos na hora e consumidos em redes de *fast food*), entre outros (BRASIL, 2005).

Segundo a Associação Brasileira das Indústrias e do Setor de Sorvetes (ABIS), do ano de 2003 até 2014 houve um grande aumento do consumo de sorvetes pelos brasileiros, entretanto, houve uma queda do consumo desse derivado lácteo nos anos de 2015 e 2016, sendo que, o brasileiro consumiu apenas, 4,86 litros de sorvete por ano, em 2016, o que mostra a Figura 4, entre os mais consumidos estão os sorvetes em massa (ABIS, 2016).

Figura 4 – Consumo de sorvete *per capita* em litros/ano



Fonte: ABIS - Associação Brasileira das Indústrias e do Setor de Sorvetes (2016). Disponível em: http://www.abis.com.br/estatistica_producaoconsumodesorvetesnobrasil.html. Acesso em: 04 set. 2017.

Eduardo Weisberg, presidente da ABIS relata que o consumo de sorvetes depende da região do Brasil, na Região Norte, há um consumo de 5%; no Nordeste, 19%; no Centro-Oeste, 9%; no Sudeste, 52% e no Sul 15%. Quanto maior o número de habitantes e maior o poder aquisitivo, maior a porcentagem de consumo regional (DUARTE, 2017).

Em relação às tendências de mercado os sorvetes do tipo *premium* são os mais procurados (paletas, sabores diferenciados, etc.). Sorvete com foco funcional, por exemplo, é uma tendência mundial. Trabalhar com frutas do Brasil também é uma ótima oportunidade (DUARTE, 2017).

A maioria dos probióticos são ofertados à população através de produtos alimentícios fermentados, dos quais os produtos lácteos estão entre as matrizes mais importantes (ZOOMPOPOULOU et al., 2017).

A adição de culturas probióticas em sorvetes, além de agregar valor ao alimento, poderia transformá-lo em um produto com apelo funcional, trazendo além de sabor,

benefícios à saúde do consumidor (CRUZ et al., 2011). No entanto, a adição de micro-organismos ao sorvete apresenta desafios tecnológicos, durante o processamento, pois deve-se garantir a viabilidade probiótica e a aceitação sensorial (FERRAZ et al., 2012).

O sorvete é um excelente veículo para bactérias probióticas, quando comparado aos produtos lácteos fermentados. Tal fato justifica-se pelo pH do sorvete ser maior (próximo à neutralidade) do que de leites fermentados e iogurtes (pH 4,6), que são os alimentos mais utilizados como probióticos, e constitui uma vantagem importante em relação a outros produtos lácteos, uma vez que pH baixo pode afetar a sobrevivência das bactérias probióticas (RANADHEERA et al., 2012).

Por outro lado, o fato do congelamento e descongelamento do sorvete pode afetar, de maneira negativa, a sobrevivência desses micro-organismos nesse derivado lácteo (ABGHARI et al., 2011).

Tendo em vista estes fatos, inúmeras pesquisas estão relacionadas à sobrevivência de probióticos em sorvetes, como pode ser observado em estudos realizados por Alamprese et al. (2002, 2005); Basyigit et al. (2006); Homayouni et al. (2008); Mohammadi et al. (2011); Da Silva et al. (2014); Ferraz et al. (2012); Cruxen e Hoffmann (2017); Parussolo et al. (2017); Nadelman et al. (2017); Chaikham e Rattanasena (2017); Góral et al. (2018), entre outros.

Os estudos citados anteriormente avaliaram a introdução e sobrevivência de micro-organismos probióticos em sorvetes, entretanto, em nenhum deles, é utilizado levedura probiótica, com isso idealizou-se nesta pesquisa a aplicação da levedura probiótica, utilizada desde os anos 50 (YI et al., 2016), como micro-organismo para a elaboração de um sorvete probiótico.

3 DESENVOLVIMENTO

O desenvolvimento desta Tese foi dividido em três manuscritos, apresentados na forma de artigos científicos e considerações finais.

3.1 MANUSCRITO 1

Artigo intitulado “Leveduras: diversidade em kefir, potencial probiótico e possível aplicação em sorvete.” Tendo como autores: Daniela Buzatti Cassanego, Neila Silvia Pereira dos Santos Richards, Marcio Antonio Mazutti e Maurício Ramírez-Castrillón. Publicado na revista *Ciência e Natura*, Santa Maria v.37 Ed. Especial - Nano e Microencapsulação de compostos bioativos e probióticos em alimentos, p. 175 – 186, 2015.

Revista do Centro de Ciências Naturais e Exatas – UFSM. ISSN impressa: 0100-8307
ISSN on-line: 2179-460X. DOI:10.5902/2179-460X19749

3.2 MANUSCRITO 2

Artigo aceito para a publicação na revista *Food Science and Technology*, “Identification by PCR and evaluation of probiotic potential in yeast strains found in kefir samples in the city of Santa Maria, RS, Brazil.” Com autoria de Daniela Buzatti Cassanego, Neila Silvia Pereira dos Santos Richards, Patrícia Valente, Marcio Antonio Mazutti e Maurício Ramírez-Castrillón.

3.3 MANUSCRITO 3

Artigo em fase final de revisão, escrito por Daniela Buzatti cassanego e Neila Silvia Pereira dos Santos Richards, tendo como título: “Adição e estudo da sobrevivência de *Saccaromyces boulardii* em sorvete probiótico.”

3.1 MANUSCRITO 1

Formatado conforme as normas da revista Ciência e Natura.

Artigo Original

DOI:10.5902/2179-460X19749

Ciência e Natura, Santa Maria v.37 Ed. Especial-Nano e Microencapsulação de compostos bioativos e probióticos em alimentos, 2015, Dez. p. 175 – 186
Revista do Centro de Ciências Naturais e Exatas - UFSM
ISSN impressa: 0100-8307 ISSN on-line: 2179-460X

CIÊNCIA e NATURA 35 anos

Leveduras: diversidade em kefir, potencial probiótico e possível aplicação em sorvete.

Yeasts: Diversity in Kefir, probiotic potential and possible use in ice cream.

Daniela Buzatti Cassanego¹, Neila Silvia Pereira dos Santos Richards²,
Marcio Antonio Mazutti³, Maurício Ramírez-Castrillón⁴

¹Doutoranda, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.
danybuzatti@yahoo.com.br

^{2,3,4}Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.
neilarichardsprof@gmail.com; marciomazutti@gmail.com; mauriciogeteg@gmail.com

Recebido: 30/09/2015 Aceito: 13/10/2015

* danybuzatti@yahoo.com.br

Cassanego et al.: Leveduras: diversidade em kefir, potencial probiótico e possível aplicação em sorvete.

Resumo: O kefir é um produto elaborado a partir da fermentação simbiótica de diferentes micro-organismos, resultando em um produto com características microbiológicas, físico-químicas e sensoriais inigualáveis. Bactérias, principalmente as do gênero *Lactobacillus*, e leveduras são os principais micro-organismos que dão origem a este produto. Os gêneros *Kluyveromyces* e *Saccharomyces* são os maiores representantes das leveduras encontradas na microbiota do kefir. Em relação ao potencial probiótico das leveduras, a única comercializada, em forma de medicamento via oral, é a *Saccharomyces boulardii*, entretanto, pesquisas vêm demonstrando que outros gêneros, outras espécies e novas cepas de leveduras também apresentam promissor potencial probiótico, porém as pesquisas não relatam a aplicação destas novas leveduras probióticas em alimentos. O objetivo desta revisão envolveu a realização de uma revisão bibliográfica sobre diferentes espécies e cepas de leveduras encontradas em amostras de kefir por diferentes autores à nível mundial. O potencial probiótico de leveduras também foi estudado, bem como a potencialidade de micro-organismos probióticos serem adicionadas ao sorvete. Com conclusão pode-se afirmar que inúmeras cepas de leveduras estão presentes no complexo simbiótico do kefir e, alguma destas possivelmente apresente potencial probiótico, podendo ser incorporada á sorvetes, uma vez que o alimento tem ampla aceitação de consumo e não utiliza o processo de fermentação na sua elaboração.

Palavras-chave: kefir, leveduras, probiótico, *Saccharomyces boulardii*, sorvete.

Abstract: Kefir is a product made by the symbiotic fermentation of different microorganisms, resulting in a product with microbiological characteristics, physicochemical and sensory unparalleled. Bacteria, mainly of the genus *Lactobacillus*, and the yeasts are the main microorganisms that give rise of this product. The genres *Kluyveromyces* and *Saccharomyces* are the largest representatives of the yeasts found at Kefir's microbiot. In relation of the probiotic potential of the yeasts, the one sold in drug form by mouth, is the *Saccharomyces boulardii*, however, researches are showing that other genres, other species and new strains of yeasts also had promising probiotic potential, but the researches don't tell the application of this new probiotic yeasts in food. The aim of this review involved the achievement of a bibliographic review about different species and strains of yeasts found at Kefir's samples by different authors at the global level. The probiotic potential of yeasts was also studied, as well as the capability of probiotic microorganisms being added to ice cream. With conclusion it can be said that countless strains of yeasts are present in the Kefir's symbiotic complex and, some of this possibly submit probiotic potential, that could being incorporated into ice cream, once the food have wide consumer acceptance and don't uses the fermentation process in it's preparation.

Key-words: kefir, yeast, probiotic, *Saccharomyces boulardii*, ice cream.

1. Introdução

O kefir é uma solução viscosa, acidificada e ligeiramente alcoólica, produzido através da fermentação de leite por meio de grãos como cultura starter (FAO/WHO, 2003).

Os principais produtos finais da fermentação do kefir são o ácido láctico, acetaldeído, etanol, acetoína, diacetil e dióxido de carbono (ERTEKIN & GUZEL-SEYDIM, 2009; FERREIRA et al., 2010), esta diversidade refere-se ao fato do produto ser elaborado a partir da relação simbiótica de bactérias ácido lácticas (BAL), ácido acéticas e leveduras, sendo também, considerado um recurso probiótico e com elevado valor nutricional (YANG et al., 2008).

Existem várias definições para o termo probiótico, porém, a mais aceita é de que são micro-organismos vivos, os quais administrados em quantidades adequadas conferem benefícios á saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002).

Os probióticos também têm sido associados a prevenção de câncer através de mecanismos como a estimulação do sistema imunológico, diminuindo a incidência de infecções, regulando a inflamação intestinal e a ligando-se a compostos tóxicos (MALEKI et al., 2016).

A maioria dos probióticos são bactérias, sendo que as bactérias ácido lácticas (BAL) são as mais conhecidas e utilizadas em muitos alimentos, tais como leites fermentados, queijos e alimentos à base de vegetais (CHEN et al., 2014).

Cepas probióticas de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Saccharomyces* possuem um extenso histórico de segurança para o seu consumo pela população saudável, de modo geral, sendo consideradas GRAS (General Recognized as Safe) (SAAD et al., 2011).

Saccharomyces boulardii é praticamente a única levedura comercializada na medicina com função probiótica (MARTINS et al., 2005a), entretanto, outras leveduras de origem ambiental ou agroindustrial com propriedades bioterapêuticas similares ou até melhores, certamente existem, principalmente considerando a biodiversidade encontrada nos ecossistemas microbianos brasileiros (MARTINS et al., 2005b).

McFarland (2010) afirma que outras cepas de *Saccharomyces* podem conter propriedades probióticas, mas evidências clínicas da eficácia para outras cepas de leveduras ainda são deficientes.

No caso das leveduras, a capacidade de aglutinar patógenos, resistir ao pH ácido e aos sais biliares do trato gastrointestinal estão entre os mais importantes critérios para sua pré-seleção como probióticos (GARCÍA-HERNÁNDEZ et al., 2012).

O veículo alimentício escolhido para a incorporação de cepas probióticas deve ser cuidadosamente estudado, particularmente em relação aos produtos fermentados, os quais a multiplicação de micro-organismos probióticos pode resultar em características não peculiares ou mesmo indesejáveis ao produto (KOMATSU, et al. 2008).

Apesar do congelamento e descongelamento causar injúrias às células dos micro-organismos probióticos, Saad e colaboradores (2011), afirmaram que a incorporação de bactérias probióticas em sorvetes é vantajosa, pelo fato dessa categoria de alimentos ser rica em nutrientes e consumida pelo público em geral, porém, esse produto não é consumido diariamente, e o lançamento de sorvetes probióticos deve ser seguido a campanhas educacionais, no sentido de estimular o consumo constante dos mesmos (CRUZ et al., 2009).

Tendo em vista estes fatos e o interesse pelo estudo de probióticos, o artigo teve como objetivo a realização de uma revisão bibliográfica envolvendo a diversidade

das leveduras presentes em kefir, o estudo do potencial probiótico de diversas cepas de leveduras e a possível aplicação das mesmas na matriz sorvete.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Kefir

O consumo do kefir é estimulado pela sua longa história de efeitos benéficos à saúde (CHIFIRIUC et al., 2011), o alimento ocupa um importante lugar na dieta humana, principalmente no Sudoeste da Ásia, Europa America do Norte, Japão, Oriente Médio, África do Norte e Rússia (SARKAR, 2007). No Brasil, o kefir ainda é pouco conhecido, sendo elaborado à nível caseiro, principalmente por descendentes de países onde seu consumo é tradição (FARNWORTH, 2005; MIGUEL et al., 2010).

A origem do kefir ainda é incerta, autores afirmam que trata-se de uma bebida originária das montanhas do Cáucaso (WITTHUHN et al., 2005; LOPITZ-OTSOA et al., 2006), entretanto o kefir pode ter surgido, independentemente, em diferentes regiões, resultando populações microbianas específicas e distintas, que produziam bebidas com diferentes propriedades sensoriais e microbiológicas (MIGUEL et al., 2010). Em estudo realizado por Yang et al. (2014), foram encontrados vestígios de kefir em tumbas no cemitério de Xiaohe na China, os autores evidenciaram a utilização do kefir nos anos de 1980-1450 A.C., no estudo, há relatos que as tribos locais consumiam o kefir como uma alternativa ao leite, já que as mesmas apresentavam intolerância à lactose.

Wang et al. (2012) investigaram os micro-organismos envolvidos na biossíntese do grão de kefir em Taiwan, os resultados demonstraram que a formação do grão começou com a auto-agregação de *Lactobacillus kefirianofaciens* e *Saccharomyces turicensis*, resultando em pequenos grânulos, a partir daí o *Lactobacillus kefir* aderiu-se à superfície dos grânulos, co-agregando-se com outros micro-organismos e

componentes no leite, para formar os grãos de maior diâmetro. Em sub-cultura, mais organismos anexam-se aos grãos, resultando em crescimento do mesmo.

Geralmente, o kefir é elaborado a partir de leite de vaca, porém muitos tipos de leites, tais como cabra, ovelha, égua, búfala e camela também podem ser utilizados (SURIASIH et al., 2012).

Tamime et al. (2001) relataram diferenças significativas nas quantidades de sólidos totais, proteínas, carboidratos e cinzas entre kefir elaborados com diferentes tipos de leites (caprino, bovino e ovino) sendo que a maior diferença foi encontrada em relação às proteínas, de forma que o kefir de leite ovino apresentou o maior teor proteico entre as bebidas avaliadas no estudo. Há relatos que o kefir possui $1,98 \text{ g.L}^{-1}$ de dióxido de carbono e 0,48% de álcool, sendo que o conteúdo de CO_2 aumenta com a elevação da concentração de grãos de kefir (SARKAR, 2007).

O kefir é o único produto lácteo cultivado devido a combinação de fermentação láctica e alcoólica (TAS et al., 2012), sendo elaborado a partir da atividade microbiológica dos “grãos de kefir” (GUZEL-SEYDIM et al., 2011), segundo Plessas et al. (2005) os grãos podem ser definidos como aglomerados de micro-organismos, onde os mesmos são mantidos unidos por uma matriz de polissacárideo e apresentam uma relação simbiótica entre bactérias e leveduras (LOPITZ-OTSOA et al., 2006).

Nambou et al. (2014) realizaram estudo no qual combinaram seis espécies de micro-organismos isolados para a elaboração de kefir, os resultados indicaram que apenas algumas das culturas iniciadoras concebidas eram consistentes com a produção de bebidas com características aproximando-os de kefir tradicional como relatado na literatura, confirmando que, embora métodos utilizando cultura iniciadora composta por bactérias e leveduras isoladas e selecionadas para a produção de kefir tenham sido sugeridos (SARKAR, 2007) até hoje, a reconstrução de grãos de kefir de leite a partir de uma mistura de isolados microbiológicos não foi

possível, demonstrando que a relação simbiótica dos grãos de kefir é de fundamental importância para o desenvolvimento da bebida (STADIE et al. 2013).

A composição microbiana dos grãos de kefir varia conforme a região de origem, o tempo de utilização, o substrato utilizado para proliferação dos grãos e as técnicas usadas em sua manipulação (WITTHUHN et al., 2004). Incluem-se, na composição microbiológica do kefir, bactérias ácido lácticas, leveduras e alguns fungos miceliais (WITTHUHN et al., 2005), estima-se que entre 65 e 80% dos micro-organismos presentes nos grãos representam o gênero *Lactobacillus* (WOUTERS et al., 2002).

Embora a maior parte dos micro-organismos presentes nos grão de kefir sejam representados por bactérias, as leveduras são importantes para o equilíbrio microbiológico e desenvolvimento das características físico-químicas e sensoriais do produto final. Conforme Farnworth (2005) as leveduras desempenham um papel importante na preparação de kefir, fornecendo nutrientes essenciais para o crescimento das bactérias ácido lácticas, tais como aminoácidos e vitaminas, e liberando metabólitos que contribuem para o sabor e sensação do kefir, como etanol e CO₂.

Análises da microbiota de três diferentes kefir do Brasil, por PCR-DGGE, realizadas por Leite et al. (2012) mostraram que *Lactobacillus kefiranofaciens* e *Lactobacillus kefiri* foram as espécies de bactérias mais encontradas nas três amostras e que a comunidade de leveduras foi majoritariamente representada pela *Saccharomyces cerevisiae*.

Outro estudo, também realizado no Brasil, com objetivo de identificar o perfil microbiológico de uma amostra de Kefir cultivada em solução aquosa de açúcar mascavo encontrou as seguintes espécies de leveduras: *S. cerevisiae*, *Candida colliculosa*, *Toruspola delbruechii*, *Candida inconspicua*, *Candida magnoliae*, *Kloekera* sp.,

Candida famata, *Kluyveromices lactis*, *K. marxianus* e *Candida kefir* (BERGMANN et al., 2010).

Uraz et al. (2012) isolaram leveduras provenientes do kefir da Turquia, encontraram, ao total, 66 diferentes espécies destes micro-organismos sendo que 51% das leveduras encontradas eram da espécie *Candida kefir*, 33% representavam a espécie *Candida famata* e apenas 2% das leveduras presentes no kefir avaliado eram da espécie *S. cerevisiae*. Outro trabalho realizado identificando micro-organismos provenientes do kefir em regiões diferentes da Turquia encontrou as espécies *K. marxianus* e *K. dobzhanskii* como maiores representantes das leveduras (TAS et al., 2012), *K. marxianus* foi a espécie de levedura mais encontrada, também, em kefir Tibetano (JIANZHONG et al., 2009).

Autores isolaram e identificaram micro-organismos presentes em kefir de Bali, em um total de 115 isolados, 68,7% representavam as bactérias ácido lácticas e 31,3% eram as leveduras, sendo a *Candida famata* a maior representante das mesmas (SURIASIH et al., 2012).

A diversidade microbiana de kefir elaborado a partir de uma mistura de água, figos desidratados, limão e sacarose foi estudada por Gulitz et al. (2011), os autores encontraram a levedura *Zygorulaspora florentina* como sendo a predominante nesse tipo de cultivo.

Através de sua composição microbiológica e química, o kefir pode ser considerado um produto probiótico complexo, possuindo em sua composição micro-organismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal, produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo que o consome (WESCHENFELDER et al., 2009).

Diversos estudos confirmam os efeitos benéficos do kefir, como a capacidade de modular a resposta imune da mucosa intestinal em ratos, aumento da atividade fagocitária de macrófagos peritoneais e pulmonares e, além disso, capacidade de

umentar a imunidade da mucosa em locais distantes (tecido dos brônquios) (VINDEROLA et al., 2005a; VINDEROLA et al., 2005b). Em trabalho também realizado por Vinderola et al. (2006), os autores observaram que diferentes componentes de kefir apresentavam um papel *in vivo*, como substâncias bioterapêuticas orais capazes de estimular células do sistema imunológico e promover respostas imunes mediadas por células contra tumores e também contra infecções intracelulares patogênicas.

Uma grande variedade de micro-organismos com potencial de utilização como probióticos têm sido isolados de grãos de kefir, porém, bactérias são as mais estudadas (GOLOWCZYC et al., 2011).

Entretanto, Romanin et al. (2010) avaliaram a atividade antiinflamatória de 21 leveduras, sendo que as dos gêneros *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* e *Issatchenkia*, isoladas do kefir, foram 100% eficientes para a inibição da inflamação no epitélio intestinal, confirmando a importância em se estudar as leveduras que fazem parte da flora microbiana do kefir.

Leveduras isoladas de Kefir Argentino foram identificadas e avaliadas em relação ao seu potencial probiótico, 34 estirpes foram isoladas e identificadas por meio de métodos microbiológicos clássicos e genética molecular clássica, destas, 13 isolados apresentaram-se resistentes aos sais biliares. Além da resistência, *K. marxianus* CIDCA 8154 e *S. cerevisiae* CIDCA 8112 também apresentaram capacidade de adesão às células epiteliais do intestino e a sobreviver à passagem através do trato gastrointestinal de ratos Balb/c. Os autores concluíram que mais estudos devem ser realizados, mas os resultados obtidos devem, no entanto, ser útil para o desenvolvimento de novos produtos probióticos com base nas diferentes cepas de levedura isoladas de kefir (DIOSMA, et al. 2013).

2.2 Leveduras probióticas

Os primeiros relatos clínicos na literatura para a aplicação de probióticos foram feitos em relação ao tratamento de doenças infecciosas, de origem viral ou bacteriana, diarreia associada a antibióticos, alívio de doenças inflamatórias intestinais crônicas, imuno-modulação, redução do colesterol, diminuição do risco de câncer de cólon, melhora na digestão da lactose, redução de alergias, e efeito sobre a microbiota intestinal (SAAD et al., 2013).

Dentre os probióticos, as bactérias ácido lácticas (BALs), como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, compreendem os gêneros de micro-organismos mais importantes e estudados, porém algumas leveduras como *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces boulardii* também podem ser utilizadas para essa finalidade (SAAD et al., 2013).

Nas últimas décadas, as leveduras têm sido consideradas como um dos micro-organismos que apresentam potencial probiótico, porém, apresentando foco maior na produção animal (FLEET, 2007; JACQUES & CASAREGOLA, 2008). As leveduras são micro-organismos eucarióticos unicelulares que podem ser isoladas de muitos alimentos (ARROYO-LÓPEZ et al., 2012).

Os parâmetros mais importantes para a seleção de leveduras com potencial probiótico e starter devem ser os seguintes: viabilidade tecnológica (crescimento em função da temperatura, do pH, teor de sal, atividades enzimáticas e performances tecnológicas) e características funcionais (sobrevivência em pH baixo e em presença de sais biliares, resistência a antibióticos, adesão e/ou a permanência no intestino) (BEVILACQUA et al., 2009).

A levedura *Saccharomyces boulardii* é a representante mais importante destes micro-organismos probióticos, sendo uma das primeiras e praticamente a única comercializada na medicina humana, onde é utilizada na forma liofilizada (PERITI & TONELLI, 2001). Esta levedura foi descoberta por um microbiologista francês, Henri Boulard em 1920, quando estava na Indo-China em busca de novas linhagens de

leveduras que poderiam ser utilizadas em processos fermentativos. O pesquisador, durante um surto de cólera na região, notou que algumas pessoas bebiam um chá especial e não desenvolviam a doença. Esse chá era elaborado com frutas, Lichia e manga, na qual micro-organismos foram isolados e, uma nova linhagem de levedura foi encontrada, sendo então, denominada *Saccharomyces boulardii* (MCFARLAND, 2010).

A levedura *S. boulardii* tem sido utilizada há anos como agente bioterapêutico, administrado via oral, no tratamento de uma gama de distúrbios diarreicos tais como a diarreia associada ao uso de antibióticos, gastroenterite aguda em adultos e crianças, diarreia em pacientes alimentados por sonda, diarreia crônica em pacientes HIV-infectados e, tem sido considerado útil contra agentes enteropatógenos (MARTINS et al., 2005a; CZERUCKA et al. 2007; FLEET, 2007; PENNACCHIA et al., 2008). Alguns dos exemplos de ação da *S. boulardii* é no lúmen intestinal, onde a mesma tem a capacidade de interferir em toxinas patogênicas, preservar a fisiologia celular, interferir com o patógeno, interagir com microbiota normal ou ajudar no restabelecer os níveis de ácidos graxos de cadeia curta. A *S. boulardii* também pode atuar como um imune regulador, tanto dentro do lúmen como sistemicamente (MCFARLAND, 2010).

Pesquisas recentes, realizadas no Brasil, demonstraram o efeito positivo do uso de *S. boulardii* na recuperação de ratos infectados com doenças parasitárias como a toxocaríase (ÁVILA et al., 2012).

Martins et al. (2013) avaliaram a proteção da levedura *S. boulardii* contra *Salmonella typhimurium*, os resultados mostraram que a levedura pode ser útil como adjuvante em ratos doentes, infectados com febre tifóide, mesmo quando iniciada após o aparecimento da doença, uma possibilidade que deve ser testada em ensaios clínicos bem controlados.

Outras aplicações da levedura *S. boulardii* estão sendo avaliadas; estudo recente demonstrou a capacidade de microencapsulação de proteína de soro contendo *S. boulardii*, por spray dryer, o resultado positivo desta técnica demonstra alto potencial de sobrevivência da levedura estudada, bem como o posterior uso destas microcápsulas em alimentos (DUONGTHINGOC et al, 2013).

Thomas et al. (2014) encapsularam *S. boulardii* através da técnica camada por camada (*layer-by-layer*), utilizando polieletrólitos de cargas opostas, quitosana e sulfato de dextrano para proteger a levedura da degradação durante seu trânsito gastro-intestinal. Os resultados demonstraram que a técnica de encapsulação utilizada apresentou proteção eficaz e pode ser potencialmente utilizada para melhorar aplicações terapêuticas da levedura.

Embora a maioria dos estudos estejam relacionados à levedura *S. boulardii*, Martins et al. (2005b) asseguraram que outras linhagens de *Saccharomyces* spp. ou outros gêneros de leveduras devem, provavelmente, possuir atividade probiótica similar ou melhor que a *S. boulardii*. Arroyo-López et al. (2012) afirmaram que atualmente existe um grande interesse em encontrar outras cepas de leveduras com características probióticas.

Estudos vêm demonstrando que diferentes gêneros de leveduras apresentam potencial probiótico, García-Hernández et al. (2012) estudaram o potencial probiótico, *in vitro*, de nove leveduras isoladas a partir da excreta de frangos, os resultados provaram que a levedura *Wickerhamomyces anomalus* LV-6 apresentou potencial probiótico em relação aos testes realizados.

Pedersen et al. (2012) identificaram e avaliaram o potencial probiótico de leveduras isoladas de “fura”, um cereal fermentado da África. Avaliou-se a sobrevivência das leveduras em sais biliares, pH baixo, crescimento em células epiteliais e a resistência elétrica transepitelial e, como resultado, novas leveduras com potencial probiótico foram encontradas no estudo, sendo que as espécies avaliadas e

caracterizadas como probióticas foram a *Candida krusei*, *Kluyveromyces marxianus*, *Candida tropicalis*, *Candida rugosa* e *Trichosporon asahii*.

Silva et al. (2011) avaliaram o potencial probiótico de leveduras isoladas de azeitonas portuguesas sendo que as espécies *Pichia membranaefaciens* e *Candida oleophila* apresentaram resultados satisfatórios, demonstrando-se como as leveduras mais promissoras e como possíveis probióticos no estudo.

Uma nova linhagem de *S. cerevisiae*, denominada como UFMG 905, foi isolada da cachaça brasileira e avaliada em relação ao seu potencial probiótico por Martins et al. (2005b), os resultados demonstraram que a levedura foi capaz de colonizar e sobreviver no trato gastrointestinal de ratos e protegê-los contra infecções experimentais por *Salmonella enterica* sorotipo *typhimurium* e *Clostridium difficile*. Posteriormente, em novo estudo realizado pelos mesmos autores, resultados mostraram que *S. cerevisiae* UFMG 905 foi capaz de reduzir a translocação de *Salmonella typhimurium* e estimular o sistema imunológico de ratos (MARTINS et al., 2007).

Perricone et al. (2014) isolaram leveduras provenientes de Altamura (região sul da Itália) e, resultados satisfatórios foram encontrados quando os autores testaram a capacidade probiótica das mesmas, 18 isolados foram submetidos à seleção para verificar suas características probióticas (sobrevivência em pH 2,5 enriquecido com sais biliares, resistência à antibióticos, atividade antimicrobiana para patógenos de origem alimentar, propriedades hidrofóbicas e produção de biofilme), entretanto, apenas dois isolados (*Saccharomyces cerevisiae* estirpe 2 e *Saccharomyces cerevisiae* estirpe 4) foram selecionados e avaliadas em relação a simulação do trânsito gastrointestinal, estes isolados mostraram uma tendência semelhante à *S. boulardii* em relação ao seu potencial probiótico.

Os resultados satisfatórios das avaliações de novas leveduras com potenciais probióticos demonstram uma nova tendência de mercado em relação à estes micro-

organismos, entretanto, a maioria das pesquisas não contemplam uma adequada aplicação destes novos probióticos em alimentos.

2.3 Sorvete

Devido ao grande interesse na utilização de probióticos hoje em dia e, também, pelo estímulo da Organização Mundial da Saúde na utilização dessa alternativa ao uso dos antibióticos, grandes laboratórios e centros de pesquisas vem investindo nesta linha de pesquisa (MARTINS et al., 2013).

Derivados lácteos, como iogurtes e leites fermentados, constituem 90% dos produtos no mercado probiótico (COUSIN et al., 2012). No entanto, novos produtos estão sendo introduzidos no mercado internacional como fontes de probióticos, sobremesas à base de leite, leite em pó para recém-nascidos, sorvetes, manteiga, maionese, vários tipos de queijos, produtos sob a forma de cápsulas ou em pó para ser dissolvido em bebidas geladas e alimentos fermentados de origem vegetal são alguns exemplos de alimentos que podem conter probióticos (CHAMPAGNE et al., 2005; KOMATSU et al., 2008; SAAD, 2006).

Vários fatores que afetam a viabilidade dos probióticos têm sido relatados em produtos lácteos fermentados, incluindo a acidez titulável, o valor de pH e peróxido de hidrogênio, concentração de oxigênio dissolvido, temperatura de armazenamento, a interação com outros micro-organismos contidos nos produtos, a concentração de ácido láctico e acético, além da concentração de proteínas (CASTRO-CISLAGHI et al., 2012).

A recomendação brasileira para alimentos probióticos baseia-se na porção diária de micro-organismos viáveis que devem ser ingeridos, sendo o mínimo estipulado de 10^8 a 10^9 UFC (unidade formadora de colônia) (ANVISA, 2008).

Para a obtenção desse valor, as leveduras podem ser administradas liofilizadas, sendo as mesmas rapidamente eliminadas após interrupção da terapia e

não são afetadas pelo uso de medicamentos antibacterianos, sendo estas, as vantagens de se trabalhar com esse tipo de micro-organismo (MARTINS et al., 2005).

Outra alternativa é a microencapsulação desses micro-organismos, em estudo realizado por Arslan et al. (2015) os autores testaram a microencapsulação da levedura *Saccharomyces boulardii* com seis diferentes materiais de parede (gelatina, concentrado proteico de soro de leite, amido modificado, maltodextrina, isolado de proteína de ervilha e goma arábica) e em temperaturas diferenciadas, os resultados mostraram que o maior rendimento de produto foi obtido com concentrado proteico de soro e goma arábica. A sobrevivência da *S. boulardii* não se alterou com os materiais de parede, a sobrevivência em um teste de solução gástrico simulado a diferentes níveis de pH e durações mostrou que a goma arábica é o melhor material de parede, seguido por gelatina e proteína de ervilha. As microcápsulas produzidas pelo valor mais elevado da temperatura de secagem (125 ° C) apresentaram uma resistência mais elevada à solução gástrica do que aqueles da temperatura de secagem inferior (80 ° C).

A matriz de sorvete pode ser um bom veículo para culturas probióticas, devido à sua composição, que inclui proteínas do leite, gorduras e lactose, bem como outros compostos (vitaminas e sais minerais). Além disso, o fato de ser um produto congelado certamente contribui para a viabilidade dos micro-organismos (CRUZ et al., 2009).

Pesquisas vêm demonstrando que o sorvete pode ser um veículo adequado para micro-organismos probióticos, um exemplo são os estudos realizados por Alamprese et al. (2002, 2005) onde avaliaram a influência de *Lactobacillus johnsonii* La1 e de *L. rhamnosus* GG em sorvetes com diferentes formulações, com variações nas quantidades de açúcar e de gordura. Elevadas taxas de sobrevivências dos probióticos durante o armazenamento dos produtos foram encontradas, por, respectivamente, oito meses e 365 dias, sem decréscimo na população inicialmente

inoculada (7 e 8 log UFC g⁻¹, respectivamente). As propriedades tecnológicas não foram influenciadas pela presença dos probióticos em ambos os estudos.

Basyigit et al. (2006) também estudaram o sorvete como veículo de probióticos, os autores testaram uma mistura de cepas de *Lactobacillus acidophilus*, *L. agilis* e *L. rhamnosus* de origem humana e verificaram que a viabilidade dos probióticos não foi alterada durante o armazenamento de sorvete, por até seis meses, independentemente da presença de açúcar ou aspartame como edulcorantes.

Homayouni et al. (2008) elaboraram dois tipos de sorvetes simbióticos contendo *Lactobacillus casei* (Lc-01) e *Bifidobacterium lactis* (Bb-12) na forma livre e encapsulada. Os resultados mostraram que quando as bactérias probióticas foram encapsuladas houve um aumento de 30% na sobrevivência dos probióticos quando comparadas com os micro-organismos livres, durante o mesmo período de armazenamento na mesma temperatura.

Em trabalho realizado por Silva et al. (2015) as características físico-químicas, comportamento fusão e propriedades sensoriais de sorvete de leite de cabra produzidos com e sem a bactéria probiótica *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BLC1 foram analisados, após 120 dias de armazenamento congelado, uma taxa de sobrevivência de 84,7% das bactérias foi registrado, os autores concluíram que o sorvete de leite de cabra é um veículo adequado para a entrega probiótico *B. animalis* bactérias..

Aliados a este aspecto, a ampla aceitação dos sorvetes, tanto por parte do público infantil, infante-juvenil e adulto quanto do público da terceira idade, e o crescimento do seu consumo interno, estimulam a continuidade de estudos visando ao desenvolvimento de sorvetes funcionais (CRUZ et al., 2011).

2. Declaração de Direito Autoral

Declaramos que o presente artigo é original e não foi submetido à publicação em qualquer outro periódico nacional ou internacional, quer seja em parte ou na íntegra. Declaramos ainda, que após publicado pela Ciência e Natura, ele jamais será submetido a outro periódico. Também temos ciência que a submissão dos originais à Ciência e Natura implica transferência dos direitos autorais da publicação digital e impressa e, a não observância desse compromisso, submeterá o infrator a sanções e penas previstas na Lei de Proteção de Direitos Autorais (nº9610, de 19/02/98).

3. Política de Privacidade

Os nomes e endereços informados nesta revista serão usados exclusivamente para os serviços prestados por esta publicação, não sendo disponibilizados para outras finalidades ou à terceiros.

4. Conclusões

Pode-se observar, a partir da revisão bibliográfica, que o kefir, além de ser considerado um alimento rico nutricionalmente e probiótico, contém, em seu sistema simbiótico, diversos micro-organismos.

Tais micro-organismos podem diferenciar-se de acordo com a região de cultivo do kefir, dentre eles, estão as leveduras, e estas podem ser isoladas desse sistema para posterior avaliação probiótica, sendo que a *Saccharomyces boulardii* é a única levedura probiótica utilizada na medicina, porém outras podem ser identificadas.

O sorvete pode ser uma matriz adequada para micro-organismos probióticos, tendo potencial de ser um dos alimentos utilizados para tal fim.

5. Agradecimentos

Os autores agradecem aos revisores, colaboradores e agências de foment como CAPES e CNPQ.

6. Referências

- ALAMPRESE, C. et al. Effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG addition in ice cream. **International Journal Dairy Technol.**, v.58, p.200-206, 2005.
- ALAMPRESE, C. et al. Survival of *Lactobacillus johnsonii* La1 and influence of its addition in retail-manufactured ice cream produced with different sugar and fat concentrations. **International Dairy Journal**, v.12, p.201-208, 2002.
- ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos: lista de alegações de propriedades funcionais aprovadas.** Atualizado em julho de 2008. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm. Acessado em 02/09/2015.
- ARSLAN, S. et al. Microencapsulation of probiotic *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* with different wall materials by spray drying. **LWT - Food Science and Technology**. v. 63, n. 1, p. 685–690, 2015.
- ARROYO-LÓPEZ, F. N. Yeasts in table olive processing: Desirable or spoilage microorganisms? **International Journal of Food Microbiology**, v.160, p. 42–49, 2012.
- BEVILACQUA, A. et al. Technological and spoiling characteristics of the yeast microflora isolated from Bella Di Cerignola table olives. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, p. 2198-2207, 2009.

- BASYIGIT, G. et al. Viability of human-derived probiotic lactobacilli in ice cream produced with sucrose and aspartame. **Journal Microbiology Biotechnology**, v.33, p.796-800, 2006.
- BERGMANN, R. S. O. et al., Microbial profile of a kefir sample preparations – grains in natura and lyophilized and fermented suspension. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 4, p. 1022-1026, 2010.
- CASTRO-CISLAGHI, F. P. et al. *Bifidobacterium* Bb-12 microencapsulated by spray drying with whey: Survival under simulated gastrointestinal conditions, tolerance to NaCl, and viability during storage. **Journal of Food Engineering**, v.113, p.186-193, 2012.
- CHAMPAGNE, C. P. et al. Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 45, n. 1, p. 61–84, 2005.
- CHIFIRIUC, M. C. et al. *In vitro* assay of the antimicrobial activity of kephir against bacterial and fungal strains. **Anaerobe**, v.17, p.433-435, 2011.
- CHEN, P. et al. Screening for potential new probiotic based on probiotic properties and α -glucosidase inhibitory activity. **Food Control**, v. 35, p. 65-72, 2014.
- COUSIN, F. J. et al. The first dairy product exclusively fermented by *Propionibacterium freudenreichii*: A new vector to study probiotic potentialities in vivo. **Food Microbiology**, v. 32, p. 135-146, 2012.
- CRUZ, A. G. et al. Sorvetes probióticos e prebióticos. In: SAAD, S. M. I.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F. (Org.). **Probióticos e prebióticos em alimentos: Fundamentos e Aplicações Tecnológicas**. São Paulo: Livraria Varela. cap 15, p. 359-388. 2011.
- CRUZ, A. G. et al. Ice-cream as a probiotic food carrier. **Food Research International**, v. 42, p. 1233-1239, 2009.
- CZERUCKA, D. et al. Review article: yeast as probiotics – *Saccharomyces boulardii*. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, v. 26, n. 767–778, 2007.

- DIOSMA, G. et al. Yeasts from kefir grains: isolation, identification, and probiotic characterization. **World Journal Microbiol Biotechnol.** p. 1-11, 2013.
- DUONGTHINGOC, D. et al. Effect of whey protein agglomeration on spray dried microcapsules containing *Saccharomyces boulardii*. **Food Chemistry**, v. 141, n. 3, p. 1782-178, 2013.
- ERTEKIN, B.; GUZEL-SEYDIM, Z. B. Effect of fat replacer on kefir quality. **Journal of the Science of Food and Agriculture.** v. 90, p. 543-548, 2009.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **CODEX Standard for Fermented Milks.** Codex Stan, second ed. 2003.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria.** Córdoba, 2002. 34p.
- FARNWORTH, E. R. Kefir – a complex probiotic. **Food Science e Technology Bulletin: Functional Foods**, v. 2, p. 1-17, 2005.
- FERREIRA, I. M. P. L. V. O. et al. Short communication: Effect of kefir grains on proteolysis of major milk proteins. **Journal of Dairy Science.** v. 93, p. 27-31, 2010.
- FLEET, G. H. Yeasts in foods and beverages: impact on product quality and safety. **Curr. Opin. Biotechnol.** v.18, p. 170–175, 2007.
- GARCÍA-HERNÁNDEZ, Y. Identification and *in vitro* screening of avian yeasts for use as probiotic. **Research in Veterinary Science**, v. 93, p. 798–802, 2012.
- GOLOWCZYC, M. A., et al. Cellular injuries of spray-dried *Lactobacillus* spp. isolated from kefir and their impact on probiotic properties. **International Journal of Food Microbiology**, v.144, p. 556–560, 2011.
- GULITZ, A. The microbial diversity of water kefir. **International Journal of Food Microbiology**, v. 151, n. 3, p. 284-288, 2011.

- GUZEL-SEYDIM, Z. et al. Review: functional properties of kefir. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, p. 261–268, 2011.
- HOMAYOUNI, A. et al. Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. **Food Chemistry**, v. 111, p. 50–55, 2008.
- JIANZHONG, Z. et al. Analysis of the microflora in Tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis. **Food Microbiology**. v. 26, p. 770–775, 2009.
- JACQUES, N.; CASAREGOLA, S. Safety assessment of dairy microorganisms: The hemiascomycetous yeasts. **International Journal Food Microbiology**. v. 126, p. 321–326, 2008.
- KOMATSU, T. R. et al. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 3, 2008.
- LEITE, A. M. O., et al., Assessment of the microbial diversity of Brazilian kefir grains by PCR-DGGE and pyrosequencing analysis. **Food Microbiology**. v. 31, p.215-221, 2012.
- LOPITZ-OTSOA, F. et al. Kefir: A symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. **Rev Iberoamerican Micology**, v. 23, p. 67-74, 2006.
- MALEKI, D. et al. **Probiotics in Cancer Prevention, Updating the Evidence**. Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics. Bioactive Foods in Health Promotion 2016, Pages 781–791.
- MARTINS, F. S. et al. Screening of yeasts as probiotic based on capacities to colonize the gastrointestinal tract and to protect against enteropathogen challenge in mice. **Journal Gen. Appl. Microbiol**, v. 51, p. 83-92, 2005a.

- MARTINS, F. S.; et al. Estudo do potencial probiótico de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* através de testes *in vitro*. **Revista de biologia e ciências da terra**, v. 5, p. 14-20, 2005b.
- MARTINS, F. S. et al. *Saccharomyces cerevisiae* strain 905 reduces the translocation of *Salmonella enterica* serotype *Typhimurium* and stimulates the immune system in gnotobiotic and conventional mice. **Journal Med. Microbiology**, v. 56, p. 352–359, 2007.
- MARTINS, F. S., et al. Inhibition of tissue inflammation and bacterial translocation as one of the protective mechanisms of *Saccharomyces boulardii* against *Salmonella* infection in mice. **Microbes and Infection**, v. 15, p. 270-279, 2013.
- MCFARLAND, L. V. Systematic review and meta-analysis of *Saccharomyces boulardii* in adult patients. **World Journal Gastroenterology**. v. 16, n. 18, p. 2202-2222, 2010.
- MIGUEL, M. G. C. P. et al. Diversity of bacteria present in milk kefir grains using culture-dependent and culture-independent methods. **Food Research International**, v. 42, p. 1523-1528, 2010.
- NAMBOU, K. et al. A novel approach of direct formulation of defined starter cultures for different kefir-like beverage production. **International Dairy Journal**, v. 34, n. 2, p. 237-246, 2014.
- PEDERSEN, L. L. et al. Biodiversity and probiotic potential of yeasts isolated from Fura, a West African spontaneously fermented cereal. **International Journal of Food Microbiology**. v. 159, p. 144–151, 2012.
- PENNACCHIA, C., et al. Isolation of *Saccharomyces cerevisiae* strains from different food matrices and their preliminary selection for a potential use as probiotics. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, p. 1919-1928, 2008.
- PERITI, P.; TONELLI, F. Preclinical and clinical pharmacology of biotherapeutic agents: *Saccharomyces boulardii*. **J Chemother**. v. 13, p. 473–493, 2001.

- PERRICONE, M. Technological characterization and probiotic traits of yeasts isolated from Altamura sourdough to select promising microorganisms as functional starter cultures for cereal-based products. **Food Microbiology**, v. 38, p. 26-35, 2014.
- PLESSAS, S. et al. Bread making using kefir grains as baker's yeast. **Food Chemistry**, v. 93, p. 585–589, 2005.
- ROMANIN, D. et al. Downregulation of intestinal epithelial innate response by probiotic yeasts isolated from kefir. **Int J Food Microbiology**, v. 140, p. 102–108, 2010.
- SAAD, S. M. I. Probiotics and prebiotics: The state of the art. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 1, p. 1–16, 2006.
- SAAD, S. M. I. et al. **Probióticos e prebióticos em alimentos. Fundamentos e aplicações tecnológicas**. 1. Ed. São Paulo, Livraria Varela, 2011.
- SAAD, N. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic Field. **LWT - Food Science and Technology**. v. 50, p. 1-16, 2013.
- SARKAR, S. Potential of kefir as a dietetic beverage – a review. **British Journal of Nutrition**, v. 109, p. 280-290, 2007.
- SILVA, P. D L da et al. Potentially probiotic ice cream from goat's milk: Characterization and cell viability during processing, storage and simulated gastrointestinal conditions. **LWT - Food Science and Technology**. v. 62, n. 1, part 2, 2015, p. 452–457, 2015.
- SILVA, T. et al. Characterization of yeasts from Portuguese brined olives, with a focus on their potentially probiotic behavior. **LWT- Food Science and Technology**, v. 44, p. 1349–1354, 2011.
- STADIE, J. et al. Metabolic activity and symbiotic interactions of lactic acid bacteria and yeasts isolated from water kefir. **Food Microbiology**, v. 35, p. 92-98, 2013.

- SURIASIH, K. Microbiological and Chemical Properties of Kefir Made of Bali Cattle Milk. **Food Science and Quality Management**. v. 6, 2012.
- TAMIME, A. Y. et al. Properties of kefir made in Scotland and Poland using bovine, caprine and ovine milk with different starter cultures. **Lebensm.-Wiss. u.-Technol.**, v. 34, p. 251-261, 2001.
- TAS, T. B. K. K. et al. Identification of microbial flora in kefir grains produced in Turkey using PCR. **International Journal of Dairy Technology**, v. 65, n. 1, p. 126-131, 2012.
- THOMAS, M. B. et al. Enhanced viability of probiotic *Saccharomyces boulardii* encapsulated by layer-by-layer approach in pH responsive chitosan–dextran sulfate polyelectrolytes. **Journal of Food Engineering**, v. 136, p. 1–8, 2014.
- URAZ, G. et al. Isolation of yeast from microflora of kefir. **Abstracts / Journal of Biotechnology**. v. 161S, p. 19–48, 2012.
- VINDEROLA, C. G. et al. Immunomodulating capacity of kefir. **Journal Dairy Research**, v.72, p.195-202, 2005a.
- VINDEROLA, C. G. et al. Distal mucosal site stimulation by kefir and duration of the immune response. **European Journal Inflamm.** v. 3, p. 63–73, 2005b.
- VINDEROLA, C. G. et al. Effects of kefir fractions on innate immunity. **Immunobiology**, v. 211, p. 149–156, 2006.
- WANG, S-Y., et al. Investigation of microorganisms involved in biosynthesis of the kefir grain. **Food Microbiology**, v. 32, p. 274-285, 2012.
- WESCHENFELDER, S.; WIEST, J. M.; CARVALHO, H. H. C. Atividade anti-*Escherichia coli* em kefir e soro de kefir tradicionais. **Rev. Inst. Latic. “Cândido Tostes”**, v. 34, n 367/368, p. 48-55, 2009.
- WITTHUHN, R. C. et al. Impact of preservation and different packaging conditions on the microbial community and activity of kefir grains. **Food Microbiology**, v.22, p.337-344, 2004.

- WITTHUHN, R.C. et al. Characterisation of the microbial population at different stages of Kefir production and Kefir grain mass cultivation. **International Dairy Journal**, v.15, p. 383–389, 2005.
- WOUTERS, J. T. M. et al. Microbes from raw milk for fermented dairy products. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 91–109, 2002.
- YANG, Z. et al. Symbiosis between microorganism from Kombucha and Kefir: Potential significance to the enhancement of kombucha function. **Applitive Biochemical and Biotechnology**, v. 107, p. 8361–8366. 2008.
- YANG, Y. et al. Proteomics evidence for kefir dairy in Early Bronze Age China. **Journal of Archaeological Science**. v. 45, p. 178-186, 2014.

3.2 MANUSCRITO 2

Formatado conforme as normas da revista Food Science and Technology.

Artigo aceito para publicação em 18 de agosto de 2017.

Identification by PCR and evaluation of probiotic potential in yeast strains found in kefir samples in the city of Santa Maria, RS, Brazil

Daniela CASSANEGO^{1*}, Neila RICHARDS¹, Patricia VALENTE², Marcio MAZUTTI¹,
Maurício RAMÍREZ-CASTRILLON²

Abstract

Kefir is a product elaborated from the symbiotic fermentation of different microorganisms. The *Kluyveromyces* and *Saccharomyces* genera are the major representatives of the yeasts found in kefir microbiota. The only probiotic yeast commercialized as an oral medication, is the *Saccharomyces boulardii*. The present work involved the microbiological quality examination of six kefir samples in the city of Santa Maria/RS, the yeasts isolation present in the samples and the identification of them by PCR (Polymerase chain reaction). Then, their probiotic potential was evaluated by in vitro technique. After that, microbiological analysis confirmed that kefir samples were suitable for consumption once the microbiological quality was established. Nineteen yeast strains were isolated from six different kefir samples; it was identified, by PCR analysis, but only three species were identified from these microorganisms in the present article: *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniospora uvarum* and *Kazachstania unispora*. Nevertheless, by simulating the passage of isolated strains through the gastrointestinal environment, it was observed that they could not be considered probiotics. The results indicate that, in an isolated way, the yeast presents in kefir samples, in the city of Santa Maria, RS, can't be considered probiotics according to the tests performed.

Keywords: *Saccharomyces boulardii*; *Saccharomyces cerevisiae*; *Hanseniospora*; *Kazachstania*; in vitro.

Practical Application: Probiotic performance verification of yeast species isolated and identified in Kefir samples from the city of Santa Maria, RS.

Received 10 May, 2017

Accepted 18 Aug., 2017

¹ Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, Campus Camobi, Santa Maria, RS, Brazil

² Universidade do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

*Corresponding author: danybuzatti@yahoo.com.br

1 1. Introduction

2 Kefir is a viscous, acid and slightly alcoholic solution, produced through fermented
3 milk by means of “grains” as starter culture (FAO/WHO, 2003). The grains are composed of
4 an inert matrix made up of polysaccharides and proteins. The matrix is densely populated by
5 lactic acid bacteria species, acetic acid bacteria, and yeasts (Leite et al., 2012, 2013b).

6 The traditional method of producing kefir is occurred by directly inoculation of grains
7 in the milk. The milk may be whole, skimmed or semi skimmed and must have been gone
8 through heat treatment equivalent to pasteurization or ultra-pasteurization. Subsequently, the
9 milk is cooled at temperature 20-25 °C and then the inoculation occurs with kefir grains. The
10 period of fermentation is 18-24 hours at 20-25 °C, then the grains are separated from the milk
11 by filtering. The produced kefir is stored at 4 °C and it is ready for consumption (Otlés &
12 Cagindi, 2003).

13 Fermented beverages with kefir grains can be consumed “in natura” or with other
14 foods like fruit, cereals, honey, which makes it even more nutritious (Almeida et al., 2011).
15 Studies carried out by Rodrigues et al. (2016) have shown the viability of also using kefir
16 grains to produce beer, thus demonstrating the different functionalities of it as food.

17 Even though the majority of microorganisms in kefir grains are represented by
18 bacteria, the yeasts are important for the microbiological balance and development of the
19 physical-chemical and sensorial characteristics of the final product. According to Farnworth
20 (2005), yeasts play an important role in the preparation of kefir, providing essential growth
21 nutrients for acetic acid bacteria, such as amino acids and vitamins, and release metabolites
22 that contribute to the flavour and mouthfeel of kefir, as ethanol and CO₂.

23 Through its microbiological composition, kefir can be considered a complex probiotic
24 product, holding in its composition live microorganisms able to improve the microbial
25 intestinal balance, which produces benefits to the health of those who consume it
26 (Weschenfelder et al., 2009). Some bacteria strains and yeasts found in kefir were recognized
27 as probiotics, such as *Leuconostoc mesenteroides* and *Saccharomyces cerevisiae* (Leite et al.,
28 2015).

29 Many definitions are used for the term probiotic, the most widely accepted one is that
30 they are live microorganisms, which when consumed in adequate amounts, confer a health
31 effect on the host (FAO/WHO, 2001). The majority of probiotics are bacteria, the lactic acid
32 bacteria (LAB) are the most popular ones and used in many dairy products, such as the highly
33 consumed fermented milk, cheese and vegetable-based foods (Chen et al., 2014).

34 Probiotic strains of *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* and *Saccharomyces* have an
35 extensive safety record for their consumption by the healthy population, in general, being
36 recognized as GRAS (General Recognized as Safe) (Saad et al., 2011).

37 In the last decades, the yeasts have been considered as one of the microorganisms
38 which present probiotic potential, however, showing a greater focus in the livestock
39 production, the yeasts are being added in feed for ruminants, for example, increasing the
40 weight of the animal and milk production (Fleet, 2007; Jacques & Casaregola, 2008). The
41 most important parameters to select the yeasts with probiotic potential and starter should be as
42 follows: technological feasibility (growth at different temperatures, pH, salt concentration,
43 enzymatic activities and technological performance) and functional characteristics (survival in
44 low pH and in the presence of bile salts, resistance to antibiotics, adhesion and/or permanence
45 in the intestine) (Bevilacqua et al., 2009).

46 Despite the fact that the majority of the studies in terms of probiotic strains are related
47 to the *Saccharomyces boulardii* specie, Martins et al. (2005b) affirm that other strains of
48 *Saccharomyces* spp. or other yeast genera should, probably, have a similar or better probiotic
49 activity than *Saccharomyces boulardii*. Arroyo-López et al. (2012) claim that nowadays there
50 is a large interest in finding other yeast strains with probiotic characteristics. A great variety
51 of microorganisms with potential use as probiotics have been isolated in kefir grains,
52 however, bacteria are more studied (Golowczyc et al., 2011).

53 In view of the current interest in the yeast research with probiotic potential, and the
54 presence of microorganisms in kefir, the aim of this article is to isolate and identify, through
55 PCR analysis, the yeast species found in different kefir samples from Santa Maria/RS, Brazil.
56 Moreover, evaluate the probiotic potential in vitro from the isolated strains.

57

58 2. Material and Methods

59 The identification analyses from the isolated microorganisms were carried out in the
60 Federal University of Rio Grande do Sul, in the Mycology Laboratory, Department of
61 Microbiology, Institute of Health Sciences (ICBS/UFRGS), and the other analyses, in the
62 Federal University of Santa Maria (UFSM). The analyses were conducted from November
63 2015 to August 2016.

64

65 2.1 Obtaining of kefir samples

66 The kefir samples were acquired in the city of Santa Maria, RS, they were kindly
67 donate by locals who consume this product.

68 **2.2 Multiplication of samples**

69 The kefir samples were multiplied in sterilized UHT whole milk from the NINHO –
70 Neslé brand (K1, K3, K4 and K5), and water with brown sugar (Mais Vita - Yoki), (K2), at
71 room temperature (± 25 °C). Every 24 hours the mentioned culture media were renewed to
72 maintain the microorganism colonies. In the sample K6 a mix was made of all kefir samples.

74 **2.3 Microbiological analysis of kefir samples**

75 In order to evaluate the microbiological quality of the kefir samples, it was performed
76 *Salmonella sp.* analysis, thermotolerant and total coliforms, coagulase-positive
77 *Staphylococcus*, total count of yeasts and lactic bacteria. Except for the analysis of lactic
78 bacteria, which was performed following the APHA (2001) methodology and the yeast count,
79 performed from the incubation on YM medium (0.3% yeast extract, 0.3% malt extract, 0.5%
80 peptone, 1% glucose, 2% Agar, 0.04% chloramphenicol at pH 4.0) (Mattanna, et al., 2014).
81 the subsequent analysis were performed according to RDC 62/2003 (Brasil, 2003). The
82 analysis referring to the microbiological parameters of kefir samples were performed in
83 triplicate at dilutions from 10^{-1} to 10^{-10} .

85 **2.4 Yeast isolation**

86 The methodology for the isolation of the yeast strain was described by Mattanna et al.,
87 (2014). The kefir samples were diluted in peptone water, up to 10^{-10} , and it was performed
88 surface plating, on YM medium (0.3% yeast extract, 0.3% malt extract, 0.5% peptone, 1%
89 glucose, 2% Agar, 0.04% chloramphenicol at pH 4.0). Petri dishes were incubated for 48 to
90 78 hours in greenhouse at 28 ° C.

91 After growth, each visually different colony was plated, by depletion with platinum
92 loop in a new Petri dish containing GYP medium (2% glucose, 2% Agar, 1% yeast extract,
93 1% peptone). Then, the dishes were incubated during 48 hours at 28 ° C and, after this period,
94 a new depletion was performed, to confirm that in the Petri dish was present only one yeast
95 colony. The isolated yeasts were pricked out in an inclined tube with GYP medium and kept
96 at temperature of 4 ± 1 °C, with the tubes covered with sterile mineral oil.

98 **2.5 Identification of yeast isolates**

99 **2.5.1 DNA extraction**

100 The yeasts genomic DNA was extracted according to the methodology proposed by
101 Ramírez-Castrillon et al. (2014). The quality of the extracted DNA was analysed on

102 GelRed® stained 1% (w / v) agarose gels and visualized under UV light with the Syngene
103 photodocumentation system.

104

105 **2.5.2 PCR amplification**

106 The amplification of the large ribosomal subunit D1 / D2 domain (26S or ITS1-5.8S-
107 ITS2 region) was performed, respectively, with primers NL1 / NL4 (O'Donnell, 1993) or
108 ITS5 / ITS4 (White et al., 1990). The PCR reaction contained Taq polymerase (1U)
109 (Invitrogen), 1X buffer, MgCl₂ (3mM), primers (0.64 pmol / uL), dNTP (10 mM) and DNA
110 (1 ng / μL).

111 The amplification conditions were: initial denaturation at 94 °C for 5 min, 35 cycles of
112 denaturation at 94 °C for 15 sec, 55 °C for 45 sec, extension at 72 °C for 90 sec, and final
113 extension at 72 °C for 6 min (Mattanna et al (2014), Ramiréz-Castrillon et al. (2014))

114 PCR products were verified in 1,5% (p/v) agarose gels, stained with GelRed and
115 visualized under UV light using the Syngene photodocumentation system. The 100 bp
116 molecular weight marker was used to compare the size of the bands. Finally, the PCR
117 products were purified using the ExoSap kit according to conditions established by the
118 manufacturer.

119

120 **2.5.3 Yeast strains sequencing**

121 Sequences were obtained by the ABI-Prism 3100 Genetic Analyzer (Life
122 Technologies Corp., USA), using protocols established by Ludwig Biotech Brazil (Alvorada,
123 RS, Brazil). Sequences were edited, assembled and compared to sequences of TIPO strains
124 deposited in GenBank using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) algorithm.
125 Identities between 99 and 100% allowed identification at the taxonomic level of species.

126

127 **2.6 Verifying probiotic potential of yeasts using in vitro tests**

128 Probiotic potential tests were performed in duplicate. The procedure was carried out
129 twice in each isolated and identified yeast species.

130

131 **2.6.1 Simulation of gastric environment**

132 Yeast cells, isolated and identified, were multiplied in GYP broth (2% glucose, 2%
133 Agar, 0,5% yeast extract, 1% peptone) at 30 °C and 150 rpm. Cells were collected in the
134 stationary phase by centrifugation (5 minutes at 3000 rpm), washed twice with sterile buffered

135 saline and incubated in the simulated gastric environment at 37 ° C and 150 rpm (Martins et
136 al., 2005b).

137 In order to simulate the gastric environment the protocol initially described by
138 Corcoran et al. (2007) with modifications made by Bonatsou et al. (2014) was adopted. The
139 simulated gastric juice was prepared in a buffer solution (pH 2,0) containing NaCl (2,05 g L⁻¹)
140 ¹), KH₂PO₄ (0,60 g L⁻¹), CaCl₂ (0,11 g L⁻¹) and potassium chloride (0,37 g L⁻¹), the pH was
141 adjusted in 1M HCl and the medium was autoclaved at 121 °C for 15 min. Prior to use, pepsin
142 (0.0133 g L⁻¹) and lysozyme (0.01 g L⁻¹) were added. Incubation occurred for 2.5 h at 37 ° C
143 in an orbital shaker (200 rpm) in order to simulate peristaltic movements. Finally, serial
144 dilutions of the cultures were plated in YM medium and counted after incubation at 30 ° C for
145 48 hours.

146

147 2.6.2 Pancreatic digestion

148 The simulation of pancreatic digestion was performed using bile (3.0 g L⁻¹) and
149 pancreatin (0.1 g L⁻¹) in a buffer solution at pH 8.0 (adjusted with 1M HCl) consisting of
150 50.81 g L⁻¹ dibasic sodium phosphate heptahydrate and 8.5 g L⁻¹ NaCl stirred continuously
151 at 200 rpm for 3.5 h at 37 ° C. Overall survival was obtained by comparison of the initial
152 yeast counts (CFU/ mL⁻¹) at the beginning of the simulated gastric digestion and those cells
153 recovered at the end of the simulated pancreatic digestion (Bonatsou et al., 2014).

154

155 3. Results and discussion

156 3.1 Verification of microbiological samples quality

157 Results of the microbiological analysis performed from the kefir samples in the city of
158 Santa Maria, RS, are presented in Table 1.

159

160 **Table 1.** Microbiological evaluation of six kefir samples donated by locals of Santa
161 Maria, RS. Results expressed as CFU.mL⁻¹.

Sample	Yeasts	Lactic bactéria	Total Coliforms	Thermotolerant Coliforms	Coagulase positive <i>Staphylococcus</i>	<i>Salmonella</i>
K1	3,4 . 10 ⁻¹¹	3,7 . 10 ⁻¹¹	< 1,0 . 10 ⁻¹	< 1,0 . 10 ⁻¹	< 1,0 . 10 ⁻¹	Absence
K2	5,4 . 10 ⁻⁸	2,5 . 10 ⁻⁷	1,27 . 10 ⁻⁵	< 1,0 . 10 ⁻¹	< 1,0 . 10 ⁻¹	Absence
K3	5,2 . 10 ⁻⁵	2,3 . 10 ⁻⁹	2,4 . 10 ⁻⁴	< 1,0 . 10 ⁻¹	< 1,0 . 10 ⁻¹	Absence

K4	$5,6 \cdot 10^{-7}$	$1,6 \cdot 10^{-11}$	$8,0 \cdot 10^{-1}$	$< 1,0 \cdot 10^{-1}$	$< 1,0 \cdot 10^{-1}$	Absence
K5	$4,7 \cdot 10^{-5}$	$8,8 \cdot 10^{-10}$	$1,5 \cdot 10^{-3}$	$< 1,0 \cdot 10^{-1}$	$< 1,0 \cdot 10^{-1}$	Absence
K6	$3,8 \cdot 10^{-6}$	$2,6 \cdot 10^{-11}$	$1,6 \cdot 10^{-2}$	$< 1,0 \cdot 10^{-1}$	$< 1,0 \cdot 10^{-1}$	Absence

162 K1: milk kefir, K2: water kefir; K3: kefir initially of water that was grown in milk
 163 kefir later; K4: milk kefir; K5: milk kefir; K6: mixture of all kefir samples, como citado no
 164 item 2.2- Multiplication of samples.

165

166 The milk quality used in the manufacture of dairy products, as well as the conditions
 167 of production, are of great importance in order to obtain a healthy product (Caetano &
 168 Montanhini, 2014).

169 Normative instructions nº 46, October 23rd 2007, Technical Regulation on the Identity
 170 and Quality of Fermented Milks establishes that fermented milk considered kefir must contain
 171 at least 10^4 UFC.mL⁻¹ of yeasts and 10^7 CFU.mL⁻¹ of lactic bacteria, it can be observed in
 172 Table 1 that these parameters were found in all evaluated kefir samples. The number of lactic
 173 bacteria found in this study corroborate with Wouters et al. (2002) who affirmed that these
 174 bacteria are the kefir predominant flora.

175 Similar results to the yeasts and lactic bacteria counts were found in studies performed
 176 by Garrote et al. (2001), in which the authors evaluated the microbiological composition of
 177 four kefir samples from Argentina. In a study carried out by Beshkova et al. (2003), lactic
 178 bacteria concentration in kefir was superior to 10^{10} CFU.mL⁻¹, which is consistent with the
 179 results found in the present study.

180 Total coliforms were present in five kefir samples, it can be observe that the highest
 181 results of these microorganisms were found in water and brown sugar kefir samples, such
 182 results can be explained due to the presence of total coliforms both in the water and in the
 183 sugar, used for the multiplication of these samples. Presumably, the presence of total
 184 coliforms in the other samples has arisen through the manipulation of them.

185 Thermotolerant coliforms, coagulase positive *Staphylococcus* and *Salmonella* sp. were
 186 not present, which are satisfactory results since the Normative instruction №. 62, august 26th
 187 2003, predicts the absence of these microorganisms in kefir samples.

188

189 3.2 Identification of isolates

190 Table 2 shows the yeast species found in kefir samples from the city of Santa Maria,
 191 RS.

192 **Table 2:** Genetic identification of the species with their edited sequences assembled and
 193 compared to sequences of TIPO strains deposited in GenBank using the Basic Local
 194 Alignment Search Tool (BLAST) algorithm. Identities between 99 and 100% allowed
 195 identification at the taxonomic level of species.

Sample	Specie	Identity	Accession
K1a	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99%	KF81001.2
K1b	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99%	JF757233.1
K1c	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99%	HQ262396.1
K1d	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99%	HQ262394.1
K1e	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99%	GU565204.1
K1f	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99%	GQ121691.1
K2a	<i>Hanseniospora uvarum</i>	100%	EF550176.1
K2b	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99%	GQ121685.1
K3a	<i>Kazachstania unispora</i>	99%	AY048158.1
K3b	<i>Kazachstania unispora</i>	99%	AY048158.1
K3c	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99%	GQ121549.1
K4a	<i>Kazachstania unispora</i>	99%	AY007912.1
K4b	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99%	FJ770500.1
K4c	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99%	KJ530642.1
K5a	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99%	CP009950.1
K5b	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99%	KP064124.1
K6a	<i>Kazachstania unispora</i>	99%	AY007912.1
K6b	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99%	KM655850.1
K6c	<i>Kazachstania unispora</i>	100%	AY007912.1

196 K1: milk kefir, K2: water kefir; K3: kefir initially of water that was grown in milk
 197 kefir later; K4: milk kefir; K5: milk kefir; K6: mixture of all kefir samples.

198
 199 Microbial analysis from three different kefir grains of Brazil, by PCR-DGGE,
 200 performed by Leite et al. (2012), showed *Lactobacillus kefiranofaciens* and *Lactobacillus*
 201 *kefiri* to be the major bacterial populations in all three grains and the yeast community was
 202 dominated by *Saccharomyces cerevisiae*, in accordance with the yeast species of the kefir
 203 samples evaluated in the present study.

204 Another study, previously performed in Brazil with the aim of identifying the
205 microbial profile of kefir sample cultivated in an aqueous fermentation of brown sugar found
206 the following yeast species: *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida colliculosa*, *Toruspola*
207 *delbruechii*, *Candida inconspicua*, *Candida magnoliae*, *Kloeckera* sp., *Candida famata*,
208 *Kluyveromices lactis*, *K. marxianus* and *Candida kefir* (Bergmann et al., 2010).

209 Uraz et al. (2012) isolated yeasts from kefir of Turkey. Altogether, 66 different species
210 of these microorganisms were found, 51% of the yeasts found were *Candida kefir* specie,
211 33% *Candida famata* and only 2% from the yeast present in the evaluated kefir were from the
212 *S. cerevisiae* specie.

213 Microorganisms from kefir of different regions in Turkey were found, *Kluyveromices*
214 *marxianus* and *Kluyveromices dobzhanskii* were the most representative yeast species (Tas et
215 al., 2012), *Kluyveromices marxianus* was also the most found yeast specie in Tibetan kefir
216 (Jianzhong et al., 2009). Authors isolated and identified microorganisms present in kefir
217 obtained from Bali, in a total of 115 isolates, 68.7% were lactic acid bacteria and 31.3% were
218 yeast, having *Candida famata* as the largest representative of them (Suriasih et al., 2012).

219 The microbial diversity of water kefir, made from a mixture of water, dried figs,
220 lemon and sucrose was studied by Gulitz et al. (2011), the authors found the yeast
221 *Zygorhynchus florentina* as being the more predominant one in this type of cultivate.

222 Even though articles evidenced a wide diversity of yeast species present in kefir, only
223 three species of these microorganisms were found in the present article; *Saccharomyces*
224 *cerevisiae*, *Hanseniospora uvarum* and *Kazachstania unispora*. Considering that the type of
225 milk and the culture may influence the microbiological variety of Kefir, this fact may be the
226 reason for the presence of only two yeast species.

227

228 **3.3 Evaluation of probiotic potential in isolated yeasts**

229 *Saccharomyces boulardii*, known as the main probiotic yeast strain, has been used for
230 many years as an oral biotherapeutic agent for treating a range of diarrheal disorders, such as
231 diarrhea associated with antibiotic use, acute gastroenteritis in adults and children, diarrhea in
232 probe-fed patients, chronic diarrhea in HIV-infected patients, and has been found to be useful
233 against enteropathogenic agents (Martins et al., 2005a; Czerucka et al. 2007; Fleet, 2007;
234 Pennacchia et al., 2008).

235 However, authors have been researching on the probiotic potential of other strains and
236 yeast species, for instance in the study carried out by Diosma, et al. (2014), in which yeast
237 isolated from kefir in Argentina were identified and evaluated in relation to their probiotic

238 potential. 34 yeast strains were isolated and identified by means of classical microbiological
239 and molecular-genetic methods, out of them, 13 isolates showed resistance to bile salts. Also,
240 *K. marxianus* CIDCA 8154 and *S. cerevisiae* CIDCA 8112 evidenced the capacity to adhere
241 to epithelial intestine cells and to survive passage through the gastrointestinal tract of Balb/c
242 mice. Authors concluded that further studies are still required; however, the results obtained
243 here should nevertheless be useful for the development of new probiotic products based on
244 the different strains of yeast isolated from kefir.

245 Romanin et al. (2010) evaluated the anti-inflammatory activity of 21 yeasts, from the
246 genera *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and *Issatchenkia*, isolated from kefir, were 100%
247 effective to inhibit the inflammation in the intestinal epithelium, attesting the importance of
248 studying yeasts which are a part of microbial flora of kefir.

249 Pedersen et al. (2012) identified and evaluated the probiotic potential of yeasts isolated
250 from Fura, an African spontaneously fermented cereal. They were tested for the ability to
251 survive in bile salts, low pH, growth on epithelial cells and transepithelial electrical
252 resistance. As a result, new yeasts with probiotic potential were found in the study, the
253 evaluated and characterized species were *Candida krusei*, *Kluyveromyces marxianus*,
254 *Candida tropicalis*, *Candida rugosa* and *Trichosporon asahii*.

255 A new lineage from *S. cerevisiae*, denominated as UFMG 905, was isolated from
256 Brazilian *cachaça* evaluated in relation to its probiotic potential by Martins et al. (2005b). The
257 results showed that the yeast was able to colonize and survive in the gastrointestinal tract of
258 mice and to protect them against experimental infections of *Salmonella enterica serotype*
259 *typhimurium* and *Clostridium difficile*. Later on, in a new study conducted by the same
260 authors, the results showed that *S. cerevisiae* UFMG 905 was able to reduce the translocation
261 of *Salmonella Typhimurium* and stimulate the immune system of mice (Martins et al., 2007).

262 Perricone et al. (2014) isolated yeasts from Altamura (south region of Italy) and,
263 satisfactory results were found when the authors tested the probiotic capacity of them; 18
264 isolates underwent a selection for their probiotic traits however, only 2 isolates
265 (*Saccharomyces cerevisiae* strain 2 and *Saccharomyces cerevisiae* strain 4) were selected and
266 analysed in relation to the simulation of the gastric transit; these isolates showed a trend
267 similar to *Saccharomyces Boulardii* when it comes to its probiotic potential.

268 Although several studies have shown that yeasts may present probiotic potential, in the
269 present study none of the 19 strains evaluated presented this benefit, considering the in vitro
270 analyses, none of the isolated yeast strains were able to survive the passage through
271 pancreatic digestion, in all analyses performed; it was observed a great decrease in the number

272 of these microorganisms. Thus they cannot be considered as probiotics since the amount of
 273 probiotic microorganisms that are able to survive is essential for its functionality and it will
 274 depend on the strain of microorganism selected during the process of product's
 275 manufacturing. (Tomaselli et al., 2011). Table 3 shows the results of probiotic potential of
 276 yeasts used in vitro tests.

277

278 **Table 3:** results of probiotic potential of yeasts used in vitro tests.

Sample	Specie	Simulation of gastric environment	Pancreatic digestion
K1a	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	-
K1b	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	-
K1c	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	-
K1d	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	-
K1e	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	-
K1f	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	-
K2a	<i>Hanseniospora uvarum</i>	+	-
K2b	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-
K3a	<i>Kazachstania unispora</i>	+	-
K3b	<i>Kazachstania unispora</i>	+	-
K3c	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-
K4a	<i>Kazachstania unispora</i>	+	-
K4b	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	-
K4c	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	-
K5a	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	-
K5b	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	-
K6a	<i>Kazachstania unispora</i>	-	-
K6b	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	-
K6c	<i>Kazachstania unispora</i>	-	-

279 K1: milk kefir, K2: water kefir; K3: kefir initially of water that was grown in milk
 280 kefir later; K4: milk kefir; K5: milk kefir; K6: mixture of all kefir samples. (+, positive
 281 results; -, negative results).

282

283 Recent study carried out by Kim et al. (2017) affirmed that kefir administered in mice
 284 improved and modulated the gut microbiota, which prevents obesity through promoting fatty
 285 acid oxidation. Such fact emphasises the benefits of kefir consumption as a symbiotic system
 286 and not only some selected microorganisms.

287 Several studies confirm the beneficial effects of kefir, such as the capacity to modulate
 288 the intestinal mucosal immune response in mice, enhance the phagocytic activity of peritoneal
 289 and pulmonary macrophage, furthermore, the capacity to enhance the mucosal immune

290 system in distal sites (bronchial tissue) (Vinderola et al., 2005a; Vinderola et al., 2005b). In
291 studies performed by Vinderola et al. (2005a, 2005b, 2006), the authors observed that
292 different components of kefir present an in vivo role as oral biotherapeutic substances
293 capable of stimulating immune cells of the innate immune system or to promote cell-mediated
294 immune responses against tumours and also against intracellular pathogenic infections.

295

296 4. Conclusion

297 Even though there were quantitatively a large variety of yeasts, when performing the
298 identification analyses of the 19 isolated strains by PCR, only three species of these
299 microorganisms were identified: *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniospora uvarum* and
300 *Kazachstania unispora*.

301 Upon analyzing the probiotic potential in vitro, by the passage of the 19 strains
302 through the simulated gastro-intestinal tract, it is possible to observe that the yeasts were not
303 efficient in the passage through pancreatic digestion, and therefore, they are not considered
304 probiotic. However, further studies with yeast isolated from kefir should be carried out
305 considering that some already published studies demonstrate the possible probiotic power of
306 some of these microorganisms.

307

308 5. References

309 Almeida, F. A., Ângelo f. F., Silva, S. L. da., & Silva, S. L. da. (2011). Análise sensorial e
310 microbiológica de kefir artesanal produzido a partir de leite de cabra e de leite de vaca.
311 *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, 66, 51-56.
312 <https://www.revistadoilct.com.br/rilct/article/view/155/163>

313 American Public Health Association (APHA). Committee on microbiological methods for
314 foods. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4. ed.
315 Washington: APHA, 2001. 676p.

316 Arroyo-López, F. N., Romero-Gil, V., Bautista-Gallego, J., Rodríguez-Gómez, F., Jiménez-
317 Díaz, R., García-García, P., Querol, A., & Garrido-Fernández, A. (2012). Yeasts in
318 table olive processing: Desirable or spoilage microorganisms? *International Journal of*
319 *Food Microbiology*, 160, 42 - 49. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.08.003>

320 Bevilacqua, A., Perricone, M., Cannarsi, M., Corbo, M. R., & Sinigaglia, M. (2009).
321 Technological and spoiling characteristics of the yeast microflora isolated from Bella Di
322 Cerignola table olives. *International Journal of Food Science and Technology*, 44,
323 2198-2207. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.08.003>

- 324 Bergmann, R. S. O. Pereira, M. A., Veiga, S. M. O. M., Schneedorf, J. M., Oliveira, N. M. S.,
325 & Fiorini, S. E. (2010). Microbial profile of a kefir sample preparations – grains in
326 natura and lyophilized and fermented suspension. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*,
327 30(4), 1022-1026. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612010000400029>
- 328 Beshkova, D. M., Simova, E. D., Frengova, G. I., Simov, Z. I., & Dimitrov, Z. P. (2003).
329 Production of volatile aroma compounds by Kefir starter cultures. *International Dairy*
330 *Journal*, 13, 529-535. [http://dx.doi.org/10.1016/S0958-6946\(03\)00058-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0958-6946(03)00058-X)
- 331 Bonatsou, S., Benítez, A., Rodríguez-Gómez, F., Panagou, E. Z., & Arroyo-López, F. N.
332 (2015). Selection of yeasts with multifunctional features for application as starters in
333 natural black table olive processing. *Food Microbiology*, 46, 66-73.
334 <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2014.07.011>
- 335 Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº. 62 de
336 26 de agosto de 2003. *Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para*
337 *controle de produtos de origem animal e água*. Diário Oficial da União.
- 338 Chen, P., Zhang, Q., Dang, H., Liu, X., Tian, F., Zhao, J., Chen, Y., Zhang, H., & Chein, W.
339 (2014). Screening for potential new probiotic based on probiotic properties and α -
340 glucosidase inhibitory activity. *Food Control*, 35, 65-72.
341 <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.06.027>
- 342 Corcoran, B. M., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., & Ross, R. P. (2007) Growth of probiotic
343 lactobacilli in the presence of oleic acid enhances subsequent survival in gastric juice.
344 *Microbiology*, 153, 291-299. doi: 10.1099/mic.0.28966-0
- 345 Diosma, G., Romanin, D. E., Rey-Burusco, M. F., Londero, A., & Garrote, G.L. (2014).
346 Yeasts from kefir grains: isolation, identification, and probiotic characterization. *World*
347 *Journal Microbiol Biotechnol.* 30(1), 43-53. doi:10.1007/s11274-013-1419-9
- 348 Food and Agriculture Organization of The United Nations, World Health Organization
349 (FAO/WHO). *CODEX Standard for Fermented Milks*. Codex Stan, second ed. 2003.
- 350 Food and Agriculture Organization of The United Nations, World Health Organization
351 (FAO/WHO). *Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food*
352 *including powder milk with live lactic acid bacteria*. Córdoba, 2001. 34p.
- 353 Farnworth, E. R. (2005). Kefir – a complex probiotic. *Food Science e Technology Bulletin:*
354 *Functional Foods*, 2, 1-17. DOI: 10.1616/1476-2137.13938

- 355 Fleet, G. H. (2007). Yeasts in foods and beverages: impact on product quality and safety.
356 *Current Opinion in Biotechnology*. 18, 170–175. DOI: 10.1016/j.copbio.2007.01.010
- 357 Garrote, G. L., Abraham, A. G., & Antoni, G. L. (2001). Chemical and microbiological
358 characterisation of kefir grains. *Journal of Dairy Research*, 68, 639–652.
359 <https://doi.org/10.1017/S0022029901005210>
- 360 Golowczyc, M. A., Silva, J., Teixeira, P., De Antoni, G.L., & Abraham, A. G. (2011)
361 Cellular injuries of spray-dried *Lactobacillus* spp. isolated from kefir and their impact
362 on probiotic properties. *International Journal of Food Microbiology*, 144, 556–560.
363 DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.005
- 364 Gulitz, A., Stadie, J., Wenning, M., Ehrmann, M. A., & Vogel, R. F. (2011). The microbial
365 diversity of water kefir. *International Journal of Food Microbiology*, 151(3), 284–288.
366 doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.09.016.
- 367 Holzappel, W. H. & Schinlinger, V. (2002). Introduction to pre-and probiotics. *Food*
368 *Research International*, 35, 109–116. [http://dx.doi.org/10.1016/S0963-9969\(01\)00171-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0963-9969(01)00171-5)
- 369 Jianzhong, Z., Liu, X., Jiang, H., & Dong, M. (2009). Analysis of the microflora in Tibetan
370 kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis. *Food Microbiology*. 26, 770–
371 775. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2009.04.009>
- 372 Jacques, N. & Casaregola, S. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: The
373 hemiascomycetous yeasts. *International Journal Food Microbiology*. 126, 321–326.
374 <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.020>
- 375 Kim, D. H., Jeong, D., Kang, II-B., Chon, J-W., Kim, H-S., Song, K-Y., & Seo, K-H. Kefir
376 alleviates obesity and hepatic steatosis in high-fat diet-fed mice by modulation of gut
377 microbiota and mycobiota: Targeted and untargeted community analysis with
378 correlation of biomarkers. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, In Press, Accepted
379 Manuscript, Available online 4 March 2017.
380 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2017.02.014>
- 381 Leite, A. M. O., Mayo, B., Rachid, C. T. C. C., Peixoto, R. S., Silva, J. T., Paschoalin, V. M.
382 F., & Delgado, S. (2012). Assessment of the microbial diversity of Brazilian kefir grains
383 by PCR- DGGE and pyrosequencing analysis. *Food Microbiology*. 31, 215–221.
384 <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2012.03.011>

- 385 Leite, A. M. O., Miguel, M. A., Peixoto, R. S., Rosado, A. S., Silva, J. T., & Paschoali, V.
386 M. (2013). Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: A natural
387 probiotic beverage. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44, 341–349.
388 <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822013000200001>
- 389 Leite, A. M. O., Miguel, M. A. L., Peixoto, R. S., Ruas-Madiedo, P., Paschoalin, V. M. F.,
390 & Mayo, B. (2015). Probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains isolated from
391 Brazilian kefir grains. *Journal of Dairy Science*, 98, 3622-3632. 2015.
392 <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2014-9265>
- 393 Martins, F. S., Nardi, R. M., Arantes, R. M., Rosa, C. A., Neves, M. J., & Nicoli, J. R.,
394 (2005a) Screening of yeasts as probiotic based on capacities to colonize the
395 gastrointestinal tract and to protect against enteropathogen challenge in mice. *The*
396 *Journal of General and Applied Microbiology*, 51, 83-92. DOI: 10.2323/jgam.51.83
- 397 Martins, F. S., Barbosa, F. H. F., Penna, F. J., Rosa, C. A., Nardi, R. M. D., Neves, M. J., &
398 Nicoli, J. R. (2005b). Estudo do potencial probiótico de linhagens de *Saccharomyces*
399 *cerevisiae* através de testes *in vitro*. *Revista de biologia e ciências da terra*, v. 5, p. 14-
400 20, 2005b.
401 [http://joaootavio.com.br/bioterra/workspace/uploads/artigos/potencialprobiotico-](http://joaootavio.com.br/bioterra/workspace/uploads/artigos/potencialprobiotico-5182df1547ab9.pdf)
402 [5182df1547ab9.pdf](http://joaootavio.com.br/bioterra/workspace/uploads/artigos/potencialprobiotico-5182df1547ab9.pdf)
- 403 Martins, F. S., Rodrigues, A. C., Tiago, F. C., Penna, F. J., Rosa, C. A., Arantes, R. M., Nardi,
404 R. M., Neves, M. J., & Nicoli, J. R. (2007). *Saccharomyces cerevisiae* strain 905
405 reduces the translocation of *Salmonella enterica* serotype *Typhimurium* and stimulates
406 the immune system in gnotobiotic and conventional mice. *Journal Medical*
407 *Microbiology*, 56, 352–359, doi:10.1099/jmm.0.46525-0
- 408 Martins, F. S., Vieira, A. T., Elian, S. D. A., Arantes, R. M. E., Tiago, F. C. P., Sousa, L. P.,
409 Araújo, H. R. C., Pimenta, P. F., & Bonjardim, C. A. (2013). Inhibition of tissue
410 inflammation and bacterial translocation as one of the protective mechanisms of
411 *Saccharomyces boulardii* against *Salmonella* infection in mice. *Microbes and Infection*,
412 15, 270-279. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2012.12.007>
- 413 Mattanna, P. Rosa, P. D. ; Poli, J. ; Richards, N. S. P. S. ; Daboi, T.; Scroferneker, M. L. ;
414 PASTORE, A. P. ; Corcao, G. ; Bertoldi, F. ; Deschamps, F. C. ; Valente, P. Lipid
415 profile and antimicrobial activity of microbial oils from 16 oleaginous yeasts isolated
416 from artisanal cheese. *Revista Brasileira de Biociências* (Impresso), v. 12, p. 121-126,
417 2014.

- 418 O'Donnell, K. Fusarium and its near relatives in The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and
419 Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics, eds Reynolds DR& Taylor JW
420 (Wallingford, UK: CAB International), pp. 225–233.1993.
- 421 Otles, S. & Cagindi, O. Kefir: A probiotic Dairy-Composition, Nutritional and Therapeutic
422 Aspects. *Pakistan Journal of Nutrition*, 2, 54-59,
423 <http://www.scialert.net/abstract/?doi=pjn.2003.54.59>
- 424 Pedersen, L. L., Owusu-Kwarteng, J., Thorsen, L., & Jespersen, L. (2012). Biodiversity and
425 probiotic potential of yeasts isolated from Fura, a West African spontaneously
426 fermented cereal. *International Journal of Food Microbiology*. 159, 144–151.
427 <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.08.016>
- 428 Perricone, M., Bevilacqua, A., Corbo, M. R., & Sinigaglia, M. (2014). Technological
429 characterization and probiotic traits of yeasts isolated from Altamura sourdough to
430 select promising microorganisms as functional starter cultures for cereal-based
431 products. *Food Microbiology*, 38, 26-35. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2013.08.006>
- 432 Ramírez-Castrillón, M., Mendes, S. D. C., Inostroza-Ponta, M., & Valente, P. (2014). (GTG)5
433 MSP-PCR Fingerprinting as a Technique for Discrimination of Wine Associated
434 Yeasts?. *Plos One*, v. 9, p. e105870, 2014.
435 <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0105870>
- 436 Rodrigues, K. L., Araújo, T. H., Schneedorf, J. M., Ferreira, C. de S., Moraes, G. de O. I.,
437 Coimbra, R. S., & Rodrigues, M. R. (2016). A novel beer fermented by kefir enhances
438 antiinflammatory and anti-ulcerogenic activities found isolated in its constituents.
439 *Journal of Functional Foods*. 21, 58–69.<http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2015.11.035>
- 440 Romanin, D., Serradell, M., González, D. M., Lausada, N., Garrote, G. L., & Rumbo, M.
441 (2010). Downregulation of intestinal epithelial innate response by probiotic yeasts
442 isolated from kefir. *International Journal of Food Microbiology*, 140, 102–108.
443 <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.04.014>
- 444 Saad, S. M. I. *Probióticos e prebióticos em alimentos. Fundamentos e aplicações*
445 *tecnológicas*. 1. Ed. São Paulo, Livraria Varela, 2011.
- 446 Suriasih, K., Aryanta, W. R., Mahardika, G., & Astawa, N. M. (2012). Microbiological and
447 Chemical Properties of Kefir Made of Bali Cattle Milk. *Food Science and Quality*
448 *Management*.
449 [http://erepo.unud.ac.id/5915/1/ID1_19600318198503100118091312915publikasi-](http://erepo.unud.ac.id/5915/1/ID1_19600318198503100118091312915publikasi-suriasih-1.pdf)
450 [suriasih-1.pdf](http://erepo.unud.ac.id/5915/1/ID1_19600318198503100118091312915publikasi-suriasih-1.pdf)

- 451 Taş, T. K., Ekinçi, F. Y., & Guzel-Seydim, Z. B. (2012). Identification of microbial flora in
452 kefir grains produced in Turkey using PCR. *International Journal of Dairy Technology*,
453 65 (1): 126–131. DOI: 10.1111/j.1471-0307.2011.00733.x
- 454 Tomaselli, L.P.C., Pedroso, P. Z., Foppa, T., & De Oliveira, L. (2011). Viabilidade e
455 sobrevivência da bactéria *Bifidobacterium* em fluido gástrico simulado. *Evidência*, 11
456 (2), 7-14.
- 457 Uraz, G., Akkuzu, S., Özcan, S., & Sevima, I., (2012). Isolation of yeast from microflora of
458 kefir. *Abstracts / Journal of Biotechnology*. 16(1), p. 19–48.
459 DOI:10.1016/j.jbiotec.2012.07.119
- 460 Vinderola, C. G., Duarte, J., Thangavel, D., & Perdigón, G. (2005a). Immunomodulating
461 capacity of kefir. *Journal Dairy Reserch*, 72, 195-202,
462 <https://doi.org/10.1017/S0022029905000828>
- 463 Vinderola, C. G., Duarte, J., Thangavel, D., Perdigón, G., Farnworth, E., & Matar, C.
464 (2005b). Distal mucosal site stimulation by kefir and duration of the immune response.
465 *European Journal Inflammation*, 3, 63–73,
466 <http://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/1721727X0500300203>
- 467 Vinderola, C. G., Perdigón, G., Duarte, J., Thangavel, D., G., Farnworth, E., & Matar, C.
468 (2006). Effects of kefir fractions on innate immunity. *Immunobiology*, 211, 149–156,
469 2006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2005.08.005>
- 470 Weschenfelder, S.; Wiest, J. M.; & Carvalho, H. H. C. (2009). Atividade anti-*Escherichia coli*
471 em kefir e soro de kefir tradicionais. *Revista do Instituto de Laticínios “Cândido*
472 *Tostes”*, 34 (367/368), 48-55. <https://www.revistadoilct.com.br/rilct/article/view/80/85>
- 473 White, T. J., Bruns, T. D., Lee, S. B. & Taylor, J. W. Amplification and direct sequencing of
474 fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics in PCR Protocols. eds Innis MA,
475 Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (San Diego: Academic Press), pp. 315–322. 1990.
- 476 Wouters, J. T. M., Ayad, E. H., Hugenholtz, J., & Smit, G. (2002). Microbes from raw milk
477 for fermented dairy products. *International Dairy Journal*, 12, 91–109.
478 [http://dx.doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00151-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00151-0)

**ADIÇÃO E ESTUDO DA SOBREVIVÊNCIA DE *Saccaromyces boulardii* –
17 EM SORVETE POTENCIALMENTE PROBIÓTICO**

Artigo em fase final de revisão pelos autores
(configurado conforme as normas da MDT)

ADIÇÃO E ESTUDO DA SOBREVIVÊNCIA DE *Saccharomyces boulardii* – 17 EM SORVETE POTENCIALMENTE PROBIÓTICO

CASSANEGO, D. B.; RICHARDS, N. S. P. S.

RESUMO A levedura probiótica *Saccharomyces boulardii* é utilizada desde os anos 50 para o controle e prevenção de uma gama de distúrbios diarreicos, porém, diferentemente das bactérias probióticas, que estão presentes em uma diversidade grande de alimentos, principalmente em derivados lácteos, tal levedura é comercializada apenas em forma de medicamento. Estudos vêm demonstrando que o sorvete pode ser uma boa matriz para os micro-organismos probióticos, entretanto, as pesquisas utilizam, comumente, bactérias probióticas e não há estudos com sorvetes utilizando leveduras probióticas. Neste contexto, este estudo teve como objetivo o desenvolvimento de um sorvete probiótico, utilizando como micro-organismo a levedura *S. boulardii*, proveniente do medicamento *Floratil*[®] (200 mg). Os resultados das análises físico-químicas e microbiológicas indicaram que as amostras de sorvete (SC – controle e SP – probiótico) estão de acordo com parâmetros preconizados pela legislação brasileira e assemelham-se com resultados encontrados na literatura. Quando avaliados os testes de sobrevivência da *S. boulardii*, observou-se que a mesma apresentou viabilidade por até 90 dias de armazenamento do sorvete, em temperatura de -18 °C. Os resultados mostraram que o sorvete é uma alternativa viável para a utilização da levedura *S. boulardii*, entretanto, há necessidade de mais estudos sobre o comportamento da levedura na matriz sorvete para que, posteriormente, o produto esteja sendo comercializado.

Palavras-chave: gelados comestíveis, Floratil, diarreia, levedura probiótica.

1. Introdução

Probióticos são micro-organismos vivos, os quais, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2001). A recomendação brasileira para alimentos probióticos baseia-se na porção diária de micro-organismos viáveis que devem ser ingeridos, sendo o mínimo estipulado de 10^8 a 10^9 UFC mL⁻¹ (unidade formadora de colônia) (ANVISA, 2008).

Os primeiros relatos clínicos, na literatura, para a utilização de probióticos foram em relação ao tratamento de doenças infecciosas, de origem viral ou bacteriana, diarreia associada a antibióticos, alívio de doenças inflamatórias intestinais crônicas, imunomodulação, redução do colesterol, diminuição do risco de câncer de cólon, melhora na digestão da lactose, e efeito sobre a microbiota intestinal (SAAD et al., 2013).

Devido ao grande interesse na utilização de probióticos e também, pelo estímulo da Organização Mundial da Saúde (OMS) na utilização dessa alternativa ao uso dos antibióticos, grandes laboratórios e centros de pesquisas vêm investindo nesta linha de pesquisa (MARTINS et al., 2013).

Dentre os micro-organismos probióticos, as bactérias ácido lácticas (BALs), como *Lactobacillus*, compreendem os gêneros mais importantes e estudados, porém algumas leveduras, como a *S. boulardii*, também podem ser utilizadas para essa finalidade (SAAD et al., 2013). A levedura *S. boulardii* é praticamente a única comercializada na medicina integrativa, sendo um dos tipos de leveduras probióticas mais estudadas, uma vez que, de 1976 a 2015, foram realizados 90 ensaios controlados com a levedura *S. boulardii* que abrangeram 15 diferentes tipos de doenças (MCFARLAND, 2017).

A mesma vem sendo administrada desde a década de 50, para prevenção e tratamento de diarreia associada aos antibióticos, gastroenterite aguda em adultos e crianças, diarreia em pacientes alimentados por sonda, diarreia crônica em pacientes HIV-infectados e, tem sido considerada útil contra agentes enteropatogênicos (YI et al., 2016; MARTINS et al., 2005a; CZERUCKA et al. 2007; FLEET, 2007; PENNACCHIA et al., 2008).

Diferentemente das bactérias probióticas, que devem ser consumidas em quantidade mínimas, diariamente, a levedura *S. boulardii* é indicada como auxiliar na restauração da flora intestinal, onde a duração do tratamento pode variar de dias até seis meses e pode ser utilizada isolada ou com algum tratamento auxiliar, dependendo da indicação da doença (MCFARLAND, 2010).

Apesar de, tradicionalmente, ser administrada de forma oral, via medicamento, os autores Lourens-Hatting & Viljoen (2001) elaboraram iogurtes utilizando a *S. boulardii* como probiótico, e observaram que a mesma tem a capacidade de multiplicação nessa matriz, atingindo contagens superiores a 10^7 UFC.g⁻¹, considerado resultado satisfatório, entretanto, a produção excessiva de gás e álcool pela espécie dificulta a incorporação destes micro-organismos neste tipo de derivado lácteo.

Iogurtes e leites fermentados constituem 90% dos produtos no mercado probióticos (COUSIN et al., 2012). No entanto, novos produtos estão sendo introduzidos no mercado

internacional como fontes de probióticos, tais como sobremesas à base de leite, leite em pó para recém-nascidos, sorvetes, manteigas, maioneses, vários tipos de queijos, produtos sob a forma de cápsulas ou em pó, para ser dissolvido em bebidas geladas e alimentos fermentados de origem vegetal são alguns exemplos de alimentos que podem conter probióticos (CHAMPAGNE et al., 2005; KOMATSU et al., 2008; SAAD, 2006).

A indústria alimentícia está buscando constantemente, fornecer alimentos funcionais saudáveis para satisfazer a crescente demanda dos consumidores (PARUSSOLO et al., 2017). A matriz de sorvete pode ser um bom veículo para culturas probióticas, devido à sua composição, que inclui proteínas do leite, gorduras e lactose, bem como outros compostos (vitaminas e sais minerais) (CRUZ et al., 2009).

De acordo com Eduardo Weisberg, presidente da Associação Brasileira das Indústrias e do Setor de Sorvetes (ABIS), nos anos de 2015 e 2016, houve uma queda muito forte no setor, devido a problemas econômicos, resultando em uma grande crise, no setor dos sorvetes, todavia há muitas opções para o empreendedor investir, os sorvetes com foco funcional, que estão se tornando uma tendência mundial (DUARTE, 2017).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelece, até o momento, que sorvetes não podem entrar na classificação de alimentos funcionais devido ao seu consumo esporádico e alto valor calórico, entretanto, no mercado internacional, a produção e comercialização de sorvetes com culturas probióticas já é uma realidade (ANVISA, 2008).

Pesquisas vêm demonstrando que o sorvete pode ser um veículo adequado para micro-organismos probióticos, alguns exemplos são os estudos realizados por Alamprese et al. (2002, 2005); Basyigit et al. (2006); Homayouni et al. (2008); Cruxen & Hoffmann (2017); Nadelman et al. (2017); Chaikham, & Rattanasena (2017); Góral et al. (2018), entre outros. Entretanto, os probióticos utilizados para a elaboração destes sorvetes são, em sua grande maioria, bactérias.

Tendo em vista o interesse por leveduras probióticas, bem como o fato de pesquisadores estarem promovendo estudos utilizando o sorvete como uma nova matriz probiótica, este estudo tem como objetivo a elaboração de sorvete com a adição da levedura probiótica *Saccharomyces boulardii* - 17.

2. Materiais e métodos

A elaboração dos sorvetes controle (SC) e sorvete probiótico, com adição de *Saccharomyces boulardii* (SP) bem como as análises físico-químicas e microbiológicas foram realizadas no Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

2.1 Elaboração de sorvete com leveduras liofilizadas

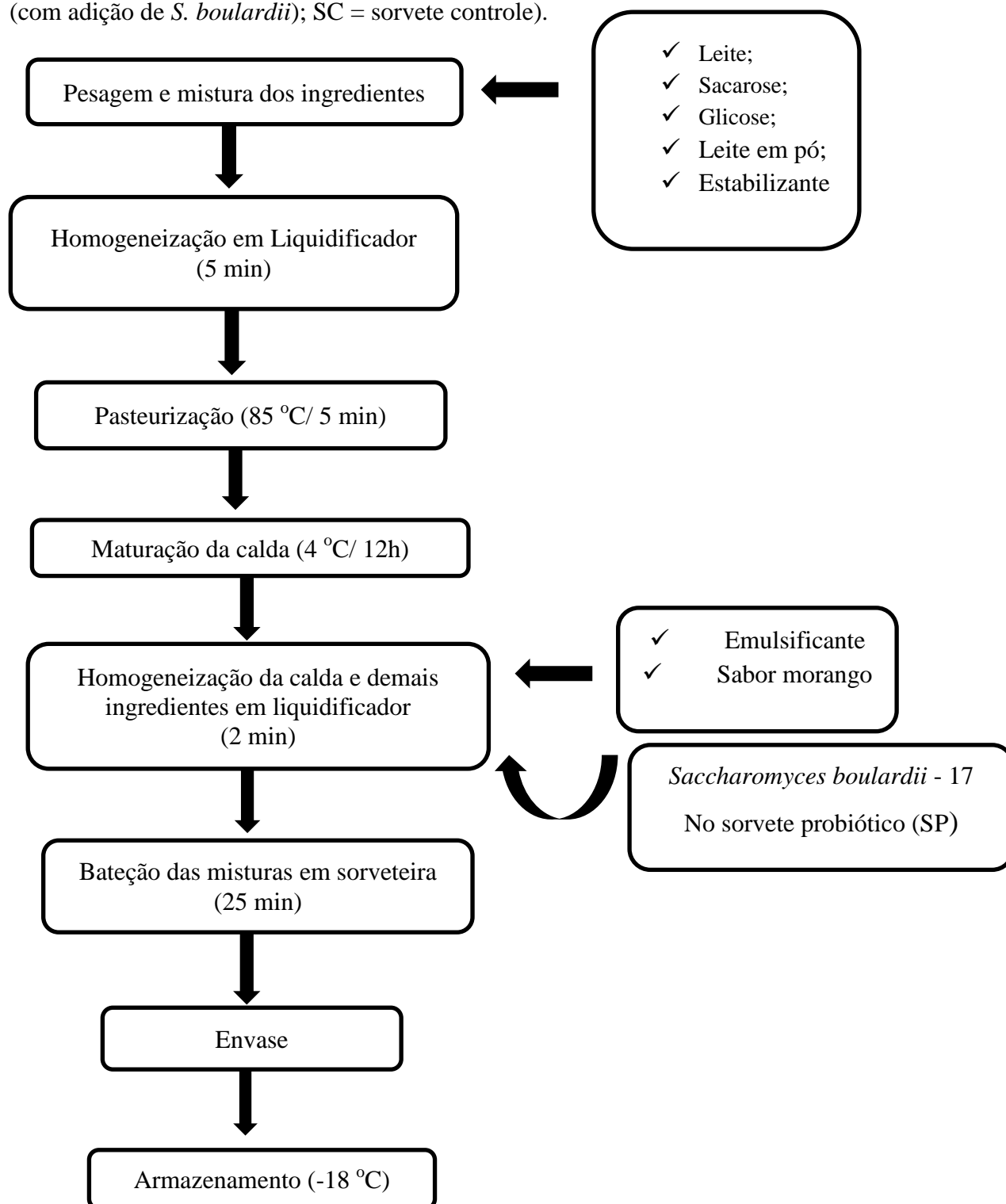
Para a elaboração das amostras de sorvetes [controle (SC) e probiótico (SP)] a metodologia de Frighetto (2012), foi adotada, na qual para a elaboração da calda, os ingredientes foram proporcionalmente pesados e dissolvidos em 1 L de leite UHT (Elegê®, integral). A formulação básica dos sorvetes incluiu 18 g L⁻¹ de sacarose (União®), 7 g L⁻¹ de glicose, 7,5 g L⁻¹ de creme de leite pasteurizado com 41% de gordura (Nestlé®), 7,5 g L⁻¹ de leite em pó desnatado (Elegê®) e 1 g L⁻¹ de estabilizante (açúcar, espessante goma guar e carboximetilcelulos) e emulsificante (Super Liga Neutra, Duas Rodas Industrial Ltda., Jaraguá do Sul, Brasil).

As misturas foram homogeneizadas em liquidificador semi-industrial por 5 min e pasteurizadas a 85 °C por 5 minutos, e, a seguir, resfriadas e mantidas em temperatura de 4 °C por 12 horas para a maturação da calda. Após o período de maturação a calda foi homogeneizada, novamente, em liquidificador semi-industrial por 2 min, com adição de 1 g L⁻¹ de emulsificante (monoglicerídeos de ácidos graxos, monoesterato de sorbitana, polioxietileno de monoesterato de sorbitana e conservante sorbato de potássio), (Emustab®, Duas Rodas Industrial Ltda., Jaraguá do Sul, Brasil) e 2 g L⁻¹ de flavorizante morango (Duas Rodas Industrial Ltda., Jaraguá do Sul, Brasil).

Na amostra de sorvete probiótico (SP), foi adicionada, na segunda etapa de homogeneização, a levedura, proveniente do medicamento *Floratil*® (200 mg), no qual cada cápsula continha 200 mg de *Saccharomyces boulardii* -17 liofilizado (200 mg de liofilizado contém no mínimo 1 . 10⁹ UFC de *Saccharomyces boulardii* -17) e excipientes (estearato de magnésio e lactose). A cápsula do medicamento foi aberta para que seu conteúdo fosse então, homogenizado em conjunto com a calda do sorvete, emustab e o flavorizante morango. As misturas foram colocadas em Sorveteira dupla Flavor Duo™ Série ICE-40 (Cuisinart®, Stamford, USA) por 25 minutos onde sofreram o congelamento. Posteriormente, foram embaladas em potes apropriados para sorvetes e mantidas em freezer, para o

endurecimento e armazenamento, à $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, até a realização das análises. Para a elaboração das amostras, foram adotadas as boas práticas de fabricação, para que sua qualidade fosse garantida. O fluxograma de elaboração dos sorvetes está apresentado na Figura 1.

FIGURA 1: Fluxograma da elaboração das amostras de sorvetes (SP = sorvete probiótico (com adição de *S. boulardii*); SC = sorvete controle).



2.2 Análises físico-químicas dos sorvetes

Depois de elaboradas, as amostras de sorvetes foram submetidas às análises físico-químicas de umidade, extrato seco total, cinzas, proteína, gordura, pH e densidade aparente. As análises foram realizadas em triplicatas, no dia posterior ao desenvolvimento das amostras de sorvete. O teor de umidade foi estimado por meio de aquecimento direto em estufa com circulação forçada de ar a 105 °C, até obtenção de peso constante, o extrato seco total foi determinado por diferença (EST = 100 – umidade) (IAL, 2008). A fração de cinzas foi obtida, gravimetricamente, avaliando-se a perda de peso do material submetido ao aquecimento a 550 °C em mufla (AOAC, 2007).

Para determinação da gordura, o método proposto por Bligh & Dyer (1959) foi adotado, com correção para o teor de umidade de cada tratamento. A fração protéica foi estimada pelo método de Kjeldahl, com fator de correção 6,38 AOAC (2007). O valor de pH foi obtido em potenciômetro digital (Digimed, modelo DM - 22, SPLabor, Presidente Prudente, SP, Brasil) previamente calibrado com soluções tampões com pH de 4,0 e 7,0 como previsto pelo fabricante. A densidade aparente dos sorvetes foi obtida pesando-se um litro de sorvete (IAL, 2008).

2.3 Avaliação microbiológica

Segundo a RDC n° 12 de 2 de janeiro de 2001, da Anvisa, (BRASIL, 2001) as análises microbiológicas obrigatórias para a avaliação das condições higiênico-sanitárias de fabricação de sorvetes são coliformes totais, *Staphylococcus* coagulase positiva e *Salmonella*. Estas análises foram realizadas segundo metodologia da Instrução Normativa n° 62 do MAPA (BRASIL, 2003). Realizou-se a contagem de leveduras a partir da incubação em meio YM (0,3% extrato de levedura, 0,3% extrato de malte, 0,5% peptona, 1% glicose, 2% ágar, 0,04% cloranfenicol em pH: 4,0) (MATTANNA et al., 2014). Todas as análises foram realizadas em triplicata, no dia posterior à elaboração das amostras de sorvete.

2.4 Avaliação da sobrevivência da levedura durante o armazenamento do sorvete

Para a avaliação da sobrevivência das leveduras no sorvete foram realizadas análises microbiológicas nos dias 01, 07, 15, 30, 45, 60, 75, 90 e 120. As amostras de sorvete foram diluídas em água peptonada, até 10^{-12} , e realizou-se o plaqueamento em superfície, em meio YM. As placas de Petri foram incubadas por 48 a 78 horas em estufa a 28 °C (MATTANNA et al., 2014). A contagem de leveduras da cápsula utilizada para a elaboração do sorvete também foi avaliada pela mesma metodologia.

2.5 Análises estatísticas

Os dados das análises físico-químicas e microbiológicas foram analisados pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de significância a partir do programa estatístico Statistica® 7.0 for Windows.

3. Resultados e discussão

3.1 Resultados das análises físico-químicas dos sorvetes

Sorvetes enquadram-se na legislação brasileira de gelados comestíveis que os define como: produtos congelados obtidos a partir de uma emulsão de gorduras e proteínas; ou de uma mistura de água e açúcar (es), podendo ser adicionados de outro(s) ingrediente(s) desde que não descaracterize(m) o produto (BRASIL, 2005).

Para a elaboração de sorvetes, deve-se definir a composição de sólidos, bem como a proporção de gordura em relação aos sólidos não gordurosos do leite (SNGL), sendo esse um parâmetro determinante para tal derivado lácteo (CRUZ et al., 2011). Os resultados das análises físico-químicas do sorvete estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Resultados das análises físico-químicas realizadas nas duas amostras de sorvetes. Santa Maria, RS, 2017.

Amostras	Umidade (g 100 ⁻¹)	EST (g 100 ⁻¹)	Cinzas (g 100 ⁻¹)	Proteína (g 100 ⁻¹)	Gordura (g 100 ⁻¹)	pH	Densidade aparente (g L ⁻¹)
SP	71,58 ± 0,36a*	28,41 ± 0,89b	0,77 ± 0,54a	2,80 ± 0,08a	6,15 ± 0,74 a	6,33 ± 0,27 a	525,22 a
SC	70,69 ± 0,12 b	29,31 ± 0,43 a	0,76 ± 0,27a	2,71 ± 0,65b	6,14 ± 0,13 a	6,26 ± 0,19 b	513,98 b
Cv%	0,06	0,16	1,89	13,10	16,2	0,15	6,34

SP = sorvete probiótico (com adição de *S. boulardii*); SC = sorvete controle; Cv = coeficiente de variação; *Médias na mesma coluna com diferentes sobrescritos diferem significativamente ($p < 0,05$);

No Brasil, não há classificação de sorvetes, e os teores de gordura e sólidos variam bastante de região para região, em função, principalmente, do clima e consumidores (RENHE et al., 2015).

Boff et al. (2013) desenvolveram sorvete de chocolate utilizando fibra de casca de laranja como substituto de gordura encontraram valores semelhantes ao do presente artigo em relação ao teor de umidade ($\pm 70 \text{ g } 100^{-1}$) e extrato seco ($\pm 30 \text{ g } 100^{-1}$).

Os valores encontrados de cinzas ($0,77 \text{ g } 100^{-1}$ (SP) e $0,76 \text{ g } 100^{-1}$ (SC)) foram semelhantes aos observados por Pazianotti et al (2010) em amostras de sorvetes artesanais e industriais comercializados na região de Arapongas-PR, onde os valores variaram de 0,6 a $0,91 \text{ g } 100^{-1}$, dependendo do tipo de sorvete.

Estudos mostraram que a quantidade de proteína no sorvete varia, tradicionalmente, de 2,5 a $4,5 \text{ g} \cdot 100^{-1}$ (DA SILVA et al., 2014; ERKAYA, & SENGÜL, 2012), os resultados encontrados de 2,8 e $2,7 \text{ g} \cdot 100^{-1}$ corroboram com os citados pelos autores.

A gordura do sorvete não só contribui para a textura, sensação bucal e sabor, mas também serve como um elemento estrutural (ROLON et al., 2017). Teores próximos aos encontrados para este parâmetro podem ser observados em estudo realizado por Góral et al. (2018) em sorvetes também, probióticos, onde os valores de gordura variaram entre 5,19 e $5,64 \text{ g } 100^{-1}$.

Sorvetes não fermentados apresentam pH próximo a 6,5, e não sofrem pós acidificação e nem redução do pH durante o armazenamento, sendo esse fato decorrente da temperatura de estocagem ($-18 \text{ }^{\circ}\text{C}$) (ALAMPRESE et al., (2002; 2005)), valores semelhantes ao encontrado no presente estudo.

De acordo com a Portaria nº 379, de 26 de abril de 1999, a densidade aparente de gelados comestíveis é de, no mínimo, $475 \text{ g } \text{L}^{-1}$, tendo em vista este valor, os sorvetes elaborados estão de acordo com o preconizado pela portaria que estabelece parâmetros para gelados comestíveis.

Pode-se observar algumas diferenças estatísticas na composição centesimal dos sorvetes, tais resultados podem ser explicados pelo conteúdo da cápsula adicionada ao sorvete probiótico (SP), pois, (200 mg de liofilizado contém no mínimo $1 \cdot 10^9 \text{ UFC/g}$ de *Saccharomyces boulardii* -17) e excipientes (estearato de magnésio e lactose). O sorvete probiótico (SP) apresentou menor teor de extrato seco, mesmo com a utilização da cápsula na sua formulação, uma das alternativas para esse resultado é o fato de que, provavelmente, as leveduras possam ter consumido algum nutriente do sorvete para sua manutenção.

Sabe-se que a parede celular das leveduras é, também, formada por proteínas, tal fato explica um pequeno aumento do teor de proteínas no sorvete probiótico, em relação ao sorvete tradicional.

3.2 Resultados das análises microbiológicas das amostras de sorvetes

O controle microbiológico de sorvetes é de fundamental importância e por não sofrer qualquer processo de esterilização após seu preparo final, como acontece com outros alimentos, pode ser um veículo de disseminação de micro-organismos causadores de toxinfecções (OLIVEIRA, 2012).

A falta de conhecimento leva, por exemplo, ao julgamento errôneo de que esses derivados lácteos, por serem congelados, não apresentam risco microbiológico à saúde do consumidor (RENHE et al., 2015).

Os valores obtidos estão de acordo com o Regulamento Técnico Sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos (RDC Nº 12, de 02 de janeiro de 2001) o qual estabelece ausência de *Salmonella*, contagem máxima para coliformes termotolerantes de $5,0 \cdot 10$ UFC g^{-1} e de $5,0 \cdot 10^2$ UFC g^{-1} para *Staphylococcus* coagulase positiva em gelados comestíveis e produtos especiais gelados a base de leite e produtos lácteos (sorvetes e picolés com ou sem cobertura, sanduíche e bolo de sorvete) e similares. Os resultados das análises microbiológicas elaboradas nos sorvetes estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Resultados das análises microbiológicas de amostras de sorvete.

Amostras	Coliformes totais UFC/g	Coliformes termotolerantes UFC/g	<i>Salmonella</i> UFC/g	<i>Staphylococcus</i> UFC/g	Leveduras UFC/g
SP	$7,0 \cdot 10^3$ a	$< 1,0 \cdot 10^{-1}$	Ausente	$< 1,0 \cdot 10^{-1}$	$6,9 \cdot 10^{10}$ a
SC	$1,5 \cdot 10^2$ b	$< 1,0 \cdot 10^{-1}$	Ausente	$< 1,0 \cdot 10^{-1}$	$5,1 \cdot 10^1$ b

SP = sorvete probiótico (com adição de *S. boulardii*); SC = sorvete controle, *Médias na mesma coluna com diferentes sobrescritos diferem significativamente ($p < 0,05$);

Resultados semelhantes aos encontrados em relação à *Salmonella* e *Staphylococcus* coagulase positiva foram observados por Parussolo et al, (2017) em sorvetes simbióticos elaborados com yacon (*Smallanthus sonchifollius*) e *Lactobacillus acidophilus* NCFM, entretanto os autores observaram contagens baixas de coliformes termotolerantes, mas ainda de acordo com a RDC Nº 12, de 02 de janeiro de 2001.

Os resultados satisfatórios da análise microbiológica indicam que as boas práticas de fabricação (BPF) foram empregadas de maneira eficiente, a ponto de não haver contaminação de coliformes termotolerantes, *Salmonella* e *Staphylococcus* coagulase positiva.

Em relação às leveduras, observa-se que o sorvete probiótico (SP) obteve contagens de $6,9 \cdot 10^{10}$ UFC/g, considerado satisfatório, uma vez que a Agência Nacional de Vigilância Sanitária estipulada o consumo de 10^8 a 10^9 UFC/g de probióticos por dia (ANVISA, 2008). Esse resultado mostra, que apesar do processamento e congelamento da levedura *Saccharomyces boulardii* -17, a mesma mantém-se viável após essas etapas críticas para possíveis injúrias às células.

3.2 Resultados da avaliação da sobrevivência da *Saccharomyces boulardii* no sorvete probiótico

A contagem inicial de *Saccharomyces boulardii* na cápsula de *Floratil*[®] (200 mg) foi de $2,04 \cdot 10^{14}$ UFC/g, o fabricante descreve, na bula do medicamento, que em uma cápsula contém, no mínimo, $1 \cdot 10^9$ UFC/g, o que foi constatado na análise. Em estudo realizado por McFarland (2010) foi verificado que tal medicamento, *Floratil*[®], contém altas contagens de *Saccharomyces boulardii* e mantém altos níveis de contagem mesmo após seis meses de armazenamento. Os resultados da avaliação da sobrevivência da *Saccharomyces boulardii* - 17 no sorvete probiótico estão representados na Tabela 3.

Tabela 3: Avaliação da sobrevivência da *Saccharomyces boulardii* - 17 no sorvete probiótico.

Dias	01	07	15	30	45	60	75	90	120
Contagem	$6,9 \pm$	$5,1 \pm$	$1,7 \pm$	$9,9 \pm$	$5,9 \pm$	$7,5 \pm$	$2,3 \pm$	$6,4 \pm$	$4,8 \pm$
UFC/g	0,14	0,71	0,65	0,89	1,29	1,54	0,47	1,71	0,36
	10^{10}	10^9	10^9	10^8	10^8	10^7	10^6	10^6	10^5

Avaliação da sobrevivência da levedura *Saccharomyces boulardii* nos dias, 01, 07, 15, 30, 45, 60, 75, 90 e 120 de armazenamento do sorvete probiótico a -18°C .

Pesquisas vêm demonstrando que o sorvete pode ser um veículo adequado para micro-organismos probióticos, um exemplo são os estudos realizados por Alamprese et al. (2002, 2005) onde avaliaram a influência de *Lactobacillus johnsonii* La1 e de *L. rhamnosus* GG em sorvetes com diferentes formulações, com variações nas quantidades de açúcar e de gordura. Elevadas taxas de sobrevivências dos probióticos durante o armazenamento dos produtos

foram encontradas, por, respectivamente, oito meses e 365 dias, sem decréscimo na população inicialmente inoculada (7 e 8 log UFC g⁻¹, respectivamente). As propriedades tecnológicas não foram influenciadas pela presença dos probióticos em ambos os estudos.

Basyigit et al. (2006) também estudaram o sorvete como veículo de probióticos, e testaram uma mistura de cepas de *Lactobacillus acidophilus*, *L. agilis* e *L. rhamnosus*, de origem humana e verificaram que a viabilidade dos probióticos não foi alterada durante o armazenamento de sorvete, por até seis meses, independentemente da presença de açúcar ou aspartame como edulcorantes. A sobrevivência de *Lactobacillus acidophylus* durante 150 dias de armazenamento de sorvete simbiótico foi verificada por Parussolo et al. (2017), o micro-organismo permaneceu viável, com contagem maior do que 10⁷ UFC/g durante esse período.

Em estudo recente, Cruxen & Hoffmann (2017) elaboraram sorvete probiótico de *Butiá odorata*, utilizando como micro-organismo a bactéria *Bifidobacterium lactis*, e constataram que, a bactéria probiótica permaneceu viável (acima de 10⁶ UFC/g) à temperatura de armazenamento do sorvete (-18 °C), durante os 90 dias de análises. Da Silva et al. (2015), avaliaram a sobrevivência do mesmo micro-organismo probiótico durante o armazenamento de sorvete de leite de cabra e constataram que a *Bifidobacterium lactis*, após 120 dias de armazenamento em temperatura de congelamento, apresentou uma taxa de sobrevivência de 84,7%.

Góral et al. (2018) elaboraram sorvete probiótico com as bactérias potencialmente probióticas *Lactobacillus rhamnosus* B 442, *Lactobacillus rhamnosus* 1937 e *Lactococcus lactis* JBB 500 e as enriqueceram com íons de magnésio usando Campos Elétricos Pulsados, e também comprovaram a sobrevivência destes micro-organismos na matriz sorvete.

Como pode-se observar, os estudos com sorvetes probióticos utilizam, como micro-organismos, bactérias, diferindo então, do objetivo deste estudo, que foi elaborar um sorvete utilizando a levedura *S. boulardii* como micro-organismo probiótico. Apesar desse agente ser administrado de forma liofilizada e sem a possível proteção de uma cápsula, por exemplo (CANDELLI et al, 2003; CHAMPAGNE et al, 2015) os resultados mostraram a capacidade de sobrevivência da levedura em matriz sorvete durante 90 dias, à temperatura de -18 °C, como pode ser observado na Tabela 3.

Pardo et al. (2008) avaliaram a sobrevivência da *Saccharomyces boulardii* em condições de congelamento e descongelamento e obtiveram resultados negativos, sendo que houve uma redução drástica da sobrevivência das células, entretanto, estes testes não foram realizados com leveduras liofilizadas e nem adicionadas a algum alimento.

4. CONCLUSÃO

Apesar do sorvete, no Brasil, não ser considerado um alimento funcional, com os resultados obtidos, observa-se que o uso de *Saccharomyces boulardii* na elaboração de um sorvete probiótico é viável do ponto de vista físico-químico, microbiológico e pela capacidade de sobrevivência da levedura durante o armazenamento. Tendo em vista os resultados obtidos e a gama de estudos relacionados aos sorvetes probióticos, bem como o interesse sobre os benefícios trazidos à saúde pela levedura *Saccharomyces boulardii*, conclui-se que o desenvolvimento de um alimento inovador, como o proposto pela pesquisa é um início para novos estudos sobre o assunto.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAMPRESE, C. et al. Effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG addition in ice cream. **International Journal Dairy Technol.**, v.58, p.200-206, 2005.

ALAMPRESE, C. et al. Survival of *Lactobacillus johnsonii* La1 and influence of its addition in retail-manufactured ice cream produced with different sugar and fat concentrations. **International Dairy Journal**, v.12, p.201-208, 2002.

APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION **Committee on microbiological methods for foods. Compendium of methods for the microbiological examination of foods.** 4. ed. Washington: APHA, 2001. 676p.

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos: lista de alegações de propriedades funcionais aprovadas.** Atualizado em julho de 2008.

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Regulamento Técnico Sobre Padrões Microbiológicos Para Alimentos.** Resolução-RDC Nº 12, De 02 De Janeiro De 2001.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis**. EUA: Goithersburg, 2007.

BASYIGIT, G. et al. Viability of human-derived probiotic lactobacilli in ice cream produced with sucrose and aspartame. **Journal Microbiology Biotechnology**, v.33, p.796-800, 2006.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J.; CAN. J. **Biochemical Physiology** v.37, p.911, 1959.

BOFF, C. C. et al. Desenvolvimento de sorvete de chocolate utilizando fibra de casca de laranja como substituto de gordura. **Ciência Rural**. v. 43 n.10. 2013.

BRASIL, Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 266, de 22 de setembro de 2005. **Aprova o regulamento gelados comestíveis e preparados para gelados comestíveis**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 23 de set. 2005.

BRASIL. Ministério Da Agricultura, Pecuária E Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária (DISPOA). Instrução Normativa nº62, de 26 de agosto de 2003. **Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água**. Diário Oficial da União, Brasília, 26 de agosto de 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. **Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF. 10 jan. 2001.

CANDELLI, M. et al. Saccharomyces cerevisiae-associated diarrhea in an immunocompetent patient with ulcerative colitis. **Journal of Clinical Gastroenterology**. v. 36, p. 39-40. 2003.

CHAIKHAM, P., RATTANASENA, P. Combined effects of low-fat ice-cream supplemented with probiotics on colon microfloral communities and their metabolites during fermentation in a human gut reactor. **Food Bioscience**, v. 17, p. 35-41, 2017.

CHAMPAGNE, C. P. et al. Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 45, n. 1, p. 61–84, 2005.

CHAMPAGNE, P. C. Effects of storage conditions, microencapsulation and inclusion in chocolate particles on the stability of probiotic bacteria in ice cream. **International Dairy Journal**. v. 47, p. 109-117. 2015.

COUSIN, F. J. et al. The first dairy product exclusively fermented by *Propionibacterium freudenreichii*: A new vector to study probiotic potentialities in vivo. **Food Microbiology**, v. 32, p. 135-146, 2012.

CRUXEN, C. E. S., HOFFMANN, G. F. Probiotic butia (*Butia odorata*) ice cream: development, characterization, stability of bioactive compounds, and viability of *Bifidobacterium lactis* during storage. **LWT - Food Science and Technology**. v. 75, p. 379-385, 2017.

CRUZ, A. G. et al. Ice-cream as a probiotic food carrier. **Food Research International**, v. 42, p. 1233-1239, 2009.

CRUZ, A. G. et al. Sorvetes probióticos e prebióticos. In: SAAD, S. M. I.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F. (Org.). **Probióticos e prebióticos em alimentos: Fundamentos e Aplicações Tecnológicas**. São Paulo: Livraria Varela. cap 15, p. 359-388. 2011.

CZERUCKA, D. et al. Review article: yeast as probiotics – *Saccharomyces boulardii*. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, v. 26, n. 767–778, 2007.

DA SILVA, P. D. L. et al. Potentially probiotic ice cream from goat's milk: Characterization and cell viability during processing, storage and simulated gastrointestinal conditions. **LWT - Food Science and Technology**, v. 62, n.1, p. 452-457. 2014.

DUARTE, D. **Confira as tendências para o mercado de sorvetes. Eduardo Weisberg, presidente da ABIS, dá um panorama do setor no Brasil.** <http://revistapegn.globo.com/Administracao-de-empresas/noticia/2017/06/confira-tendencias-para-o-mercado-de-sorvetes.html>. Acesso em 05/09/2017.

ERKAYA, T., et al. Influence of Cape gooseberry (*Physali peruviana* L.) addition on the chemical and sensory characteristics and mineral concentrations of ice cream. **Food Research International**, v. 45, n.1, p. 331- 335. 2012.

FAO / WHO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**. Córdoba, 2001. 56p.

FLEET, G. H. Yeasts in foods and beverages: impact on product quality and safety. **Curr. Opin. Biotechnol.** v.18, p. 170–175, 2007.

FRIGHETTO, J. M. **Produção de sorvetes com características simbióticas e avaliação da sobrevivência de *Lactobacillus paracasei* em condições gastrointestinais**. Dissertação de Mestrado. Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos pela Universidade Federal de Santa Maria, 2012.

GÓRAL, M. ET AL. Magnesium enriched lactic acid bacteria as a carrier for probiotic ice cream production. **Food Chemistry**. v. 239. P. 1151-1159. 2018.

HOMAYOUNI, A. et al. Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. **Food Chemistry**, v. 111, p. 50–55, 2008.

IAL, Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 1^a edição digital. São Paulo. 2008, 1020 p.

KOMATSU, T. R. et al. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 3, 2008.

LOURENS-HATTINGH, A. et al., Growth and survival of a probiotic yeast in dairy products. **Food Research International**. v. 34, n. 9, p. 791-796, 2001.

MARTINS, F. S. et al. Screening of yeasts as probiotic based on capacities to colonize the gastrointestinal tract and to protect against enteropathogen challenge in mice. **Journal Gen. Appl. Microbiol**, v. 51, p. 83-92, 2005.

MARTINS, F. S., et al. Inhibition of tissue inflammation and bacterial translocation as one of the protective mechanisms of *Saccharomyces boulardii* against *Salmonella* infection in mice. **Microbes and Infection**, v. 15, p. 270-279, 2013.

MATTANNA, P. et al. Lipid profile and antimicrobial activity of microbial oils from 16 oleaginous yeasts isolated from artisanal cheese. **Revista Brasileira de Biociências (Impresso)**, v. 12, p. 121-126, 2014.

MCFARLAND, L. V. **Chapter 18 – Common Organisms and Probiotics: *Saccharomyces boulardii***. The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology. Implications for Human Health, Prebiotics, Probiotics, and Dysbiosis. p. 145–164, 2017.

MCFARLAND, L. V. Systematic review and meta-analysis of *Saccharomyces boulardii* in adult patients. **World Journal Gastroenterology**. v. 16, n. 18, p. 2202-2222, 2010.

NADELMAN, P. et al. The performance of probiotic fermented sheep milk and ice-cream sheep milk in inhibiting enamel mineral loss. **Food Research International**, v. 97, p. 184-190. 2017.

OLIVEIRA, E. T. et al. **Avaliação Microbiológica de Sorvetes Comercializados nos Principais Supermercados de Maceió-AL**. Tecnologia em Laticínios. Instituto Federal de Alagoas. Maceió, 2012.

PARDO, S. et al. Estudios de la viabilidad y la vitalidad frente al congelado de la levadura probiótica *Saccharomyces boulardii*: efecto del precondicionamiento fisiológico. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 26, n. 2, p.155-160. 2009.

PARUSSOLO, G. et al. Synbiotic ice cream containing yacon flour and *Lactobacillus acidophilus* NCFM. **LWT - Food Science and Technology**, v. 82, p. 192 – 198, 2017.

PAZIANOTTI, L. et al. Características microbiológicas e físico-químicas de sorvetes artesanais e industriais comercializados na região de Araçatuba-PR. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, v. 65, nº 377, p. 15-20, 2010.

PENNACCHIA, C., et al. Isolation of *Saccharomyces cerevisiae* strains from different food matrices and their preliminary selection for a potential use as probiotics. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, p. 1919-1928, 2008.

RENHE, I. R. T., WEISBERG, E. CHELINI PEREIRA, D. B. C Indústria de gelados comestíveis no Brasil. **Informe Agropecuário, Belo Horizonte**, v.36, n.284, p.81-86, 2015.

ROLON, L. et al. Effect of fat content on the physical properties and consumer acceptability of vanilla ice cream. **Journal of Dairy Science**. v. 100, n. 7. p. 5217-5227. 2017.

SAAD, N. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic Field. **LWT - Food Science and Technology**. v. 50, p. 1-16, 2013.

TRIPATHI, M. K., GIRI, S. K. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. **Journal of functional foods**, v. 9, p. 225–241, 2014.

YI, S. H., JERNIGAN, J. A., MCDONALD, L. C. Prevalence of probiotic use among inpatients: a descriptive study of 145 U.S. hospitals. **American Journal of Infection Control**. v. 44, p. 548–553, 2016.

4 DISCUSSÃO GERAL

O kefir brasileiro é uma bebida fermentada, obtida pela incubação de leite ou uma solução de açúcar mascavo com grãos de kefir que contribuem para suas diferentes composições microbiológicas (ZANIRATI et al., 2015). Micro-organismos isolados do kefir com excelentes propriedades probióticas, além de alta resistência a condições ambientais adversas, foram amplamente pesquisados (LIMA et al., 2017). Estudo realizado por Zanirati et al. (2015) isolou e avaliou o potencial probiótico *in-vitro* de bactérias ácido-láticas de oito amostras de grãos de kefir que foram propagadas em soluções de leite ou açúcar de cinco locais diferentes no Brasil. Cinquenta e dois *Lactobacilli* isolados foram testados quanto à passagem ao suco gástrico, tolerância aos sais biliares, antagonismo contra patógenos, resistência antimicrobiana e hidrofobicidade superficial. Destas, apenas três cepas de *Lactobacillus* (*L. kefiranofaciens* 8U, *L. diolivorans* 1Z e *Lactobacillus casei* 17U) poderiam ser classificadas como probióticos potenciais.

A administração de leveduras probióticas oferece uma série de vantagens, em comparação com as bactérias, devido a características particulares como o maior tamanho das células (LIMA et al., 2017). Em trabalho realizado pelos mesmos autores, vinte e oito cepas de *Saccharomyces cerevisiae* foram isoladas, após a digestão *in vitro* de leite fermentado com kefir e identificadas. Foi realizada uma triagem para determinar requisitos de qualidade importantes para probióticos, incluindo: atividades antagônicas e antioxidantes, síntese de β -galactosidase, autoagregação, hidrofobicidade superficial e adesão a células epiteliais. Os resultados mostraram cepas com atividade antagonista contra patógenos microbianos, cepas capazes de produzir β -galactosidase; com níveis de atividade antioxidante superiores a 90%; com célere de hidrofobicidade e capacidade de autoagregação (avaliada por teste de adesão, onde todas as cepas apresentaram adesão às células epiteliais ileais dos camundongos). Essas descobertas, segundos os autores, são relevantes e as cepas devem ser indicadas para estudos *in vivo* adicionais, bem como para possíveis aplicações terapêuticas (LIMA et al., 2017).

Os testes de seleção *in vitro* têm sido comumente usados para prever propriedades funcionais de micro-organismos potencialmente probióticos. No entanto, a correlação dos resultados *in vitro* com o desempenho *in vivo* ainda não é clara. A falta de protocolos padronizados para estudos *in vitro* e *in vivo* dificulta a comparação do potencial probiótico de novas espécies e cepas. Existe, portanto, a necessidade de conduzir a seleção de potenciais probióticos de forma mais vigorosa e focar em estudos *in vitro* e *in vivo* bem definidos para

documentar benefícios para a saúde (VINDEROLA et al., 2017). Este pode ter sido um dos fatores de que nenhuma das cepas de leveduras isoladas no presente trabalho apresentou potencial probiótico, pois as mesmas foram avaliadas apenas pelas metodologias *in vitro*.

A levedura *Saccharomyces boulardii* é um dos tipos de probióticos mais estudados e foi considerado eficaz para uma grande diversidade de infecções. A eficácia mais sólida baseada em evidências é o tratamento de diarreia pediátrica, para prevenção de diarreia associada a antibióticos, para o tratamento de infecções por *Helicobacter pylori* e para a prevenção de efeitos colaterais associados aos tratamentos de erradicação de *H. pylori* (MCFARLAND, 2017). Embora seja comercializada como medicamento, há possibilidade da mesma ser inserida em alimentos probióticos, como sorvetes.

Os sorvetes são produtos alimentares que mostram potencial uso como veículos probióticos, com a vantagem de serem apreciados por pessoas pertencentes a todas as faixas etárias e níveis sociais. No entanto, o desenvolvimento de gelados contendo bactérias probióticas requer a superação de certos requisitos intrínsecos tecnológicos relacionados às etapas de processamento (CRUZ et al., 2009). Estudos demonstram a viabilidade de bactérias probióticas em sorvetes, entretanto, observou-se que a elaboração de um sorvete tendo o uso da levedura *S. boulardii* como micro-organismo probiótico é viável.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através de análises, foram atestadas as qualidades microbiológicas das amostras de kefir, isolou-se dezenove cepas de leveduras das seis amostras, pelos resultados encontrados, pode-se observar que as dezenove cepas de leveduras isoladas do kefir da cidade de Santa Maria, RS, totalizaram três espécies de leveduras, sendo elas: *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniospora uvarum* e *Kazachstania unispora*.

Ao realizar as análises do potencial probiótico, *in vitro*, das dezenove cepas, nenhuma foi capaz de passar pela digestão pancreática em número suficiente para serem consideradas potencialmente probióticas.

Com tais resultados, um novo passo foi dado e elaborou-se sorvete probiótico com a levedura já conhecida, *Saccharomyces boulardii*, sendo que a mesma ainda não é comercializada em conjunto a algum tipo de alimento, apenas na forma liofilizada.

A avaliação do sorvete probiótico mostrou que este derivado lácteo é uma matriz adequada para a utilização da levedura, uma vez que as mesmas mantiveram-se viáveis até 90 dias de armazenamento, podendo ser considerado um alimento inovador.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABGHARI, A. et al. Nonfermented ice cream as a carrier for *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus rhamnosus*. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 46, p. 84-92, 2011.

ABIS. **Associação Brasileira das Indústrias e do Setor de Sorvetes**. Disponível em: http://www.abis.com.br/estatistica_producaoconsumodesorvetesnobrasil.html. Acesso em: 04 set. 2017.

ALAMPRESE, C. et al. Effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG addition in ice cream. **International Journal Dairy Technol.**, v. 58, p. 200-206, 2005.

_____. Survival of *Lactobacillus johnsonii* La1 and influence of its addition in retail-manufactured ice cream produced with different sugar and fat concentrations. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 201-208, 2002.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde**. Resolução RDC N.º 2, de 7 de janeiro de 2002.

ARSLAN, S. et al. Microencapsulation of probiotic *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* with different wall materials by spray drying. **LWT - Food Science and Technology**. v. 63, n. 1, p. 685-690, 2015.

BASYIGIT, G. et al. Viability of human-derived probiotic lactobacilli in ice cream produced with sucrose and aspartame. **Journal Microbiology Biotechnology**, v. 33, p. 796-800, 2006.

BEVILACQUA, A. et al. Technological and spoiling characteristics of the yeast microflora isolated from Bella Di Cerignola table olives. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, p. 2198-2207, 2009.

BRASIL. Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 266, de 22 de setembro de 2005. **Aprova o regulamento gelados comestíveis e preparados para gelados comestíveis**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 23 de set. 2005.

CARNEIRO, R. P. **Desenvolvimento de uma cultura iniciadora para produção de kefir**. 2010. 143 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

CHAIKHAM, P.; RATTANASENA, P. Combined effects of low-fat ice-cream supplemented with probiotics on colon microfloral communities and their metabolites during fermentation in a human gut reactor. **Food Bioscience**, v. 17, p. 35-41, 2017.

CHEN, P. et al. Screening for potential new probiotic based on probiotic properties and α -glucosidase inhibitory activity. **Food Control**, v. 35, p. 65-72, 2014.

- CRUXEN, C. E. S.; HOFFMANN, G. F. Probiotic butia (*Butia odorata*) ice cream: development, characterization, stability of bioactive compounds, and viability of *Bifidobacterium lactis* during storage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 75, p. 379-385, 2017.
- CRUZ, A. G. et al. Ice-cream as a probiotic food carrier. **Food Research International**, v. 42, p. 1233-1239, 2009.
- _____. Sorvetes probióticos e prebióticos. In: SAAD, S. M. I.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F. (Org.). **Probióticos e prebióticos em alimentos: Fundamentos e Aplicações Tecnológicas**. São Paulo: Livraria Varela. cap 15, p. 359-388, 2011.
- DA SILVA, P. D. L. et al. Potentially probiotic ice cream from goat's milk: Characterization and cell viability during processing, storage and simulated gastrointestinal conditions. **LWT - Food Science and Technology**, v. 62, n. 1, p. 452-457, 2014.
- DERTLI, E.; ÇON, A. H. Microbial diversity of tradicional kefir grains and their role on kefir aroma. **LWT - Food Science and Technology**, v. 85, p. 151-157, 2017.
- DIOSMA, G. et al. Yeasts from kefir grains: isolation, identification, and probiotic characterization, **World J. Microbiol. Biotechnology**, v. 30, p. 43-53, 2014.
- DUARTE, D. **Confira as tendências para o mercado de sorvetes**. Eduardo Weisberg, presidente da ABIS, dá um panorama do setor no Brasil. Disponível em: <http://revistapegn.globo.com/Administracao-de-empresas/noticia/2017/06/confira-tendencias-para-o-mercado-de-sorvetes.html>. Acesso em: 05 set. 2017.
- FAO. WHO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**. Córdoba, 2001. 56p.
- _____. **CODEX Standard for Fermented Milks**. Codex Stan, second ed. 2003.
- FARNWORTH, E. R. Kefir – a complex probiotic. **Food Science e Technology Bulletin: Functional Foods**, v. 2, p. 1-17, 2005.
- _____. The evidence to support health claims for probiotics. **The Journal of Nutrition**, v. 138, p. 1250-1254, 2008.
- FERRAZ, J. L. et al. Sensory acceptance and survival of probiotic bacteria in ice cream produced with different overrun levels. **Journal of Food Science**, v. 71, p. 24-28, 2012.
- GÓRAL, M. et al. Magnesium enriched lactic acid bacteria as a carrier for probiotic ice cream production. **Food Chemistry**. v. 239, p. 1151-1159, 2018.
- GUZEL-SEYDIM, Z. et al. Kefir and koumiss: microbiology and technology. **Development and Manufacture of Yogurt and Functional Dairy Products**. Ed. Yildiz, p. 143-163, 2010.
- 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, p. 582-587, 2003.

HOMAYOUNI, A. et al. Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. **Food Chemistry**, v. 111, p. 50-55, 2008.

KESENKAS, H. et al. **Chapter 14 – Kefir**. Fermented Foods in Health and Disease Prevention, p. 339-361, 2017.

KOMATSU, T. R. et al. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 3, 2008.

LEITE, A. M. O. et al. Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage, **Brazilian Journal of Microbiology**, v.44, 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**, p. 1-8, 2017.

LOPITZ-OTSOA, F. et al. Kefir: A symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. **Rev Iberoamerican Micology**, v. 23, p. 67-74, 2006.

MCFARLAND, L. V. **Chapter 18 – Common Organisms and Probiotics: *Saccharomyces boulardii***. The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology. Implications for Human Health, Prebiotics, Probiotics, and Dysbiosis. p. 145-164, 2017.

_____. Systematic review and meta-analysis of *Saccharomyces boulardii* in adult patients. **World Journal Gastroenterology**. v. 16, n. 18, p. 2202-2222, 2010.

MIGUEL, M. G. C. P. et al. Diversity of bacteria present in milk kefir grains using culture-dependent and culture-independent methods. **Food Research International**, v. 42, p. 1523-1528, 2010.

MOHAMMADI, R. et al. Probiotic ice cream: Viability of probiotic bacteria and sensory properties. **Annals of Microbiology**, v. 61, p. 411 - 424. 2011.

NADELMAN, P. et al. The performance of probiotic fermented sheep milk and ice-cream sheep milk in inhibiting enamel mineral loss. **Food Research International**, v. 97, p. 184-190, 2017.

ORDÓÑEZ, J. A. et al. **Tecnologia de alimentos**: componentes dos alimentos e processos. Porto Alegre: Artmed, 2005. v. 1.

OTLES, S.; CAGINDI, O. Kefir: A probiotic Dairy-Composition, Nutritional and Therapeutic Aspects. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 2, p. 54-59, 2003.

PARDO, S. et al. Estudios de la viabilidad y la vitalidad frente al congelado de la levadura probiótica *Saccharomyces boulardii*: efecto del precondicionamiento fisiológico. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 26, n. 2, p.155-160, 2009.

PARUSSOLO, G. et al. Synbiotic ice cream containing yacon flour and *Lactobacillus acidophilus* NCFM. **LWT - Food Science and Technology**, v. 82, p. 192-198, 2017.

PLESSAS, S. et al. Bread making using kefir grains as baker's yeast. **Food Chemistry**, v. 93, p. 585-589, 2005.

POTHOULAKIS, C. Recent advances in *Saccharomyces boulardii* research. **Gastroentérologie Clinique et Biologique**, v. 34, n. 1, p. 62-70, 2010.

RANADHEERA, C. et al. In vitro analysis of gastrointestinal tolerance and intestinal cell adhesion of probiotics in goat's milk ice cream and yogurt. **Food Research International**, v. 49, p. 619-625, 2012.

RENHE, I. R. T. et al. Indústria de gelados comestíveis no Brasil. **Informe Agropecuário**, v. 36, n. 284, p. 81-86, 2015.

SAAD, S. M. I. et al. **Probióticos e prebióticos em alimentos. Fundamentos e aplicações tecnológicas**. 1. ed. São Paulo, Livraria Varela, 2011.

SARKAR, S. Potential of kefir as a dietetic beverage – a review. **British Journal of Nutrition**, v. 109, p. 280-290, 2007.

SATIR, G.; SEYDIM, B. G. How kefir fermentation can affect product composition? **Small Ruminant Reserch**. v. 134, p. 1-7, 2016.

TAS, T. B. K. K. et al. Identification of microbial flora in kefir grains produced in Turkey using PCR. **International Journal of Dairy Technology**, v. 65, n. 1, p. 126-131, 2012.

TRIPATHI, M. K.; GIRI, S. K. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. **Journal of functional foods**, v. 9, p. 225-241, 2014.

VASELJEVIC, T.; SHAH, N. P. Probiotics – from *Metchnikoff* to bioactives. **International Dairy Journal**, v.18, p. 714-728, 2008.

VINDEROLA, C. G. et al. Effects of kefir fractions on innate immunity. **Immunobiology**, v. 211, p. 149-156, 2006.

_____. Correlation between *in vitro* and *in vivo* assays in selection of probiotics from traditional species of bacteria. Review. **Trends in Food Science & Technology**. v. 68, p. 83-90, 2017.

WESCHENFELDER, S.; WIEST, J. M.; CARVALHO, H. H. C. Atividade anti-*Escherichia coli* em kefir e soro de kefir tradicionais. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, v. 34, n 367/368, p. 48-55, 2009.

WITTHUHN, R. C. et al. Impact of preservation and different packaging conditions on the microbial community and activity of kefir grains. **Food Microbiology**, v. 22, p. 337-344, 2004.

_____. Characterisation of the microbial population at different stages of Kefir production and Kefir grain mass cultivation. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 383-389, 2005.

WOUTERS, J. T. M. et al. Microbes from raw milk for fermented dairy products. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 91-109, 2002.

YANG, Y. et al. Proteomics evidence for kefir dairy in Early Bronze Age China. **Journal of Archaeological Science**, v. 45, p. 178-186, 2014.

YI, S. H. et al. Prevalence of probiotic use among inpatients: a descriptive study of 145 U.S. hospitals. **American Journal of Infection Control**, v. 44, p. 548-53, 2016.

ZANIRATI, D. F et al. Selection of lactic acid bacteria from Brazilian kefir grains for potential use as starter or probiotic cultures. **Anaerobe**, v. 32, p. 70-76, 2015.

ZOUMPOPOULOU, G. et al. Dairy probiotics: Beyond the role of promoting gut and immune health. **International Dairy Journal**, v. 67, p. 46-60, 2017.