UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

KLINGER VINÍCIUS DE ALMEIDA

VIABILIDADE MICROBIANA E PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE KEFIR DE ÁGUA ATOMIZADO E LIOFILIZADO

ALEGRE – ES
NOVEMBRO – 2023

KLINGER VINÍCIUS DE ALMEIDA

VIABILIDADE MICROBIANA E PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE KEFIR DE ÁGUA ATOMIZADO E LIOFILIZADO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Luciano José Quintão Teixeira
Coorientadora: Prof. Dra. Silvani Verruck

ALEGRE – ES

NOVEMBRO – 2023

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de
Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

---

de Almeida, Klinger Vinícius, 1995-
D278v Viabilidade microbiana e propriedades físico-químicas de kefir de água atomizado e liofilizado / Klinger Vinícius de Almeida. - 2023.
98 f. : il.

Orientador: Luciano José Quintão Teixeira.
Coorientadora: Silvani Verruck.
Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias.

1. Novos Produtos. 2. Bebidas Fermentadas. 3. Fermentação. 4. Secagem. 5. Veganismo. 6. Tecnologia de Alimentos. I. Quintão Teixeira, Luciano José. II. Verruck, Silvani. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. IV. Título.

CDU: 664

KLINGER VINÍCIUS DE ALMEIDA

¨VIABILIDADE MICROBIANA E PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE KEFIR DE ÁGUA ATOMIZADO E LIOFILIZADO¨

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Aprovada em 28 de novembro de 2023.

_____

Prof. Dr. Luciano José Quintão Teixeira
Universidade Federal do Espírito Santo -UFES
Orientador

_____

Prof. Dr. Sérgio Henriques Saraiva
Universidade Federal do Espírito Santo - UFES
Examinador Interno

_____

Prof. Dr. José Guilherme Prado Martin
Universidade Federal de Viçosa - UFV
Examinador Externo

Documento assinado eletronicamente nos moldes do art. 10 da MP 2200/01 e Lei 14063/20
[Hash SHA256] 9f66ef40ff86acf5448c41a7fa2394fb2294721792c72a558e3dede88c27c137

Datas e horários baseados em Brasília, Brasil
Sincronizado com o NTP.br e Observatório Nacional (ON) em 28/11/2023 às 18:34:20

Folha de Rosto Defesa Dissertação - Klinger Vinícius de Almeida

Data e Hora de Criação: 28/11/2023 às 18:29:05

Documentos que originaram esse envelope:
- Folha de Rosto Defesa Dissertação - Klinger Vinícius de Almeida^.pdf (Arquivo PDF) - 1 página(s)

Hashs únicas referente à esse envelope de documentos

[SHA256]: 9f66ef40ff86acf5448c41a7fa2394fb2294721792c72a558e3dede88c27c137
[SHA512]: 12cb03997f1755247cb34ef30bbfd0b1bb6b5b5f511cabe04df3cb1ab8ae787c9e6b657429c7221faf89638143b6948e85c730a85a65837b6e80695376d08e7b

Lista de assinaturas solicitadas e associadas à esse envelope

ASSINADO - José Guilherme Prado Martin (guilherme.martin@ufv.br)
Data/Hora: 28/11/2023 - 18:34:20, IP: 177.98.195.150
[SHA256]: af1bde7f4d588823c85074247b57f197169fc6af7f4a6db61d315a682675c08a

ASSINADO - Luciano José Quintão Teixeira (luqteixeira@yahoo.com.br)
Data/Hora: 28/11/2023 - 18:32:42, IP: 200.137.72.202, Geolocalização: [-20.759518, -41.531259]
[SHA256]: e4f87be05545870737650d16a329fa99542fc248caeeefaa1c9068be985e47a8

ASSINADO - Sérgio Henriques Saraiva (sergiohsaraiva@gmail.com)
Data/Hora: 28/11/2023 - 18:33:48, IP: 179.109.143.254, Geolocalização: [-20.755668, -41.531510]
[SHA256]: e57e9401d0f384c509da0a588e9a1fd6ed8550ddc784079e833dcf4e9fca15ff

Histórico de eventos registrados neste envelope

28/11/2023 18:34:20 - Envelope finalizado por guilherme.martin@ufv.br, IP 177.98.195.150
28/11/2023 18:34:20 - Assinatura realizada por guilherme.martin@ufv.br, IP 177.98.195.150
28/11/2023 18:34:13 - Envelope visualizado por guilherme.martin@ufv.br, IP 177.98.195.150
28/11/2023 18:34:11 - Envelope autenticado com Código de Acesso por guilherme.martin@ufv.br, IP 177.98.195.150
28/11/2023 18:33:48 - Assinatura realizada por sergiohsaraiva@gmail.com, IP 179.109.143.254
28/11/2023 18:33:38 - Envelope visualizado por sergiohsaraiva@gmail.com, IP 179.109.143.254
28/11/2023 18:33:34 - Envelope autenticado com Código de Acesso por sergiohsaraiva@gmail.com, IP 179.109.143.254
28/11/2023 18:32:42 - Assinatura realizada por luqteixeira@yahoo.com.br, IP 200.137.72.202
28/11/2023 18:32:37 - Envelope visualizado por luqteixeira@yahoo.com.br, IP 200.137.72.202
28/11/2023 18:32:36 - Envelope autenticado com Código de Acesso por luqteixeira@yahoo.com.br, IP 200.137.72.202
28/11/2023 18:32:10 - Envelope registrado na Blockchain por luciano.teixeira@ufes.br, IP 200.137.72.202
28/11/2023 18:32:09 - Envelope encaminhado para assinaturas por luciano.teixeira@ufes.br, IP 200.137.72.202
28/11/2023 18:29:05 - Envelope criado por luciano.teixeira@ufes.br, IP 200.137.72.202

Documento em conformidade com o padrão de assinatura digital ICP-Brasil e validado de acordo com o Instituto Nacional de Tecnologia da Informação

Os registros de assinatura presentes nesse documento pertencem única e exclusivamente a esse envelope.
Documento final gerado e certificado por **Universidade Federal do Espírito Santo**

AGRADECIMENTOS

À Deus, cuja capacitação e força tornaram possível a conclusão deste trabalho.

À minha família, pelo apoio inabalável, amor constante e torcida durante toda a minha jornada acadêmica. Vocês são minha inspiração.

Ao meu orientador, Professor Luciano José Quintão Teixeira, pela orientação, paciência e conhecimento compartilhado. Suas contribuições foram fundamentais para o desenvolvimento desta dissertação.

Meu profundo agradecimento à minha coorientadora, Professora Silvani Verruck, pelo apoio, dedicação e generosidade. Serei eternamente grato por caminhar ao seu lado nesse período.

Aos meus amigos, pela compreensão, incentivo e companheirismo ao longo desta jornada. Vocês foram essenciais.

À empresa Duas Rodas, pelo suporte e disponibilização de recursos analíticos e estruturais que possibilitaram a realização deste estudo.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelo auxílio financeiro concedido durante a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PCTA) da Universidade Federal do Espírito Santo - Campus de Alegre e a todos os professores e servidores.

Ao Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina pela disposição de toda estrutura física e intelectual para a concretização deste trabalho.

“Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive.”

Fernando Pessoa

BIOGRAFIA

Klinger Vinícius de Almeida, filho de Orlando Almeida Primo e Vaneide de Almeida Souto, nasceu em Salinas – Minas Gerais, em 02 de março de 1995.

No ano de 2014, ingressou no Curso de Engenharia de Alimentos na Universidade Federal de Minas Gerais, colando grau em 2017.

Em 2021, iniciou o Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, na Universidade Federal do Espírito Santo, submetendo-se à defesa de dissertação em novembro de 2023.

LISTAS DE FIGURAS

ARTIGO DE REVISÃO

Figura 1. Grãos de kefir de água antes e depois de serem adicionados à solução de açúcar mascavo..... 14

Figura 2. Esquema geral de fermentação do kefir de água.....15

Figura 3. Número de publicações relacionadas ao kefir de água.....16

Figura 4. Distribuição geográfica das produções cientificas relacionadas ao kefir de água.....17

ARTIGO ORIGINAL

Figure 1. Kinetics of pH variation for different water kefir fermentation condition…….55

Figure 2. Relative abundance (%) of bacteria (A) and fungi (B) species in water kefir grains and in the fermented beverage…….58

Figure 3. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy graphs of water kefir powders dried through spray drying and lyophilization with different carrier agents…….65

Figure 4. DSC thermograms of spray-dried and lyophilized water kefir powders…….66

Figure 5. Microscopic images achieved by scanning electron microscopy (SEM) of kefir powders obtained with different encapsulating agents and dried by different drying methods……...69

LISTAS DE TABELAS

ARTIGO DE REVISÃO

Tabela 1. Espécies de microrganismos identificados em kefir de água……19

ARTIGO ORIGINAL

Table 1. Water kefir fermentation conditions……47

Table 2. Response to different water kefir fermentation conditions……...……53

Table 3. Adjusted equations and coefficients of determination (R2) for the different fermentation conditions tested…….54

Table 4. Microbial counts before and after spray drying and lyophilization……60

Table 5. Physicochemical characteristics of kefir powders dried by spray and freeze drying……..62

Table 6. Color parameters of kefir powders obtained by different drying processes and with different carrier agents……..68

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 1

1.1. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS 3

2. OBJETIVOS 5

4. Objetivo geral 5

5. Objetivos específicos 5

3. ARTIGO DE REVISÃO 6

EXPLORANDO O POTENCIAL FUNCIONAL DO KEFIR DE ÁGUA: BENEFÍCIOS, REGULAMENTAÇÃO E ALTERNATIVAS PARA AMPLIAÇÃO DA COMERCIALIZAÇÃO. 6

1. INTRODUÇÃO 8

2. Saudabilidade, veganismo/vegetarianismo e hipersensibilidades 9

3. Aspectos regulatórios 10

4. Kefir: origem, composição, métodos de fabricação e difusão 13

4.1. Composição microbiológica dos grãos de kefir 18

4.2. Dinâmica de fermentação do kefir de água 24

5. Kefir de água em pó 25

5.1. Caracterização física e físico-química de kefir de água em pó 27

5.1.1. Tamanho, forma e morfologia 27

5.1.2. Propriedades de escoamento 28

5.1.3. Umidade, atividade de água e higroscopicidade 29

5.1.4. Solubilidade 30

5.1.5. Análises térmicas 30

5.1.6. Espectrometria por Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) 31

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS 31

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 32

4. ARTIGO ORIGINAL 43

KEFIR DE ÁGUA EM PÓ: EFEITO DA SECAGEM POR ATOMIZAÇÃO E DA LIOFILIZAÇÃO NAS PROPRIEDADES FÍSICAS, FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS 43

5. INTRODUCTION 45

6. MATERIAL AND METHODS 46

6.1. Material 47

6.2. Maintenance of kefir grains 47

6.3. Fermentation kinetics of water kefir culture 47

6.4. Molecular microbial identification 48

6.5. Drying step 49

6.5.1. Spray drying 49

6.5.2. Lyophilization 49

6.6. Microbiological analyzes 50

6.7. Physicochemical analysis 50

6.8. Densidities 50

6.9. Water Solubility 50

6.10. Fourier Transform Infrared (FTIR) 51

6.11. Differential Scanning Calorimetry (DSC) 51

6.12. Color Properties 51

6.13. Hygroscopicity 51

6.14. Particle Morphology 52

6.15. Statistical analysis 52

7. RESULTS AND DISCUSSION 52

7.1. Fermentation Kinetics 52
7.2. Metataxonomic analysis 57
7.3. Microbiological analysis of dehydrated water kefir 59
7.4. Physical-chemical analyzes of the powders 62
7.5. Fourier Transform Infrared (FTIR) 65
7.6. Differential Scanning Calorimetry (DSC) 66
7.7. Color Properties 68
7.8. Particle morphology 69

8. CONCLUSION 70

9. REFERENCES 71

RESUMO

ALMEIDA, Klinger Vinícius de. **Liofilização e atomização como métodos de secagem para kefir de água: análise de viabilidade microbiana e impactos nas propriedades físico-químicas.** 2023. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre – ES. Orientador: Prof. Dr. Luciano José Quintão Teixeira. Coorientadora: Profa. Dra. Silvani Verruck.

O kefir de água é uma bebida fermentada não láctea à base de sacarose, com o açúcar mascavo sendo o principal substrato. Os grãos podem ser reutilizados para fermentações subsequentes transferindo-os para um novo substrato fresco. A bebida resultante é carbonatada, turva, levemente alcoólica e doce; sua composição é influenciada pelas condições de cultivo e pela microbiota dos grãos. Este estudo teve como objetivo desenvolver e analisar as características físico-químicas, microbiológicas e tecnológicas do kefir de água em pó. As melhores condições de fermentação observadas incluíram o uso de 5% de grãos, 10% de açúcar mascavo e uma temperatura de incubação de 25°C. Como resultado da análise metataxonômica realizada nos grãos de kefir e bebida fermentada, verificou-se que as composições bacterianas compreendiam sete gêneros, sendo eles: *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Sporolactobacillus* e *Zymomonas*. Dentro destes gêneros foram identificadas nove espécies, sendo 94,31% e 91,68% correspondente à *Zymomonas mobilis*, para grãos e bebida respectivamente. Em relação aos fungos, *Ascomycota* foi o único filo identificado, com cinco gêneros detectados tanto nos grãos quanto na bebida: *Lachancea*, *Saccharomyces*, *Torulaspora*, *Wickerhamomyces* e *Pichia*. *Lachancea fermentati* correspondeu a 95,54% da composição dos grãos e 67,53% da composição da bebida fermentada. Os valores das análises físicas e físico-químicas da bebida atomizada e liofilizada variaram em relação ao pH (5,24 ± 0,02 a 5,52 ± 0,04), atividade de água (0,242 ± 0,004 a 0,392 ± 0,024) e umidade (2,68 ± 0,27 a 4,42 ± 0,01), respectivamente. Pós submetidos ao processo de secagem por atomização apresentaram significativa solubilidade, variando de 79,09 ± 1,18 a 81,34 ± 1,66, estatisticamente superiores ($p<0,05$) aos das amostras liofilizadas. Em relação ao parâmetro de higroscopicidade, todos os pós demonstraram valores superiores a 10%, caracterizando-se, portanto, como higroscópicos. Os testes que incorporaram inulina como material de parede, seja de forma combinada ou isolada, apresentaram higroscopicidade

significativamente superior. Foi ainda observada uma tendência ascendente na densidade compactada dos pós à medida que a inulina era incorporada como material de parede. Para a densidade aparente, as amostras contendo 100% de inulina como material de parede, submetidas tanto à secagem por atomização quanto à liofilização, mostraram valores mais elevados ($p<0,05$) em comparação com as demais. A secagem por atomização, que resultou em uma redução logarítmica de 3 logs UFC/g, demonstrou potencial para a produção de kefir de água em pó. No entanto, a liofilização mostrou ser um método mais eficaz do que a atomização para preservar a viabilidade dos microrganismos, tornando-o uma potencial fonte de probióticos.

Palavras-chave: Novos produtos, bebidas fermentadas, fermentação, secagem, veganismo, tecnologia de alimentos.

ABSTRACT

ALMEIDA, Klinger Vinícius de. **Freeze-drying and atomization as drying methods for water kefir: feasibility analysis and impacts on physical, physicochemical and microbiological properties.** 2023. Dissertation (Master's in Food Science and Technology) – Federal University of Espirito Santo, Alegre – ES. Advisor: Prof. Dr. Luciano José Quintão Teixeira. Co-advisor: Profa. Dra. Silvani Verruck.

Water kefir is a sucrose-based non-dairy fermented beverage, with brown sugar being the main substrate. The grains can be reused for subsequent fermentations by transferring them to a new, fresh substrate. The resulting drink is carbonated, cloudy, slightly alcoholic and sweet; its composition is influenced by growing conditions and the microbiota of the grains. This study aimed to develop and analyze the physical-chemical, microbiological and technological characteristics of water kefir powder. The best fermentation conditions observed included the use of 5% grain, 10% brown sugar and an incubation temperature of 25°C. As a result of the metataxonomic analysis carried out on kefir grains and fermented beverage, it was found that the bacterial compositions comprised seven genera, namely: *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Sporolactobacillus* and *Zymomonas*. Within these genera, nine species were identified, 94.31% and 91.68% corresponding to *Zymomonas* mobilis, for grains and beverages respectively. In relation to fungi, Ascomycota was the only phylum identified, with five genera detected in both the grains and the beverage: *Lachancea*, *Saccharomyces*, *Torulaspora*, *Wickerhamomyces* and *Pichia*. *Lachancea fermentati* corresponded to 95.54% of the grain composition and 67.53% of the fermented beverage composition. The values of the physical and physical chemical analyzes of the atomized and freeze-dried beverage varied in relation to pH (5.24 ± 0.02 to 5.52 ± 0.04), water activity (0.242 ± 0.004 to 0.392 ± 0.024) and humidity (2.68 ± 0.27 to 4.42 ± 0.01), respectively. Powders subjected to the spray drying process showed significant solubility, ranging from 79.09 ± 1.18 to 81.34 ± 1.66, statistically higher ($p<0.05$) than that of freeze-dried samples. In relation to the hygroscopicity parameter, all powders demonstrated values above 10%, therefore characterizing themselves as hygroscopic. Tests that incorporated inulin as wall material, whether in combination or alone, showed significantly higher hygroscopicity. An increasing trend in the compacted density of the powders was also observed as inulin was incorporated as a wall material. For apparent density, samples containing 100% inulin as wall material, subjected to both spray drying and freeze

drying, showed higher values ($p<0.05$) compared to the others. Spray drying, which resulted in a logarithmic reduction of 3 log CFU/g, demonstrated potential to produce powdered water kefir. However, freeze-drying has been shown to be a more effective method than atomization for preserving the viability of microorganisms, making it a potential source of probiotics.

Key-words: New products, fermented drinks, fermentation, drying, veganism, food technology.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, com o surgimento de diversas doenças, a conscientização dos consumidores sobre o consumo de alimentos aumentou significativamente. Portanto, tem havido grande interesse no desenvolvimento de novos tipos de alimentos funcionais. Neste cenário, o kefir de água (também reconhecido como kefir açucarado) tem ganhado atenção especial e atualmente está bastante difundido em todo o mundo (YERLIKAYA; AKAN; KINIK, 2022).

O kefir de água é convencionalmente obtido a partir da inoculação de grãos gelatinosos contendo microrganismos potencialmente probióticos, conhecidos como grãos de kefir de água. Esses grãos gelatinosos se caracterizam como uma cultura simbiótica de leveduras e bactérias envoltas em uma matriz polissacarídica (ESATBEYOGLU et al., 2023). O kefir de água apresenta vários benefícios à saúde, incluindo atividade antimicrobiana, antiinflamatória, antioxidante, ação hepatoprotetora e efeitos cicatrizantes, reduzindo o colesterol e níveis de lipoproteína de baixa densidade (LDL), e exercendo efeitos gastroprotetores (ALIGITA et al., 2023; ALSAYADI et al., 2013; BRASIL et al., 2019; ROCHA-GOMES et al., 2018).

Geralmente, os grãos de kefir de água são inoculados em uma solução de sacarose, por exemplo, açúcar mascavo, e fermentados por dois ou três dias a 20–25 °C. Após esse período, sucos e/ou polpas de frutas são adicionados para incrementar o sabor (LAUREYS; DE VUYST, 2014). A bebida fermentada resultante é carbonatada, turva, ligeiramente alcoólica e doce, com sua composição influenciada principalmente pelas condições de cultivo e composição microbiológica dos grãos (GULITZ et al., 2011). Assim, o kefir de água se apresenta como uma alternativa aos consumidores, especialmente aqueles com intolerância à lactose e/ou reações alérgicas, ou para indivíduos que optam por não consumir produtos lácteos.

Os consumidores estão cada vez mais receptivos a produtos fermentados, especialmente quando associados a possíveis benefícios e a uma origem ou história tradicional (LYNCH et al., 2021). No entanto, existem desafios na obtenção dessa bebida, como a morosidade do processo produtivo, a dificuldade em manter a viabilidade dos grãos e a falta de padronização do produto. Portanto, a produção em escala industrial ainda não foi totalmente desenvolvida, e culturas iniciais de cepas definidas permanecem ausentes (LYNCH et al., 2021; TEIJEIRO et al., 2018).

Nesse contexto, o kefir em pó surge como uma alternativa viável, oferecendo um prazo de validade mais extenso, facilidade no armazenamento e reconstituição instantânea, tornando-se um produto conveniente (CHATURVEDI; KHARTAD; CHAKRABORTY, 2021). A secagem por atomização é um método térmico amplamente utilizado na indústria de alimentos para produzir um pó seco a partir de um líquido (BARBOSA; TEIXEIRA, 2017). Embora ainda haja muito a ser investigado sobre o efeito da secagem por atomização sobre esses microrganismos do kefir, sabe-se que seu uso pode resultar em pós estáveis (MARTÍN et al., 2015). Por outro lado, a liofilização é um método não térmico comumente utilizado para a desidratação de alimentos sensíveis ao calor, combinando congelamento e secagem a vácuo (LIU; ZHANG; HU, 2022).

O presente estudo tem como objetivo avaliar os impactos dos métodos de secagem nas propriedades físicas, físico-químicas e microbiológicas do kefir de água, contribuindo para o entendimento de sua conservação e qualidade.

1.1. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ALIGITA, W. et al. Hepatoprotective Properties of Water Kefir: A Traditional Fermented Drink and Its Potential Role. **International journal of preventive medicine**, v. 14, p. 93, 2023.

ALSAYADI, M. et al. **ANTIOXIDANT POTENCY OF WATER KEFIR**. [s.l: s.n.].

BRASIL, G. A. et al. Pretreatment With Water Kefir Promotes A Decrease In Ulcer Development In An Ethanol-Acidified Ulcer Model. **The FASEB Journal**, v. 33, n. S1, abr. 2019.

BARBOSA, J.; TEIXEIRA, P. Development of probiotic fruit juice powders by spray-drying: A review. **Food Reviews International**, v. 33, n. 4, p. 335–358, 4 jul. 2017.

CHATURVEDI, S.; KHARTAD, A.; CHAKRABORTY, S. The potential of non-dairy synbiotic instant beverage powder: Review on a new generation of healthy ready-to-reconstitute drinks. **Food Bioscience**, v. 42, p. 101195, ago. 2021.

ESATBEYOGLU, T. et al. Physical, chemical, and sensory properties of water kefir produced from Aronia melanocarpa juice and pomace. **Food Chemistry: X**, v. 18, p. 100683, jun. 2023.

GULITZ, A. et al. The microbial diversity of water kefir. **International Journal of Food Microbiology**, v. 151, n. 3, p. 284–288, dez. 2011.

GUZEL-SEYDIM, Z. B.; GÖKIRMAKLI, Ç.; GREENE, A. K. A comparison of milk kefir and water kefir: Physical, chemical, microbiological and functional properties. **Trends in Food Science & Technology**, v. 113, p. 42–53, jul. 2021.

KOH, W. Y. et al. Evaluation of probiotic potential and anti-hyperglycemic properties of a novel Lactobacillus strain isolated from water kefir grains. **Food Science and Biotechnology**, v. 27, n. 5, p. 1369–1376, 17 out. 2018.

LAUREYS, D.; DE VUYST, L. Microbial Species Diversity, Community Dynamics, and Metabolite Kinetics of Water Kefir Fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 8, p. 2564–2572, 15 abr. 2014.

LIU, Y.; ZHANG, Z.; HU, L. High efficient freeze-drying technology in food industry. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 62, n. 12, p. 3370–3388, 21 abr. 2022.

LYNCH, K. M. et al. An update on water kefir: Microbiology, composition and production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 345, p. 109128, maio 2021.

MARTÍN, M. J. et al. Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 27, p. 15–25, fev. 2015.

ROCHA-GOMES, A. et al. Chemical composition and hypocholesterolemic effect of milk kefir and water kefir in Wistar rats. **Revista de Nutrição**, v. 31, n. 2, p. 137–145, mar. 2018.

TEIJEIRO, M. et al. Suitability of kefir powder production using spray drying. **Food Research International**, v. 112, p. 169–174, out. 2018.

YERLIKAYA, O.; AKAN, E.; KINIK, Ö. The metagenomic composition of water kefir microbiota. **International Journal of Gastronomy and Food Science**, v. 30, p. 100621, dez. 2022.

2. OBJETIVOS

4. Objetivo geral

Avaliar as características físicas, físico-químicas e microbiológicas de kefir de água seco por liofilização e atomização.

5. Objetivos específicos

- Desenvolver uma bebida fermentada que atenda ao público em geral e especialmente ao grupo de veganos/vegetarianos utilizando grãos de kefir de água;
- Estudar a influência da concentração de açúcar mascavo e grãos de kefir de água para a fermentação durante o tempo de 48 horas;
- Identificar a microbiota presente nos grãos de kefir de água utilizados na fermentação das bebidas;
- Avaliar o impacto da secagem por liofilização e atomização nas características físico-químicas e microbiológicas da bebida;
- Determinar as condições adequadas e a proporção dos materiais de parede no processo de secagem.

3. ARTIGO DE REVISÃO

Explorando o potencial funcional do kefir de água: benefícios, regulamentação e alternativas para ampliação da comercialização.

RESUMO

O kefir de água é um tipo de kefir não lácteo obtido pela fermentação dos grãos de kefir de água inoculados em uma solução de sacarose, sendo o açúcar mascavo é o principal substrato utilizado para sua fermentação. Os grãos podem ser reaproveitados para fermentações sucessivas por meio de backslopping, ou seja, retirada dos grãos da fermentação anterior e colocação em substrato fresco para uma nova fermentação. A bebida fermentada obtida é carbonatada, turva, ligeiramente alcoólica e doce, sendo muito popular entre os consumidores veganos. Sua composição é determinada principalmente pelas condições de cultivo e pela composição microbiológica dos grãos sendo os principais produtos finais da fermentação etanol, ácido lático, manitol, ácido acético, glicerol e outros ácidos orgânicos. Por se tratar de um produto potencialmente probiótico e benéfico para a saúde, o interesse no consumo de kefir tem aumentado nos últimos anos. No entanto, existem desafios na obtenção dessa bebida, como a morosidade do processo produtivo, a dificuldade em manter a viabilidade dos grãos e a falta de padronização do produto. Portanto, a produção em escala industrial e culturas iniciais ainda não foram desenvolvidos. Este estudo visa realizar uma revisão abrangente sobre o kefir de água, explorando seus aspectos nutricionais, benefícios potenciais para a saúde, processo de fermentação, microrganismos envolvidos e aspectos regulatórios.

Palavras-chaves: kefir de água, fermentação, probióticos, alimentos funcionais, regulatório.

Water kefir: a comprehensive review of benefits, nutritional composition, and fermentation process

ABSTRACT

Water kefir is a type of non-dairy kefir obtained by fermenting water kefir grains inoculated in a sucrose solution, with brown sugar being the main substrate used for its fermentation. The grains can be reused for successive fermentations through backslopping, that is, removing the grains from the previous fermentation and placing them in a fresh substrate for a new fermentation. The fermented beverage obtained is carbonated, cloudy, slightly alcoholic and sweet, and is very popular among vegan consumers. Its composition is mainly determined by the cultivation conditions and the microbiological composition of the grains, with the main end products of fermentation being ethanol, lactic acid, mannitol, acetic acid, glycerol and other organic acids. As it is a potentially probiotic and beneficial product for health, interest in kefir consumption has increased in recent years. However, there are challenges in obtaining this drink, such as the slow production process, the difficulty in maintaining the viability of the grains and the lack of product standardization. Therefore, industrial-scale production and starter cultures have not yet been developed. This study aims to conduct a comprehensive review on water kefir, exploring its nutritional aspects, potential health benefits, fermentation process, microorganisms involved and regulatory aspects.

Keywords: water kefir, fermentation, probiotics, functional foods, regulatory.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, tem crescido o interesse no desenvolvimento de novos tipos de alimentos funcionais (BUTNARIU; SARAC, 2019). Consumidores procuram agora produtos mais saudáveis, com qualidade nutricional mais elevada e ingredientes específicos, a fim de prevenir problemas de saúde, melhorar a sua qualidade de vida e prolongar a sua expectativa de vida (MANOJ et al., 2023). Devido à crescente conscientização sobre os benefícios dos probióticos para a saúde, que incluem a preservação do equilíbrio da microbiota intestinal e o reforço das defesas da mucosa contra agentes patogênicos, a demanda por alimentos funcionais contendo microrganismos com propriedades probióticas está em rápido crescimento. (MOJIKON et al., 2022).

Embora os alimentos funcionais à base de leite sejam mais disponíveis, as alternativas à base de plantas têm gerado muito interesse. A procura e popularidade destes substitutos pode ser devido a várias questões de saúde apresentadas pelo consumo de produtos lácteos, como a intolerância à lactose e alergias associadas ao leite de vaca. Ademais, o veganismo está ganhando popularidade pode ser também uma possível razão para a expansão dos alimentos funcionais à base de plantas (HASAN et al., 2023a; MANOJ et al., 2023).

O kefir de água é um tipo de kefir não lácteo obtido pela fermentação dos grãos de kefir de água inoculados em uma solução de sacarose. O açúcar mascavo é o principal substrato utilizado para a fermentação do kefir de água (BORGUINI; TORRES, 2015). A bebida fermentada obtida é carbonatada, turva, ligeiramente alcoólica e doce, sendo muito popular entre os consumidores veganos. Sua composição é determinada principalmente pelas condições de cultivo e pela composição microbiológica dos grãos sendo os principais produtos finais da fermentação etanol, ácido lático, manitol, ácido acético, glicerol e outros ácidos orgânicos (FIORDA et al., 2017; GULITZ et al., 2011).

Os benefícios à saúde associados ao consumo de kefir de água podem ser atribuídos aos microrganismos benéficos encontrados na bebida fermentada, aos seus metabólitos (ácidos orgânicos e oligossacarídeos) ou atribuído a ambos (efeito sinérgico). No entanto, mais investigações são necessárias para entender os múltiplos benefícios à saúde associados ao consumo de kefir de água (MORETTI et al., 2022).

Diante do exposto, este estudo visa realizar uma revisão abrangente sobre o kefir de água, explorando seus aspectos nutricionais, benefícios potenciais para a saúde, processo de fermentação, microrganismos envolvidos e aspectos regulatórios.

2. Saudabilidade, veganismo/vegetarianismo e hipersensibilidades

O papel de uma alimentação balanceada na manutenção da saúde é de interesse da comunidade científica e inúmeros estudos comprovaram a atuação de alguns alimentos na redução do risco de certas doenças. Desta forma, tem havido grande interesse no desenvolvimento de novos tipos de alimentos funcionais possibilitando a inovação na área de alimentos e a criação de novos nichos de mercado(YERLIKAYA; AKAN; KINIK, 2022).

Embora os alimentos funcionais à base de leite estejam cada vez mais disponíveis, os substitutos à base de plantas geram muito interesse particularmente entre veganos, intolerantes a proteínas lácteas ou consumidores alérgicos. Além disso, muitos consumidores adotam uma dieta a base de plantas por razões de sustentabilidade, relacionadas com a saúde, estilo de vida, ou por preocupações sociais ou políticas mais amplas (HASAN et al., 2023a). Desta forma, o desenvolvimento de produtos fermentados não lácteos configura-se como uma estratégia adequada para atendimento às necessidades do público vegano e hipersensíveis (intolerantes e alérgicos).

Na Europa, estima-se uma prevalência média de alergia à proteína do leite de 6–8% em crianças e 2% em adultos, enquanto as intolerâncias à lactose afetam um terço da população mundial (PAREDES; ESCUDERO-GILETE; VICARIO, 2022). Segundo pesquisa realizada pelo Instituto Brasileiro de Opinião Pública e Estatística – IBOPE (2018), no Brasil, 14% da população se declara vegetariana e mais da metade dos entrevistados (55%) declara que consumiria mais produtos veganos se estivessem melhor indicados na embalagem ou se tivessem o mesmo preço que os produtos que estão acostumados a consumir (60%). A nível global, segundo um relatório da Euromonitor os consumidores veganos constituem aproximadamente quatro por cento dos consumidores mundiais (MASCARAQUE, 2020). Consumidores vegetarianos e veganos representam um alvo econômico muito atraente para a indústria de alimentos e marcas de grandes empresas têm dedicado mais espaço para

a promoção de pequenos produtores focados em produtos veganos e orgânicos (BRYANT, 2019; CARFÌ; DONATO; PANUCCIO, 2018).

A mudança nas preferências dos consumidores é um processo dinâmico e os consumidores estão cada vez mais conscientes e preocupados com os benefícios dos alimentos e com a sustentabilidade da cadeia alimentar; assim, levando os fabricantes a enfatizarem a promoção de alimentos funcionais. Portanto, a chave para o sucesso da comercialização e aceitação de novos alimentos depende da qualidade dos alimentos e do conceito de valor acrescentado baseado nas funcionalidades dos alimentos (BRYANT, 2019).

De acordo com os dados encomendados pela Plant Based Foods Association e pelo The Good Food Institute (2020), as vendas nos EUA de carne vegetal, laticínios e ovos ultrapassaram as vendas de produtos animais convencionais pelo terceiro ano consecutivo. Os dados deste relatório, mostraram que em 2020, as vendas de iogurte vegetal cresceram 20%, quase sete vezes a taxa do iogurte convencional. Segundo Tangyu et al. (2019) estima-se que o mercado global de alternativas ao leite (ou análogos do leite) corresponderá a aproximadamente 26 bilhões de dólares até 2023. Desta forma, produtos como o kefir de água surgem como uma alternativa aos tradicionais iogurtes, podendo suprir as demandas de consumidores veganos, vegetarianos e hipersensíveis por produtos funcionais e mais saudáveis.

3. Aspectos regulatórios

Nos últimos anos, os consumidores tornaram-se mais conscientes da relação entre saúde e alimentação. Eles agora buscam produtos mais saudáveis, com qualidade nutricional mais alta e ingredientes específicos, a fim de prevenir problemas de saúde e assim melhorar sua qualidade de vida. Ademais essa busca tem impulsionado o desenvolvimento de novos alimentos com propriedades funcionais, principalmente fontes de compostos bioativos e contendo probióticos (HASAN et al., 2023b; MARRERO et al., 2019).

O termo “alimento funcional” apareceu pela primeira vez no Japão em 1984. O governo japonês definiu uma nova categoria de produto, Food for Specific Health Uses (FOSHU), como “alimento contendo um ingrediente com funções para a saúde e oficialmente aprovado para reivindicar seus efeitos fisiológicos sobre o corpo humano” e produziu uma estrutura legislativa específica. O Japão foi seguido pelos

Estados Unidos que, na década de 90, desenvolveram o primeiro ato de alegação de saúde, mas sem fornecer uma definição formal de alimento funcional (MARTIROSYAN; SINGH, 2015). Os países europeus adquiriram o conceito de alimento funcional mais de 10 anos depois, quando o Parlamento Europeu e o Conselho introduziram o regulamento sobre alegações nutricionais e de saúde (Reg. (UE) n. 1924/2006); mas também neste caso nenhuma definição formal foi mencionada (ALONGI; ANESE, 2021).

No entanto, em 2017, o Functional Food Center atualizou sua definição, pontuando que alimentos naturais ou processados que contêm compostos biologicamente ativos que, em quantidades definidas, efetivas e não tóxicas, fornecem benefícios à saúde clinicamente comprovados e documentados, utilizando biomarcadores específicos para prevenir, manejo ou tratamento de doenças crônicas ou seus sintomas (GUR; MAWUNTU; MARTIROSYAN, 2018).

Existem várias consequências de deixar a definição de alimento funcional em aberto. Por exemplo: diferentes formas de interpretação do significado de alimentos funcionais, confusão pública criada por rótulos ambíguos de alimentos e a subsequente perda de legitimidade científica de alimentos funcionais entre consumidores e funcionários do governo. Assim, é crucial a clareza nas distinções entre "alimentos funcionais", "compostos bioativos", "nutracêuticos" e outros termos correlatos (MARTIROSYAN; SINGH, 2015).

A classe dos probióticos e prebióticos merece destaque no contexto dos alimentos funcionais, representando uma relação simbiótica entre a microbiota intestinal e a saúde humana. Probióticos são microrganismos vivos que, quando consumidos em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro, notadamente ao fortalecer o sistema imunológico e otimizar o balanço da microbiota intestinal. Prebióticos, por sua vez, são componentes alimentares não digeríveis que favorecem o crescimento e a atividade dos probióticos, promovendo uma microbiota equilibrada e funcional (FAGNANT et al., 2023; GIBSON et al., 2017; JOHNSTON et al., 2018).

A importância dos probióticos na saúde humana atraiu imensa atenção no passado recente. Os probióticos nos intestinos interagem com a microbiota intestinal através da competição de nutrientes, alimentação cruzada e antagonismo para apoiar a estabilidade da microbiota. A maioria dos probióticos produz ácidos orgânicos ou bacteriocinas no cólon suprimindo o crescimento de bactérias patogênicas. Os

benefícios para a saúde da ingestão de kefir de água são empiricamente sustentados por séculos de consumo por seres humanos. Em tantos momentos de consumo, os microrganismos encontrados no kefir de água têm se mostrado não patogênicos e, além disso, com propriedades probióticas (ZENG et al., 2022; MORETTI et al., 2022).

Segundo autores, uma bebida funcional pode ser definida como “uma bebida não alcoólica que consiste em ingredientes não tradicionais, compreendendo ervas, minerais, aminoácidos, vitaminas ou ingredientes adicionais de frutas ou vegetais crus, incluindo probióticos, e é reivindicada como fornecendo benefícios de saúde específicos além daqueles fornecidos por quaisquer fontes alimentares normais” (DIMITROVA; ILIEVA, 2023).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) não estabelece uma definição para bebidas funcionais, no entanto, através da Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999 (BRASIL, 1999) define as alegações de propriedades funcionais e estabelece as orientações para o seu uso, bem como as condições de registro para produtos alimentícios que fazem tais alegações. Nesse contexto, ao utilizar alegações de propriedade funcional em relação ao kefir de água, é fundamental adotar como base as legislações que regulam esse produto, tais como os padrões de identidade e qualidade. Além disso, é importante considerar a obrigatoriedade de fornecer as comprovações necessárias para sustentar tais alegações, como anteriormente mencionado.

O kefir de água é legislado em alguns países e é comumente comercializado como uma “bebida tradicional”. Na União Europeia, o kefir de água é atualmente comercializado como probiótico ao abrigo do Regulamento n.º 178/2002 do Parlamento Europeu e do Conselho (EU, 2002). Na Austrália e Nova Zelândia o Padrão 2.6.2 de Bebidas não alcoólicas e refrigerantes fabricados, define uma série de produtos e dentre eles o kefir de água é contemplado (FOOD STANDARDS AUSTRALIAN NEW ZEALAND, 2016). O FDA considera o kefir de água como um dos itens que pode fornecer um substituto vegetal ao leite, juntamente com outros substitutos vegetais do leite (FDA, 2021). Em 2021, a Argentina formou um grupo de trabalho com o objetivo de estabelecer os critérios microbiológicos e físico-químicos a fim de futuramente incluí-lo no Código Alimentar Argentino (CUFAOGLU; ERDINC, 2023a; MORETTI et al., 2022).

A nível nacional, a legislação referente a bebidas fermentadas não inclui disposições específicas para o kefir de água. Em vez disso, a regulamentação se

concentra exclusivamente no kefir de leite, conforme estabelecido no Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados descrito pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (BRASIL, 2007).

O kefir de água é fabricado industrialmente e vendido ao público em países como os Estados Unidos, Reino Unido, Bélgica, Itália e Argentina (MORETTI et al., 2022; SPIZZIRRI et al., 2023). No Brasil, a empresa Organ Alimentos disponibiliza kefir de água industrializado, categorizando-o como uma "Bebida orgânica com cultura de kefir de água". Além disso, a empresa disponibiliza em seu rótulo que, devido à sua natureza artesanal, o produto dispensa a necessidade de registro sanitário.

4. Kefir: origem, composição, métodos de fabricação e difusão

Diferente do kefir de leite, a origem do kefir de água é pouco conhecida. O primeiro relato científico foi publicado em 1889, que relacionou o uso dos grãos de kefir em cerveja de gengibre pelos soldados ingleses na Guerra da Crimeia em 1855 (FIORDA et al., 2017; LYNCH et al., 2021; YERLIKAYA; AKAN; KINIK, 2022). Outros relatos relacionando o uso do kefir de água foram feitos no México, França, Itália e Alemanha, porém, com diferentes designações para os grãos, como tibicos, tibi, kefir açucarado, piltz, kefir di fruttai, abelhas da califórnia, abelhas africanas, nozes de cerveja, bálsamo de gileade, bèbées e sementes de cerveja japonesa (FIORDA et al., 2017; LYNCH et al., 2021; PIDOUX; BRILLOUET; QUEMENER, 1988).

A estrutura dos grãos de kefir de água é formada por resíduos de glucopiranosil ligados em α-D-(1 → 6) com cadeias laterais ligadas em (1 → 3). O tamanho dos grãos varia de 5 a 20 mm de diâmetro, apresentam formato irregular, são translúcidos, têm uma estrutura frágil e são insolúveis em água. A cor dos grãos de kefir de água varia de esbranquiçada a cinza, mas pode ser influenciada pelo material de fermentação, por exemplo, a cor das frutas, vegetais ou tipo de açúcar utilizados (GUZEL-SEYDIM; GÖKIRMAKLI; GREENE, 2021; LAUREYS; DE VUYST, 2014; LYNCH et al., 2021; MOINAS; HORISBERGER; BAUER, 1980; WALDHERR et al., 2010).

Os grãos podem ser reaproveitados para fermentações sucessivas por meio de back-slopping, ou retirada dos grãos da fermentação anterior e colocação em substrato fresco para uma nova fermentação. Tecnicamente, isso poderia ser praticado *ad infinitum* e tradicionalmente os grãos são transmitidos ou compartilhados de uma geração para outra (LYNCH et al., 2021; PIDOUX; BRILLOUET; QUEMENER,

1988). Diversos vegetais e frutas tem sido utilizados como substratos na fermentação de kefir, como: soja, cebola, gengibre, cenoura, maçã, abacaxi, uva, marmelo, kiwi, pêra, melão, morango, romã, tomate e coco como uma opção de diversificação e enriquecimento nutricional (CORONA et al., 2016; DA SILVA FERNANDES et al., 2017; FIORDA et al., 2017; RANDAZZO et al., 2016).

Figura 1. Grãos de kefir de água antes e depois de serem adicionados à solução de açúcar mascavo.

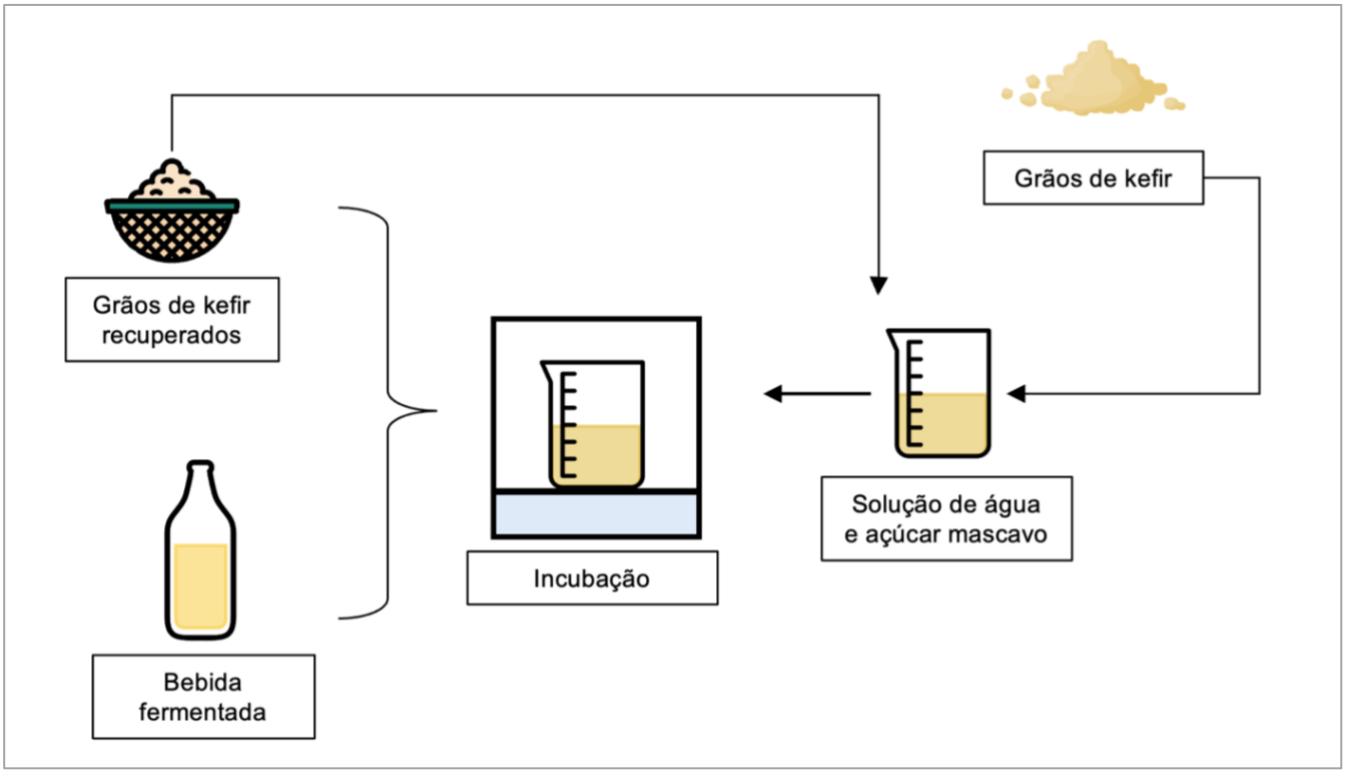
Fonte: O autor

A bebida fermentada obtida é carbonatada, turva, ligeiramente alcoólica e doce, sendo muito popular entre os consumidores veganos. Sua composição é determinada principalmente pelas condições de cultivo e pela composição microbiológica dos grãos sendo os principais produtos finais da fermentação etanol, ácido lático, manitol, ácido acético, glicerol e outros ácidos orgânicos (FIORDA et al., 2017; GULITZ et al., 2011).

O processo geral de produção do kefir de água está descrito na Fig. 2. As fermentações são tipicamente espontâneas com os grãos de kefir de água sendo colocados em solução de sacarose com ou sem frutas secas ou extratos de frutas. Tradicionalmente, a fermentação do kefir de água é realizada incubando a 20-37°C (idealmente 20-25°C) por 24-72 horas em um ambiente escuro usando 6%-30% de

açúcar e 6%-20% de grãos de kefir de água (LAUREYS et al., 2018; PENDÓN et al., 2022).

Figura 2. Esquema geral de fermentação do kefir de água



Fonte: O autor

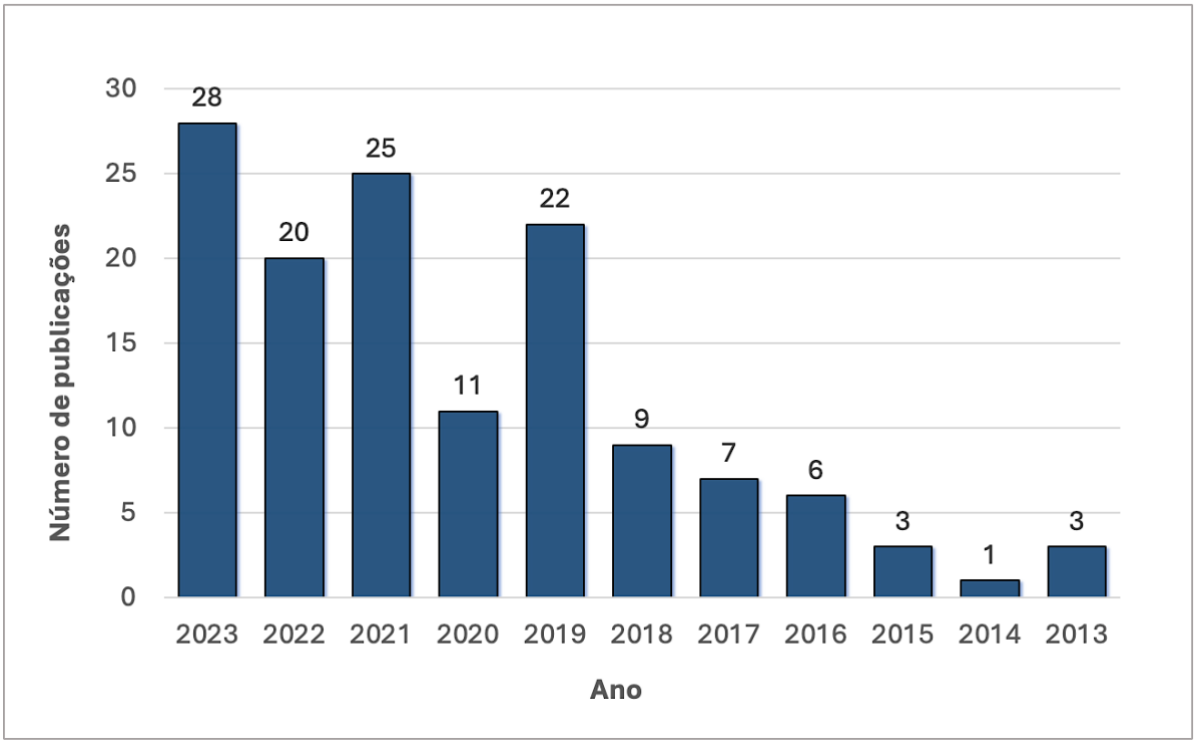
O uso de culturas iniciadoras padronizadas não é comum, conforme discutido a seguir, e há poucos estudos nesta área. Normalmente, o kefir de água tem sido produzido em escala doméstica sob condições não assépticas ou minimamente assépticas (LYNCH et al., 2021).

Na produção de kefir de água, após o grão de kefir de água ser separado do líquido de kefir, a parte líquida pode ser consumida da maneira em que se apresenta ou utilizada em uma segunda fermentação com o objetivo de promover a saborização e carbonatação natural da bebida. É relatado que produtos mais saborosos podem ser obtidos adicionando frutas e sucos de frutas no segundo estágio de fermentação e incubando a 4°C por 24 horas (geralmente usando sucos de maçã, abacaxi, lima, limão, laranja, manga, cereja, morango) (BUENO et al., 2021a; FIORDA et al., 2017).

Na figura 3, está disposto um resumo das publicações em todo o mundo relacionadas ao kefir de água, totalizando 209 publicações, de acordo com uma

pesquisa realizada no Web of Science. Esta análise considerou o período dos últimos 10 anos, de 2013 a 2023. Para identificar todas as publicações pertinentes, foi utilizada uma série de termos que abrangiam as diferentes denominações e variações associadas ao kefir de água. Os termos de pesquisa incluíram a seguinte codificação (TI=(water kefir)) OR TI=(sugary kefir)) OR TI=(piltz)) OR TI=(Kefir di Fruttai)) OR TI=(Graines Vivantes)) OR TI=(Tibicos)) OR TI=(Tibis).

Figura 3. Número de publicações relacionadas ao kefir de água



Fonte: O autor

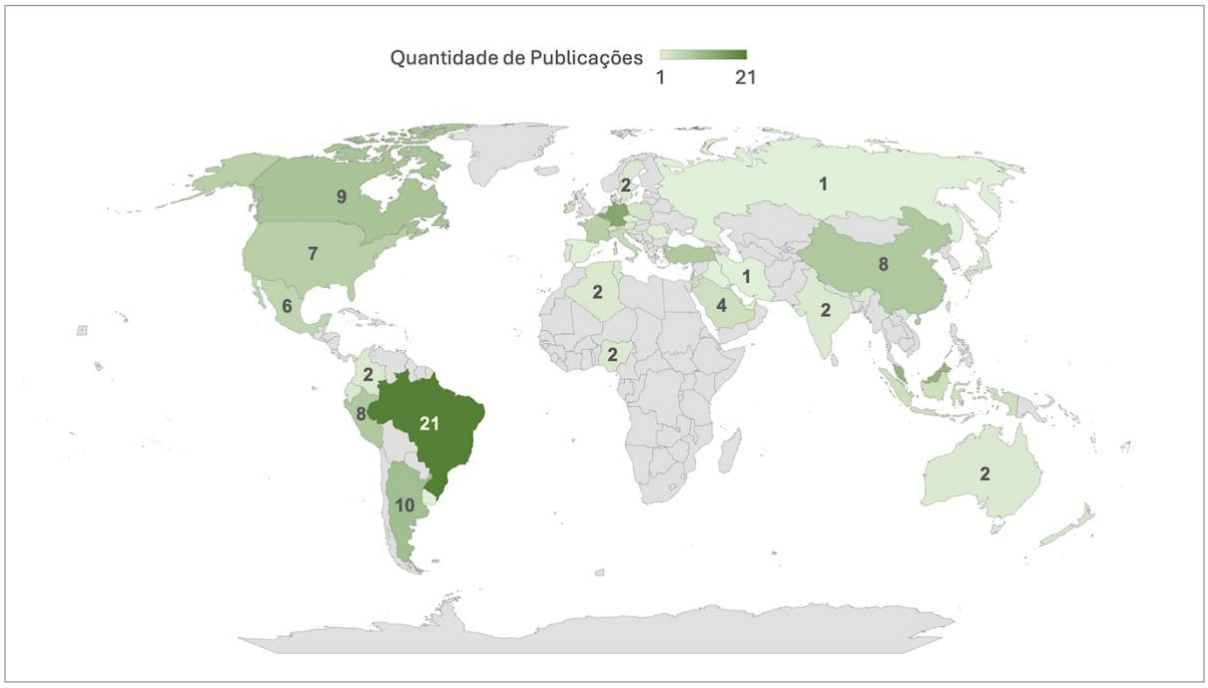
De acordo com os resultados, o ano de 2023 se destacou com o maior número de publicações relacionadas ao kefir de água, totalizando 28 publicações. Esse número representa cerca de 14% de todas as publicações desde os primeiros registros em 1967, demonstrando um crescente interesse nesse campo de pesquisa.

É interessante notar que o pico de publicações relacionadas ao kefir de água ocorreu a partir de 2019, com um aumento constante ano após ano. No entanto, em 2020, houve uma redução no número de publicações, o que pode ser estar relacionado a pandemia de COVID-19, que impactou a pesquisa em muitas áreas. É possível que restrições, limitações e redirecionamento de recursos tenham

influenciado a diminuição temporária nas pesquisas com kefir de água, embora estas pesquisas tenham retornado em 2021 e continuado a crescer em 2023.

Na Figura 4, está disponível a distribuição geográfica das publicações relacionadas ao kefir de água, que foram mencionadas e discutidas anteriormente. Essa análise revela uma interessante distribuição global das produções científicas sobre o tema.

Figura 4. Distribuição geográfica das produções cientificas relacionadas ao kefir de água.



Fonte: O autor

De um total de 209 publicações, nota-se que quase 40% destas produções científicas em todo o mundo têm origem na América Latina, totalizando 39 publicações. Dentro desse panorama, o Brasil se destaca como o país responsável por uma parcela significativa dessas publicações, com um total de 21 artigos. Isso coloca o Brasil como o maior contribuinte para o corpo de conhecimento global sobre o kefir de água.

Além do Brasil, outros países também têm contribuído de forma notável para a pesquisa sobre kefir de água. A Bélgica e a Alemanha ocupam a segunda posição, representando 6,70% das publicações cada uma, com um total de 14 artigos em seus

respectivos nomes. Esse cenário reflete a relevância do kefir de água como um tópico de estudo e a sua crescente importância no contexto científico mundial.

4.1. Composição microbiológica dos grãos de kefir

A microbiota dos grãos de kefir de água consiste em uma variedade de bactérias do ácido láctico (LAB), bactérias do ácido acético (AAB) e espécies de leveduras. Cada grama de grão de kefir de água contém aproximadamente 10^8 unidades formadoras de colônias (UFC) de LAB, 10^6 – 10^8 UFC de AAB e 10^6 – 10^7 UFC de levedura (GULITZ et al., 2011; XU et al., 2019). LAB são representadas principalmente pelo antigo gênero *Lactobacillus*, as AAB pelo gênero *Acetobacter*, e as leveduras pelos gêneros *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces* e *Brettanomyces*. No entanto, quais espécies dominam e a prevalência das espécies identificadas em estudos depende de vários fatores, incluindo o substrato e as condições de fermentação. Além disso, a origem dos grãos e a amplitude e diversidade das amostras (culturas/grãos complexos) examinadas podem ser refletidas nas espécies que foram comumente isoladas (GULITZ et al., 2011; LAUREYS et al., 2018). A composição e frequência das espécies microbianas e a concentração dos bioprodutos finais variam de acordo com as fontes de carbono e energia disponíveis para a fermentação dos grãos. Essas diferenças têm um efeito adicional na granulação e no crescimento microbiano dos grãos (HSIEH et al., 2012).

Passos significativos foram dados para identificar a variedade de leveduras e bactérias que participam na fermentação do kefir de água desde a descoberta destes organismos pelo Dr. Ward em Londres em 1892 e o subsequente desenvolvimento de ferramentas moleculares. Especialmente nos últimos 30 anos, vários estudos sobre a microbiologia do kefir de água foram realizados em diferentes países, como Brasil, Bélgica, Alemanha, Sérvia, Taiwan, China, Irlanda, Argentina e Iêmen (CUFAOGLU; ERDINC, 2023a). A Tabela 1 apresenta um diagnóstico microbiológico das diferentes espécies que foram identificadas em fermentações de kefir de água.

Tabela 1. Espécies de microrganismos identificados em kefir de água

Origem dos grãos	Região analisada	Primers	Espécies de Bactérias	Espécies de Bolores e Leveduras	Referência
Brasil	16S rRNA	338fgc e 518r / NS3 e YM951r	*Lactobacillus parabuchneri, Lactobacillus kefiri, Lactobacillus lactis, Lactobacillus casei, Leuconostoc citreum, Lacticaseibacillus paracasei subsp. paracasei subsp. tolerans, Lactobacillus buchneri, Acetobacter lovaniensis.*	*Saccharomyces cerevisiae, Kluyveromyces lactis, Lachancea meyersii, Kazachstania aerobia.*	(TAVARES et al., 2018)
China	16S rRNA / 18S rDNA e ITS	27F e 1492R / NS1F e ITS4R	*Leuconostoc pseudomesenteroides, Serratia liquefaciens, Pseudomonas fragi, Ochrobactrum lupini, Zymomonas mobilis, Lactobacillus hilgardii, Lactococcus raffinolactis, Leuconostoc mesenteroides.*	*Saccharomyces cerevisiae, Guehomyces pullulans.*	(CAO et al., 2019)
Argentina	16/26S rDNA	7F e 1510R / LSU-D2F e LSU-D2R	*Acetobacter indonesiensis, Acetobacter lovaniensis, Acetobacter tropicalis, Gluconobacter oxydans, Lactobacillus casei/paracasei, Lentilactobacillus diolivorans, Lentilactobacillus farraginis, Lactobacillus harbinensis, Lactobacillus hilgardii, Lactobacillus nagelii, Liquorilactobacillus satsumensis, Oenococcus kitaharae.*	*Pichia membranifaciens, Pichia occidentalis, Saccharomyces cerevisiae.*	(GAMBA et al., 2019)

Bélgica	16S rRNA / ITS1 e ITS2	ND	*Lactobacillus harbinensis, Lactobacillus hilgardii, Lactobacillus nagelii, Lacticaseibacillus paracasei subsp. paracasei, Liquorilactobacillus hordei, Bifidobacterium aquikefiri, Candidatus Oenococcus aquikefiri.*	*Saccharomyces cerevisiae, Dekkera bruxellensis.*	(VERCE; DE VUYST; WECKX, 2019)
China	16S rRNA / ITS	ND	***Gêneros:*** *Acetobacter, Lactobacillus, Ameyamaea, Nguyenibacter, Corynebacterium, Tanticharoenia, Acidomonas, Tetragenococcus, Ruminococcus, Bifidobacterium, Neokomagataea.*	*Saccharomyces cerevisiae, Candida kruisii, Candida ethanolica, Kazachstania humilis, Candida sake, Mortierella alpina, Candida elateridarum, Mortierella sarnyensis, Plectosphaerella cucumerina, Scytalidium cuboideum, Metarhizium anisopliae.*	(TU et al., 2019)
China	16S rRNA / ITS	PRK341F e PRK806R / ITS1	***Gêneros:*** *Acetobacter, Lactobacillus, Gluconobacter, Ameyamaea, Luteimonas, Atopobacter, Tanticharoenia, Swaminathania, Bifidobacteria, Nguyenibacter, Asticcacaulis, Swingsia.*	*Saccharomyces cerevisiae, Candida kruisii, Candida ethanolica, Dekkera bruxellensis, Kazachstania barnettii, Kazachstania humilis, Mortierella alpina, Rhizopus arrhizus, Saitozyma podzolica, Candida tetrigidarum, Dipodascus geotrichum,*	(AZI et al., 2020)

				Clonostachys miodochialis, Ramularia pratensis, Bullera alba, Zopfiella marina, Chaetospermum chaetosporum.	
Alemanha	16S rRNA	M13V e BOXA1R	*Bifidobacterium tibiigranuli sp. nov.*	*NA*	(ECKEL et al., 2020)
Brasil	16S rRNA / ITS	341F e 806R	*Gluconobacter morbifer, Gluconobacter frateurii, Gluconobacter cerinus, Gluconobacter albidus, Gluconacetobacter liquefaciens, Leuconostoc mesenteroides, Leuconostoc carnosum, Liquorilactobacillus uvarum, Lactobacillus sakei, Liquorilactobacillus oeni, Liquorilactobacillus mali , Latilactobacillus curvatus, Acetobacter persici, Acetobacter peroxydans, Acetobacter pasteurianus, Acetobacter orientalis, Acetobacter lambici, Acetobacter indonesiensis.*	*Lasiodiplodia brasiliensis, Debaryomyces hansenii, Cladosporium herbarum, Cladosporium delicatulum, Lachancea fermentati, Pichia fermentans, Saccharomyces cerevisiae, Candida etchellsii.*	(ALVES et al., 2021)
Brasil	16S rRNA / ITS	ND	*Liquorilactobacillus satsumensis, Oenococcus kitaharae, Oenococcus oeni, Gluconobacter oxydans, Acetobacter sp., Lactobacillus sp., Liquorilactobacillus oenit, Liquorilactobacillus nagelii, Komagataeibacter intermediust, Komagataeibacter saccharivorans, Gluconobacter cerinus.*	*Brettanomyces bruxellensis, Saccharomyces cerevisiae, Lachancea fermentati.*	(BUENO et al., 2021b)

Argentina	16S rDNA	341F e 806R	*Rothia mucilaginosa, Lawsonella clevelandensis, Gluconobacter oxydans, Enterobacteriaceae, Rahnella aquatilis, Staphylococcus gallinarum, Ligilactobacillus pobuzihii, Schleiferilactobacillus harbinensis, Liquorilactobacillus nagelii, Lactobacillus kefiranofaciens, Latilactobacillus sakei, Corynebacterium pyruviciproducens, Propionibacterium acnes, Pseudomonas migulae, Acetobacter lovaniensis, Fenollaria massiliensis, Liquorilactobacillus satsumensis, Oenococcus kitaharae, Lentilactobacillus hilgardii, Lacticaseibacillus casei/paracasei, Lactiplantibacillus plantarum, Lactococcus lactis.*	*NA*	(GAMBA et al., 2021)
Suíça	16S rDNA	ND	*Zymomonas mobilis, Bifidobacterium aquikefiri, Liquorilactobacillus hordei, Liquorilactobacillus satsumensis, Liquorilactobacillus nagelii, Leuconostoc suionicum.*	*Brettanomyces bruxellensis, Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces eubayanus, Torulaspora delbrueckii.*	(PATEL et al., 2022)

Turquia	16S rRNA	341F805R	*Ligilactobacillus ruminis, Bacillus methanolicus, Acetobacter percisi, Amylolactobacillus amylophilus, Lactococcus sp., Achromobacterx ylosoxidans, Lactobacillus buchneri, Pediococcus pentosaceus, Melissococcus plutonio, Komagataeibacters accharivorans, Staphylococcus aureus, Marinilactibacillus sp., Lactobacillus sakei, Pseudomonas synxantha, Enterococcus faecium, Bacillus thuringiensis, Loigolactobacillus backii, Streptococcus sobrinus, Acetobacter persici, Bacillus amyloliquefaciens, Limosilactobacillus reuteri, Limosilactobacillus fermentum.*	*Pichia kudriavzevii, Saccharomyces cerevisiae, Eremothecium cymbalariae, Candida glabrata, Ogataea parapolymorpha, Thermothielavioides terrestris, Tetrapisispora phaffii, Fusarium oxysporum, Sugiyamaella lignohabitans, Aspergillus oryzae.*	(YERLIKAYA; AKAN; KINIK, 2022)
Turquia	16S rRNA e 18S rRNA	341F e 806R / 2024F e 2409R / 528F e 706R	*Lactobacillus nagelii, Lactobacillus harbinensis, Liquorilactobacillus ghanensis, Pseudomonas geniculate.*	*Geotrichum silvicola, Dekkera bruxellensis, Dekkera anomala, Lachancea fermentati.*	(CUFAOGLU; ERDINC, 2023a)
Argentina	16S rRNA e 18S	P0 e P6 / ITS1F e ITS4	*Lentilactobacillus hilgardii, Lactobacillus buchneri.*	*Saccharomyces cerevisiae*	(RODRÍGUEZ et al., 2023)

ND: Não disponível; **NA:** Não aplicável
Fonte: O autor

Diferentes espécies apresentam relações simbióticas e sobrevivem ou se propagam compartilhando seus bioprodutos como fontes de energia ou fatores estimuladores de crescimento. Foi estabelecido que as bebidas de kefir apresentam diferenças na proporção de sua composição em relação ao grão do qual são obtidas, dependendo do tipo de substrato de fermentação utilizado, como açúcar mascavo, melaço purificado e melaço de alta qualidade (FIORDA et al., 2017). Além disso, a bebida fermentada com o mesmo grão pode variar sua composição à medida que sucessivas fermentações são feitas em cada substrato (GAMBA et al., 2021; LOPITZ-OTSOA et al., 2006).

4.2. Dinâmica de fermentação do kefir de água

O kefir de água é um ambiente desafiador, rico em açúcar e pobre em nitrogênio (aminoácidos); portanto, a cooperação entre a comunidade microbiana é importante. Durante a fermentação, as atividades metabólicas de leveduras e bactérias produzem diversos compostos responsáveis pelo aroma e propriedades funcionais dos produtos finais. Quando os microrganismos no kefir de água se reproduzem sob condições adequadas, o dextrano (principal componente formador de estrutura do grão de kefir) é sintetizado e a biomassa do grão aumenta (CUFAOGLU; ERDINC, 2023a; FIORDA et al., 2017; LYNCH et al., 2021).

O processo de fermentação do kefir de água começa de forma aeróbica e torna-se gradualmente anaeróbico, à medida que o oxigênio é consumido e/ou eliminado pelo dióxido de carbono produzido pelas leveduras (CUFAOGLU; ERDINC, 2023a, 2023b; LYNCH et al., 2021). A sacarose presente no sistema é convertida em etanol, dióxido de carbono, ácido láctico, ácido acético, etanol, dióxido de carbono, manitol, vitaminas (especialmente vitaminas do complexo B), aminoácidos (como arginina), manitol, glicerol, ésteres e outros ácidos orgânicos. Desta forma, a concentração de sacarose diminui até 98% nas primeiras 24 h de fermentação (LAUREYS et al., 2018; LYNCH et al., 2021; SPIZZIRRI et al., 2023).

Na dinâmica comum de fermentação de kefir de água, leveduras como *Saccharomyces*, *Zygotorulaspora* e *Dekkera* hidrolisam a sacarose através de uma β-D-frutofuranosidase extracelular (invertase), produzindo glicose e frutose, que podem ser absorvidas pela célula através de difusão facilitada. A levedura utiliza esses monossacarídeos para seu metabolismo e produção de etanol, ao mesmo tempo que

disponibiliza esses açúcares simples para as bactérias do consórcio. A concentração de etanol aumenta linearmente até ultrapassar 10% do volume total. O nível de etanol cai à medida que o etanol é convertido em ácido acético pelas bactérias do ácido acético durante o processo de fermentação (LYNCH et al., 2021; MARTÍNEZ-TORRES et al., 2017).

Apesar das bactérias láticas estarem em maior número nos grãos, é a atividade metabólica das leveduras que prevalece no processo fermentativo do kefir de água. Alguns estudos mostraram que pode haver uma relação entre o CO_2 liberado pelas leveduras e o estímulo das bactérias láticas. Nas primeiras horas de fermentação do kefir de água, é possível que pequenas quantidades de CO_2 possam estimular o crescimento das bactérias láticas que, por sua vez, liberam ácidos orgânicos que acidificam o meio e podem servir de fonte de energia para as leveduras (LAUREYS; DE VUYST, 2014; TEIXEIRA, 2018).

Outras formas de interação microbiana podem existir durante a fermentação do kefir. No entanto, foi afirmado que culturas separadas de grãos microbianos de kefir não crescem em solução açucarada ou têm uma atividade bioquímica diminuída, o que complica ainda mais o estudo da associação microbiana da fermentação do kefir (FIORDA et al., 2017).

5. Kefir de água em pó

Por se tratar de um produto potencialmente probiótico e benéfico para a saúde, o interesse no consumo de kefir tem aumentado. No entanto, devido a morosidade no processo produtivo aliado à dificuldade na manutenção dos grãos, o kefir em pó surge como uma alternativa viável, contribuindo com um prazo de validade mais extenso, aumentando a facilidade no armazenamento e com uma reconstituição simples e instantânea.

Sendo um nicho e um novo mercado, as bebidas e pós não lácteos precisam competir com o já estabelecido mercado de lácteos. Além disso, as matrizes não lácteas que incluem frutas, vegetais, cereais, leguminosas e resíduos agroalimentares impõem diferentes desafios, independentemente de serem um potencial portador de probióticos e um ingrediente prebiótico (CHATURVEDI; KHARTAD; CHAKRABORTY, 2021). O processo de criação de uma matriz simbiótica não se baseia meramente na interação dos componentes prebióticos e probióticos. Em vez disso, depende de

vários fatores, como os efeitos fisiológicos dos microrganismos probióticos utilizados e da compreensão das várias forças e interações que retêm o microbioma benéfico no intestino (GURRY, 2017).

A etapa adicional do processo de secagem no desenvolvimento de pó de bebidas simbióticas não lácteas atua como uma técnica de preservação que também é um método comparativamente econômico e conveniente em escala comercial. Como a categoria de bebidas apresenta alta atividade de água (a_w) de cerca de 0,99, os produtos são suscetíveis à deterioração microbiana. Sendo assim, a secagem não só reduz as chances de deterioração microbiana, mas também o pó desenvolvido traz consigo a facilidade no transporte e no armazenamento (CHATURVEDI; KHARTAD; CHAKRABORTY, 2021).

No fluxo do processo de desenvolvimento de bebidas fermentadas em pó, a bebida é primeiramente inoculada com bactérias probióticas para fermentação e, posteriormente, toda a mistura é seca (VIVEK; MISHRA; PRADHAN, 2020). A etapa principal no desenvolvimento de um produto fermentado em pó é a secagem, ou seja, a remoção da sua parte líquida. Para isso, a secagem por spray dryer tem sido a técnica mais aplicada pela indústria de alimentos. Seu baixo custo, alta reprodutibilidade, fácil operação e rápido tempo de secagem permitem maior eficiência (BARBOSA; TEIXEIRA, 2017). Embora muito ainda precise ser investigado sobre o efeito da secagem por spray drying sobre esses microrganismos, sabe-se que seu uso pode resultar em pós estáveis (MARTÍN et al., 2015).

Outra técnica de secagem aceita para o desenvolvimento de produtos simbióticos é a liofilização. A liofilização é um processo de desidratação bem conhecido na indústria de alimentos e laticínios, onde as principais aplicações são a preservação dos microrganismos probióticos, culturas iniciadoras e material biológico. Em comparação com outras técnicas de secagem, como secagem por pulverização, a liofilização é um processo caro devido aos seus custos de investimento, operação e manutenção relativamente altos, mas o processo de liofilização produz muitos benefícios nos resultados obtidos em termos de viabilidade, qualidade e tempo de armazenamento (BHUSHANI; ANANDHARAMAKRISHNAN, 2017; SAGARA; ICHIBA, 1994; VESTERLUND; SALMINEN; SALMINEN, 2012).

No entanto, vários parâmetros intrínsecos e extrínsecos também afetam o processo geral de uma formulação em pó. Por exemplo, resistência ao calor pelos microrganismos probióticos, concentrações de oxigênio do meio, exposição à força

mecânica e osmótica, seleção do meio de secagem apropriado e parâmetros de secagem adequados etc. são alguns parâmetros cruciais a serem considerados durante a secagem por spray de qualquer alimento probiótico produtos (CHATURVEDI; KHARTAD; CHAKRABORTY, 2021).

Além das técnicas convencionais de atomização e liofilização, outros estudos têm explorado alternativas, como a secagem por janela de refração, para a produção de kefir em pó (ATALAR; DERVISOGLU, 2015; ISLEROGLU, 2019; TEIJEIRO et al., 2018; TONTUL et al., 2021; TONTUL; TOPUZ, 2017). Contudo, vale destacar que, até o momento, essas pesquisas têm se concentrado principalmente no kefir de leite.

5.1. Caracterização física e físico-química de kefir de água em pó

Na utilização de técnicas de desidratação como por exemplo, a liofilização ou secagem por atomização, as matrizes formadas inevitavelmente existem em estrutura amorfa. As matrizes amorfas são metaestáveis e podem sofrer várias alterações em suas nas propriedades físicas se as condições de armazenamento não forem adequadamente controladas. A caracterização físico-química dos produtos de secagem é uma etapa muito importante para a funcionalidade e estabilidade desses pós. De forma geral, propriedades relevantes dos pós secos são a umidade final, a atividade de água, distribuição de tamanhos das partículas, morfologia, porosidade, densidade aparente, fluidez, compactabilidade, resistência mecânica, cristalinidade ou polimorfismo e temperatura de transição vítrea (HO; TRUONG; BHANDARI, 2017; HUANG et al., 2017).

5.1.1. Tamanho, forma e morfologia

Durante o processo de formulação de produtos em pó, uma etapa muito importante é a manutenção da cápsula formada pelo material de parede utilizado. Essas microcápsulas são pequenas esferas com tamanho de alguns micrômetros a alguns milímetros de diâmetro. Elas podem ter formato regular (por exemplo, esférico, tubular e oval) ou irregular. O tamanho e a morfologia das microesferas produzidas são influenciados pelos materiais envolvidos e pela técnica de encapsulamento empregada (HUANG et al., 2017; MINJ; ANAND, 2022; RAZAVI et al., 2021)

É fundamental compreender as dimensões das partículas em produtos em pó, já que esse parâmetro exerce influência tanto no desempenho desses produtos quanto na proteção dos probióticos que podem integrar sua composição. Além disso, o tamanho, a forma e a morfologia das partículas cumprem papéis significativos em aspectos como solubilidade, dispersão, capacidade de fluxo, densidade aparente, coesão e aparência visual dos produtos. Portanto, a caracterização desses atributos é indispensável para aprimorar os processos de produção, desenvolver formulações eficazes e garantir a consistência e a qualidade dos alimentos em pó (AMIN ALI; DE CONINCK; L. RAZAFINDRALAMBO, 2023; MINJ; ANAND, 2022; RAZAVI et al., 2021).

Existem vários tipos de métodos de microscopia usados para a investigação do tamanho, formato e morfologia de microcápsulas, incluindo microscopia óptica, microscopia de fluorescência e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Outras técnicas podem ser utilizadas para validar o processo de revestimento como por exemplo a espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) (RAZAVI et al., 2021).

5.1.2. Propriedades de escoamento

As partículas de um pó possuem características diferentes e podem apresentar cavidades, fissuras e poros, entre outras formações que revelam a complexidade de avaliar a densidade das partículas. A densidade de pós é um fator significativo no processamento, armazenamento, embalagem, transporte e comercialização do produto (RAZAVI et al., 2021; ROSA; PRUDENCIO, 2023).

É bem conhecido que a densidade aparente está relacionada principalmente ao tamanho, forma e propriedades de superfície das partículas de pó e à composição do pó. A densidade aparente de uma partícula pode ser expressa como o resultado da divisão da massa de uma partícula pelo seu volume, após a retirada total do ar, pela exclusão dos poros abertos dessas partículas, e é caracterizada pela sua complexidade, dependendo de um conjunto de propriedades, como o ar presente nas partículas (ar intersticial) e fluidez (JOKIĆ et al., 2020; ROSA; PRUDENCIO, 2023).

A densidade compactada é um fator importante relacionado à embalagem e transporte de pós. A otimização de seu valor pode ser útil em termos de peso e quantidade de material a ser transportado. Um produto seco com alta densidade

compactada pode ser armazenado em embalagens menores e também reduzem os espaços com consequente redução da presença de oxigênio no interior do produto (CHANG et al., 2018). O valor de densidade compactada de pós pode ser medido com base na razão entre o peso do pó (g) e o volume de pó compactado (cm^3) (RAZAVI et al., 2021).

5.1.3. Umidade, atividade de água e higroscopicidade

A atividade de água, o teor de umidade e a higroscopicidade de materiais encapsulados têm impactos significativos na eficácia e estabilidade do produto durante o armazenamento (RAZAVI et al., 2021).

O teor de umidade do pó potencialmente probiótico influencia fortemente a estabilidade do produto e também pode influenciar a viabilidade do microrganismo durante o armazenamento, que é um dos parâmetros de qualidade a levar em consideração para pós contendo células (GUERIN et al., 2017). O conteúdo de umidade pode ser avaliado utilizando técnicas analíticas básicas, que envolvem a medição da massa da amostra antes e após a desidratação na estufa até que ela atinja um valor constante. Técnicas mais avançadas, como a espectroscopia de absorção no infravermelho, também têm a capacidade de determinar o teor de umidade (ROSA; PRUDENCIO, 2023).

A atividade de água (a_w) é um importante parâmetro na caracterização de alimentos desidratados, devido a sua influência sobre a vida útil do produto originado. Maiores valores de atividade de água indicam mais água livre disponível para as reações bioquímicas e, consequentemente, diminuição da vida útil do produto. O valor da atividade de água pode ser medido usando o instrumento de atividade de água (DUARTE et al., 2017; TAŞERI et al., 2018).

A higroscopicidade é a capacidade do material de absorver a umidade ambiental. A composição do material, a vazão de alimentação no processo de secagem, o tamanho das partículas e a concentração do material de parede influenciam significativamente a higroscopicidade. A alta higroscopicidade leva à deterioração da qualidade e à modificação das propriedades físicas (pegajosidade, fluidez, aglomeração) do pó (FERRARI; GERMER; DE AGUIRRE, 2012; JOKIĆ et al., 2020). A higroscopicidade é calculada como o peso da água absorvida por massa da

amostra (%) e pode ser determinada expondo os pós a uma solução saturada de NaCl por um período de tempo (PAULA et al., 2019).

5.1.4. Solubilidade

A solubilidade pode ser definida como a taxa de dissolução de aglomerados num líquido, sendo uma propriedade dependente também do estado físico do pó. Trata-se de uma propriedade importante para a qualidade e funcionalidade de produtos em pó, estando diretamente relacionada com a reconstituição dos mesmos. Para os consumidores, a capacidade de reconstituição rápida e completa é um dos principais indicadores de qualidade. Esse índice é influenciado pela estrutura química do material de parede utilizado e também está correlacionado com outras propriedades, como o tamanho e a forma das partículas (HO; TRUONG; BHANDARI, 2017; ROSA; PRUDENCIO, 2023; TAŞERI et al., 2018).

A maioria das técnicas propostas para determinação da solubilidade pode ser enquadrada em uma das duas classes gerais, as que estimam a quantidade de material que é dissolvido e as que determinam a quantidade de material insolúvel. Como resultado, a solubilidade é expressa em porcentagem calculada com base na massa inicial da amostra e a massa final após secagem (DUARTE et al., 2017; VISSOTTO et al., 2006).

5.1.5. Análises térmicas

A análise térmica consiste basicamente em um grupo de técnicas que analisam uma propriedade física de uma substância através do uso da temperatura controlada. Essas análises surgem como uma valiosa ferramenta na caracterização de produtos em pó microencapsulados, permitindo a investigação das propriedades térmicas desses produtos. Através das curvas que mostram a variação de massa em relação à temperatura, é possível obter conclusões sobre a forma como a água se associa aos outros componentes na matriz das microcápsulas, bem como adquirir informações sobre as interações entre os constituintes e a estabilidade térmica das amostras (BISINELLA et al., 2016).

As técnicas termoanalíticas comumente usadas são termogravimetria (TG), análise térmica diferencial (DTA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC) (BANNACH et al., 2011). O principal uso da DTA é na detecção da temperatura inicial

dos processos térmicos e de forma geral classificá-los como endotérmicos ou exotérmicos. Os dados obtidos através de TG e DSC fornecem informações importantes sobre a estabilidade dos compostos, cinética de degradação, fase de transição entre estados físicos, polimorfismo entre outros (DE AZEVEDO, 2013).

5.1.6. Espectrometria por Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia de infravermelho é uma técnica que permite a identificação de moléculas bem como a identificação de grupos funcionais. Relativamente simples e de fácil preparação, é uma técnica que tem ampla aplicabilidade nas áreas de alimentos, farmacêutica e médica e tem se destacado por ser uma das técnicas robustas utilizadas na garantia da qualidade dos alimentos (SAADI et al., 2023; VÁZQUEZ-VUELVAS et al., 2020).

Sua capacidade de exibir diferentes mudanças químicas na região do infravermelho torna o FTIR uma ferramenta fundamental no estudo da adulteração de alimentos e outras matrizes biológicas. Muitas das mudanças estruturais, incluindo reconformação na cadeia carbonila, abertura de anel e isomerização cis/trans, estão ocorrendo nesta região sensível do infravermelho, o que torna o FTIR com grande capacidade de detectar e discriminar essas mudanças estruturais. Esta técnica é rápida e adequada para estimar os constituintes, composição ou pureza de amostras (SAADI et al., 2023; VÁZQUEZ-VUELVAS et al., 2020).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Embora o kefir de água caseiro seja a forma mais comum de consumo, é possível encontrar kefir de água comercial semi-industrializado em alguns mercados globais. Em alguns casos, ele é comercializado como uma "bebida artesanal" que não está sujeita a regulamentações alimentares. No entanto, as tendências recentes nas últimas décadas, especialmente relacionadas à regulamentação de cepas probióticas, também afetaram o kefir de água, tornando necessária à sua inclusão nas normas alimentares dos países onde é consumido (MORETTI et al., 2022).

Com base nas informações discutidas neste estudo, é possível concluir que o kefir se apresenta como um potencial alimento funcional, podendo oferecer benefícios

à saúde, satisfação do consumidor e custos acessíveis. No entanto, quando se trata dos potenciais benefícios do kefir de água para a saúde, a falta de estudos clínicos exige investigações aprofundadas para apoiar a disseminação de informações que possibilitem o aumento no consumo.

Nesse cenário, o kefir de água se destaca como uma alternativa promissora ao kefir tradicional feito com leite, especialmente em um momento de transformação nos hábitos de consumo, com um aumento significativo no interesse por produtos não lácteos. Embora a produção do kefir de água possa parecer relativamente simples, uma compreensão minuciosa de sua composição, dinâmica microbiana e processos de fabricação é essencial para explorar plenamente seu potencial tanto do ponto de vista científico quanto comercial. Adicionalmente, é premente a necessidade de intensificar as pesquisas na área de culturas iniciadoras para a produção de kefir de água, a fim de possibilitar a transição desse produto, predominantemente artesanal, para uma produção industrial.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALONGI, M.; ANESE, M. Re-thinking functional food development through a holistic approach. **Journal of Functional Foods**, v. 81, p. 104466, jun. 2021.

ALVES, V. et al. Development of fermented beverage with water kefir in water-soluble coconut extract (Cocos nucifera L.) with inulin addition. **LWT**, v. 145, p. 111364, jun. 2021.

ATALAR, I.; DERVISOGLU, M. Optimization of spray drying process parameters for kefir powder using response surface methodology. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, n. 2, p. 751–757, mar. 2015.

AZI, F. et al. Comparative study of the phenolics, antioxidant and metagenomic composition of novel soy whey-based beverages produced using three different water kefir microbiota. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 55, n. 4, p. 1689–1697, 27 abr. 2020.

BANNACH, G. et al. **EFEITOS DA HISTÓRIA TÉRMICA NAS PROPRIEDADES DO POLÍMERO PET: UM EXPERIMENTO PARA ENSINO DE ANÁLISE TÉRMICAQuim. Nova**. [s.l: s.n.].

BARBOSA, J.; TEIXEIRA, P. Development of probiotic fruit juice powders by spray-drying: A review. **Food Reviews International**, v. 33, n. 4, p. 335–358, 4 jul. 2017.

BHUSHANI, A.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Freeze Drying. Em: **Handbook of Drying for Dairy Products**. [s.l.] Wiley, 2017. p. 95–121.

BISINELLA, R. Z. B. et al. Thermal analysis as screening technique to assess spray-drying process of encapsulated “yacon” juice. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 126, n. 3, p. 1841–1849, 14 dez. 2016.

BORGUINI, R. G.; TORRES, E. A. F. DA S. Alimentos orgânicos: qualidade nutritiva e segurança do alimento. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 13, n. 2, p. 64–75, 3 fev. 2015.

BRASIL. Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos, constante do anexo desta portaria. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, 1999.

BRASIL. Regulamento técnico de identidade e qualidade de leites fermentados (Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007). **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, 2007.

BRYANT, C. J. We Can’t Keep Meating Like This: Attitudes towards Vegetarian and Vegan Diets in the United Kingdom. **Sustainability**, v. 11, n. 23, p. 6844, 2 dez. 2019.

BUENO, R. S. et al. Quality and shelf life assessment of a new beverage produced from water kefir grains and red pitaya. **LWT**, v. 140, p. 110770, abr. 2021a.

BUENO, R. S. et al. Quality and shelf life assessment of a new beverage produced from water kefir grains and red pitaya. **LWT**, v. 140, p. 110770, abr. 2021b.

BUTNARIU, M.; SARAC, I. Functional Food. **International Journal of Nutrition**, v. 3, n. 3, p. 7–16, 8 fev. 2019.

CAO, C. et al. Assessment of the microbial diversity of Chinese Tianshan tibicos by single molecule, real-time sequencing technology. **Food Science and Biotechnology**, v. 28, n. 1, p. 139–145, 3 fev. 2019.

CARFÌ, D.; DONATO, A.; PANUCCIO, D. A Game Theory Coopetitive Perspective for Sustainability of Global Feeding. Em: **Game Theory**. [s.l.] IGI Global, 2018. p. 71–104.

CHANG, L. S. et al. Storage stability, color kinetics and morphology of spray-dried soursop (*Annona muricata* L.) powder: effect of anticaking agents. **International Journal of Food Properties**, v. 21, n. 1, p. 1937–1954, 1 jan. 2018.

CHATURVEDI, S.; KHARTAD, A.; CHAKRABORTY, S. The potential of non-dairy synbiotic instant beverage powder: Review on a new generation of healthy ready-to-reconstitute drinks. **Food Bioscience**, v. 42, p. 101195, ago. 2021.

CORONA, O. et al. Characterization of kefir-like beverages produced from vegetable juices. **LWT - Food Science and Technology**, v. 66, p. 572–581, mar. 2016.

CUFAOGLU, G.; ERDINC, A. N. An alternative source of probiotics: Water kefir. **Food Frontiers**, v. 4, n. 1, p. 21–31, 8 mar. 2023a.

CUFAOGLU, G.; ERDINC, A. N. Comparative analyses of milk and water kefir: Fermentation temperature, physicochemical properties, sensory qualities, and metagenomic composition. **Food Bioscience**, v. 55, p. 103079, out. 2023b.

DA SILVA FERNANDES, M. et al. Evaluation of the isoflavone and total phenolic contents of kefir-fermented soymilk storage and after the in vitro digestive system simulation. **Food Chemistry**, v. 229, p. 373–380, ago. 2017.

DE AZEVEDO, E. P. **Atomização por Spray Dryer dos extratos de Aspidosperma pyrifolium e Aspidosperma macrocarpum**. Mestrado em Química e Biotecnologia—Maceió, AL: Universidade Federal de Alagoas, 28 mar. 2013.

DIMITROVA, T.; ILIEVA, I. Consumption Behaviour towards Branded Functional Beverages among Gen Z in Post-COVID-19 Times: Exploring Antecedents and Mediators. **Behavioral Sciences**, v. 13, n. 8, p. 670, 10 ago. 2023.

DUARTE, E. L. et al. INFLUÊNCIA DA LIOFILIZAÇÃO SOBRE OS CAROTENOIDES DE FRUTOS DO CERRADO E COMPORTAMENTO HIGRÓSCOPICO DOS PÓS-LIOFILIZADOS. **Biológicas & Saúde**, v. 7, n. 23, 23 mar. 2017.

ECKEL, V. P. L. et al. Bifidobacterium tibiigranuli sp. nov. isolated from homemade water kefir. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 3, p. 1562–1570, 1 mar. 2020.

EUROPÉIA, União. Regulamento (CE) nº 178/2002 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 28 de janeiro de 2002. Determina os princípios e normas gerais da legislação alimentar, cria a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos e estabelece procedimentos em matéria de segurança dos gêneros alimentícios. **Jornal Oficial das Comunidades Europeias, Bruxelas L**, v. 31, p. 1-24, 2002.

FAGNANT, H. S. et al. Orally Ingested Probiotic, Prebiotic, and Synbiotic Interventions as Countermeasures for Gastrointestinal Tract Infections in Nonelderly Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Advances in Nutrition**, v. 14, n. 3, p. 539–554, maio 2023.

FERRARI, C. C.; GERMER, S. P. M.; DE AGUIRRE, J. M. Effects of Spray-Drying Conditions on the Physicochemical Properties of Blackberry Powder. **Drying Technology**, v. 30, n. 2, p. 154–163, 7 fev. 2012.

FIORDA, F. A. et al. Microbiological, biochemical, and functional aspects of sugary kefir fermentation - A review. **Food Microbiology**, v. 66, p. 86–95, set. 2017.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). (2021) **Enhancing Retailer Standards in the Supplemental Nutrition Assistance Program (SNAP)**.

FOOD STANDARDS AUSTRALIAN NEW ZEALAND. (2016). **No-alcoholic beverages and brewed soft drinks.** Australian New Zealand Food Standards Code—Standard 2.6.2. Disponível em: <https://www.legislation.gov.au/Details/F2022C00910>

GAMBA, R. R. et al. Microbiological and Functional Characterization of Kefir Grown in Different Sugar Solutions. **Food Science and Technology Research**, v. 25, n. 2, p. 303–312, 2019.

GAMBA, R. R. et al. Changes in Microbiota During Multiple Fermentation of Kefir in Different Sugar Solutions Revealed by High-Throughput Sequencing. **Current Microbiology**, v. 78, n. 6, p. 2406–2413, 7 jun. 2021.

GIBSON, G. R. et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 14, n. 8, p. 491–502, 14 ago. 2017.

GUERIN, J. et al. Lactobacillus rhamnosus GG encapsulation by spray-drying: Milk proteins clotting control to produce innovative matrices. **Journal of Food Engineering**, v. 193, p. 10–19, jan. 2017.

GULITZ, A. et al. The microbial diversity of water kefir. **International Journal of Food Microbiology**, v. 151, n. 3, p. 284–288, dez. 2011.

GUR, J.; MAWUNTU, M.; MARTIROSYAN, D. FFC's Advancement of Functional Food Definition. **Functional Foods in Health and Disease**, v. 8, n. 7, p. 385, 31 jul. 2018.

GURRY, T. Synbiotic approaches to human health and well-being. **Microbial Biotechnology**, v. 10, n. 5, p. 1070–1073, 3 set. 2017.

GUZEL-SEYDIM, Z. B.; GÖKIRMAKLI, Ç.; GREENE, A. K. A comparison of milk kefir and water kefir: Physical, chemical, microbiological and functional properties. **Trends in Food Science & Technology**, v. 113, p. 42–53, jul. 2021.

HASAN, M. et al. Research trends and approaches for the nutritional and bio-functionality enhancement of fermented soymilk. **Journal of Functional Foods**, v. 107, p. 105698, ago. 2023a.

HASAN, M. et al. Research trends and approaches for the nutritional and bio-functionality enhancement of fermented soymilk. **Journal of Functional Foods**, v. 107, p. 105698, ago. 2023b.

HO, T. M.; TRUONG, T.; BHANDARI, B. R. Methods to characterize the structure of food powders – a review. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 81, n. 4, p. 651–671, 3 abr. 2017.

HSIEH, H.-H. et al. Effects of cow's and goat's milk as fermentation media on the microbial ecology of sugary kefir grains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 157, n. 1, p. 73–81, jun. 2012.

HUANG, S. et al. Spray drying of probiotics and other food-grade bacteria: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 63, p. 1–17, maio 2017.

ISLEROGLU, H. **FREEZE DRYING AND MOISTURE ADSORPTION KINETICS OF KEFIR POWDERItal. J. Food Sci**. [s.l: s.n.].

JOHNSTON, B. C. et al. Microbial Preparations (Probiotics) for the Prevention of Clostridium difficile Infection in Adults and Children: An Individual Patient Data Meta-analysis of 6,851 Participants. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 39, n. 07, p. 771–781, 26 jul. 2018.

JOKIĆ, S. et al. An Approach to Value Cocoa Bean By-Product Based on Subcritical Water Extraction and Spray Drying Using Different Carriers. **Sustainability**, v. 12, n. 6, p. 2174, 11 mar. 2020.

LAUREYS, D. et al. Oxygen and diverse nutrients influence the water kefir fermentation process. **Food Microbiology**, v. 73, p. 351–361, ago. 2018.

LAUREYS, D.; DE VUYST, L. Microbial Species Diversity, Community Dynamics, and Metabolite Kinetics of Water Kefir Fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 8, p. 2564–2572, 15 abr. 2014.

LOPITZ-OTSOA, F. et al. Kefir: una comunidad simbiótica de bacterias y levaduras con propiedades saludables. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 23, n. 2, p. 67–74, jun. 2006.

LYNCH, K. M. et al. An update on water kefir: Microbiology, composition and production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 345, p. 109128, maio 2021.

MANOJ, P. M. et al. Fruit based probiotic functional beverages: A review. **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 14, p. 100729, dez. 2023.

MARRERO, S. C. et al. New Trends and Applications in Fermented Beverages. Em: **Fermented Beverages**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 31–66.

MARTÍN, M. J. et al. Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 27, p. 15–25, fev. 2015.

MARTÍNEZ-TORRES, A. et al. Inferring the role of microorganisms in water kefir fermentations. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 52, n. 2, p. 559–571, fev. 2017.

MARTIROSYAN, D. M.; SINGH, J. A new definition of functional food by FFC: what makes a new definition unique? **Functional Foods in Health and Disease**, v. 5, n. 6, p. 209, 1 jul. 2015.

MASCARAQUE, Maria. Going plant-based: the rise of vegan and vegetarian food. **Euromonitor International: London, UK**, 2020.

MINJ, S.; ANAND, S. Development of a spray-dried conjugated whey protein hydrolysate powder with entrapped probiotics. **Journal of Dairy Science**, v. 105, n. 3, p. 2038–2048, mar. 2022.

MOINAS, M.; HORISBERGER, M.; BAUER, H. The structural organization of the Tibi grain as revealed by light, scanning and transmission microscopy. **Archives of Microbiology**, v. 128, n. 2, p. 157–161, dez. 1980.

MOJIKON, F. D. et al. Probiotication of Nutritious Fruit and Vegetable Juices: An Alternative to Dairy-Based Probiotic Functional Products. **Nutrients**, v. 14, n. 17, p. 3457, 23 ago. 2022.

MORETTI, A. F. et al. Water kefir, a fermented beverage containing probiotic microorganisms: From ancient and artisanal manufacture to industrialized and regulated commercialization. **Future Foods**, v. 5, p. 100123, jun. 2022.

PAREDES, J. L.; ESCUDERO-GILETE, M. L.; VICARIO, I. M. A new functional kefir fermented beverage obtained from fruit and vegetable juice: Development and characterization. **LWT**, v. 154, p. 112728, jan. 2022.

PATEL, S. H. et al. A temporal view of the water kefir microbiota and flavour attributes. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 80, p. 103084, ago. 2022.

PAULA, D. DE A. et al. Use of gelatin and gum arabic for microencapsulation of probiotic cells from Lactobacillus plantarum by a dual process combining double emulsification followed by complex coacervation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 133, p. 722–731, jul. 2019.

PENDÓN, M. D. et al. Water kefir: Factors affecting grain growth and health-promoting properties of the fermented beverage. **Journal of Applied Microbiology**, v. 133, n. 1, p. 162–180, 1 jul. 2022.

PIDOUX, M.; BRILLOUET, J. M.; QUEMENER, B. Characterization of the polysaccharides from aLactobacillus brevis and from sugary kefir grains. **Biotechnology Letters**, v. 10, n. 6, p. 415–420, jun. 1988.

RANDAZZO, W. et al. Development of new non-dairy beverages from Mediterranean fruit juices fermented with water kefir microorganisms. **Food Microbiology**, v. 54, p. 40–51, abr. 2016.

RAZAVI, S. et al. Microencapsulating polymers for probiotics delivery systems: Preparation, characterization, and applications. **Food Hydrocolloids**, v. 120, p. 106882, nov. 2021.

RODRÍGUEZ, M. A. et al. Microbiological and chemical characterization of water kefir: An innovative source of potential probiotics for bee nutrition. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 55, n. 2, p. 176–180, abr. 2023.

ROSA, E.; PRUDENCIO, E. S. A comprehensive approach about comparison between drying technologies and powdered dairy products. **Food Research International**, v. 173, p. 113326, nov. 2023.

SAADI, S. et al. Discrimination of food adulteration by means of PCR and FTIR. **Food and Humanity**, v. 1, p. 1362–1378, dez. 2023.

SAGARA, Y.; ICHIBA, J. MEASUREMENT OF TRANSPORT PROPERTIES FOR THE DRIED LAYER OF COFFEE SOLUTION UNDERGOING FREEZE DRYING. **Drying Technology**, v. 12, n. 5, p. 1081–1103, jan. 1994.

SPIZZIRRI, U. G. et al. Non-dairy kefir beverages: Formulation, composition, and main features. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 117, p. 105130, abr. 2023.

TANGYU, M. et al. Fermentation of plant-based milk alternatives for improved flavour and nutritional value. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 23–24, p. 9263–9275, 4 dez. 2019.

TAŞERI, L. et al. Determination of drying kinetics and quality parameters of grape pomace dried with a heat pump dryer. **Food Chemistry**, v. 260, p. 152–159, set. 2018.

TAVARES, P. P. L. G. et al. Produção de bebida fermentada kefir de quinoa (Chenopodium quinoa) saborizada com cacau (Theobroma cacao) em pó. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias - Brazilian Journal of Agricultural Sciences**, v. 13, n. 4, p. 1–7, 31 dez. 2018.

TEIJEIRO, M. et al. Suitability of kefir powder production using spray drying. **Food Research International**, v. 112, p. 169–174, out. 2018.

TEIXEIRA, S. T. **Otimização da produção do quefir de água**. Tese (doutorado)—VIÇOSA: Universidade Federal de Viçosa, 2018.

TONTUL, I. et al. The impact of refractance window drying conditions on the physical and microbiological properties of kefir powder. **Food Bioscience**, v. 43, p. 101317, out. 2021.

TONTUL, I.; TOPUZ, A. Spray-drying of fruit and vegetable juices: Effect of drying conditions on the product yield and physical properties. **Trends in Food Science & Technology**, v. 63, p. 91–102, maio 2017.

TU, C. et al. Quality and metagenomic evaluation of a novel functional beverage produced from soy whey using water kefir grains. **LWT**, v. 113, p. 108258, out. 2019.

VÁZQUEZ-VUELVAS, O. F. et al. A comparative FTIR study for supplemented agavin as functional food. **Food Hydrocolloids**, v. 103, p. 105642, jun. 2020.

VERCE, M.; DE VUYST, L.; WECKX, S. Shotgun Metagenomics of a Water Kefir Fermentation Ecosystem Reveals a Novel Oenococcus Species. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 13 mar. 2019.

VESTERLUND, S.; SALMINEN, K.; SALMINEN, S. Water activity in dry foods containing live probiotic bacteria should be carefully considered: A case study with Lactobacillus rhamnosus GG in flaxseed. **International Journal of Food Microbiology**, v. 157, n. 2, p. 319–321, jul. 2012.

VISSOTTO, F. Z. et al. Avaliação da influência dos processos de lecitinação e de aglomeração nas propriedades físicas de achocolatado em pó. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 666–671, set. 2006.

VIVEK, K.; MISHRA, S.; PRADHAN, R. C. Characterization of spray dried probiotic Sohiong fruit powder with Lactobacillus plantarum. **LWT**, v. 117, p. 108699, jan. 2020.

WALDHERR, F. W. et al. Identification and characterization of a glucan-producing enzyme from Lactobacillus hilgardii TMW 1.828 involved in granule formation of water kefir. **Food Microbiology**, v. 27, n. 5, p. 672–678, ago. 2010.

XU, D. et al. Lifestyle of Lactobacillus hordei isolated from water kefir based on genomic, proteomic and physiological characterization. **International Journal of Food Microbiology**, v. 290, p. 141–149, fev. 2019.

YERLIKAYA, O.; AKAN, E.; KINIK, Ö. The metagenomic composition of water kefir microbiota. **International Journal of Gastronomy and Food Science**, v. 30, p. 100621, dez. 2022.

4. ARTIGO ORIGINAL

Kefir de água em pó: efeito da secagem por atomização e da liofilização nas propriedades físicas, físico-químicas e microbiológicas[1]

RESUMO

Este estudo teve como objetivo desenvolver e analisar as características físico-químicas, microbiológicas e tecnológicas do kefir de água em pó. A melhor condição de fermentação para o kefir de água obtido neste estudo foi utilizando 5% de grãos, 10% de açúcar mascavo e temperatura de incubação de 25 °C. Para a análise metataxonômica realizada nos grãos de kefir e bebida fermentada, verificou-se que as composições bacterianas compreendiam sete gêneros, sendo eles: *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Sporolactobacillus* e *Zymomonas*. Dentro destes gêneros foram identificadas nove espécies distintas sendo que cerca de 94,31% da composição dos grãos e 91,68% da composição da bebida fermentada é da espécie *Zymomonas mobilis*. Com relação a diversidade fúngica, cinco gêneros foram identificados tanto nos grãos quanto na bebida fermentada sendo estes representados por *Lachancea*, *Saccharomyces*, *Torulaspora*, *Wickerhamomyces* e *Pichia*. A espécie *Lachancea fermentati* correspondeu a 95,54% da composição dos grãos e 67,53% da composição da bebida fermentada. Considerando a potencialidade de oferecer uma fonte de microrganismos viáveis e probióticos, a secagem do kefir por liofilização foi um método alternativo para produção de alimentos estáveis e com viabilidade preservada. Apesar da redução logarítmica da ordem de 3 logs UFC/g na secagem por atomização, as contagens de microrganismos mantidas nas amostras reforçam a secagem por atomização como um método potencial para secagem de kefir de água. Os testes avaliados apresentaram propriedades físico-químicas ideais considerando condições já utilizadas pela indústria e academia. A liofilização e a secagem por spray ampliam o alcance e a aplicabilidade do kefir de água, permitindo maior acessibilidade e promovendo seus potenciais benefícios à saúde de forma mais prática e versátil.

Palavras-chave: metataxonômica, spray dryer, liofilização, cinética, maltodextrina, inulina.

[1] Artigo submetido à revista Advanced Powder Technology em 29 de outubro de 2023.

Powdered water kefir: effect of spray drying and lyophilization on physical, physicochemical, and microbiological properties

ABSTRACT

This study aimed to develop and analyze the physicochemical, microbiological and technological characteristics of powdered water kefir. The best fermentation condition for the water kefir obtained in this study was using 5% grains, 10% brown sugar and an incubation temperature of 25 °C. For the metataxonomic analysis carried out on kefir grains and fermented drink, it was found that the bacterial compositions comprised seven genera, namely: *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Sporolactobacillus* and *Zymomonas*. Within these genera, nine distinct species were identified, with approximately 94.31% of the grain composition and 91.68% of the fermented drink composition being the species *Zymomonas mobilis*. Regarding fungal diversity, five genera were identified in both the grains and the fermented drink, these being represented by *Lachancea*, *Saccharomyces*, *Torulaspora*, *Wickerhamomyces* and *Pichia*. The species *Lachancea fermentati* corresponded to 95.54% of the grain composition and 67.53% of the fermented drink composition. Considering the potential to offer a source of viable microorganisms and probiotics, drying kefir by freeze-drying was an alternative method for producing stable foods with preserved viability. Despite the logarithmic reduction of the order of 3 logs CFU/g in spray drying, the microorganism counts maintained in the samples reinforce spray drying as a potential method for drying water kefir. The evaluated tests presented ideal physicochemical properties considering conditions already used by industry and academia. Freeze-drying and spray drying expand the reach and applicability of water kefir, allowing greater accessibility and promoting its potential health benefits in a more practical and versatile way.

Keywords: metataxonomics, spray dryer, lyophilization, kinetics, maltodextrin, inulin.

5. INTRODUCTION

In recent years, with the emergence of various diseases, consumer awareness of food consumption has increased significantly. The impact of food on health has enormously contributed to increased demand for products that contribute to beneficial health effects and reduce the risk of disease (Butnariu and Sarac, 2019). The role of a balanced diet in maintaining health is of interest to the scientific community, and numerous studies prove the role of some foods in reducing the risk of particular diseases. Consequently, there was an increase in the research of new natural components and the development of new products, enabling innovation in the food area and creating new market niches, mainly related to functional products (YERLIKAYA; AKAN; KINIK, 2022).

The development of new functional beverages is a growing food industry sector that aims to meet the demand for healthier products. Although fermented milks are the most popular functional beverage in Europe and America (Açik et al., 2020), there is a growing demand for functional non-dairy beverages, which are particularly attractive among vegans, vegetarians, and hypersensitive consumers with lactose intolerance or dairy protein allergy (KANDYLIS et al., 2016; PRADO et al., 2008).

Water kefir is a non-dairy kefir obtained by fermenting inoculated water kefir grains in a sucrose solution. Brown sugar is the main substrate used for water kefir fermentation (Borguini and Torres, 2015; Fiorda et al., 2017; Guzel-Seydim et al., 2021). However, several vegetables and fruits are used as substrates in kefir fermentation, such as soy, onion, ginger, carrot, apple, pineapple, grape, quince, kiwi, pear, melon, strawberry, pomegranate, tomato, and coconut (CORONA et al., 2016; DA SILVA FERNANDES et al., 2017; FIORDA et al., 2017; RANDAZZO et al., 2016) as an option for diversification, nutritional enrichment, and improvement of the sensory quality of the product.

Kefir’s fermentation can last from two to three days at a temperature of 20–25 °C, after which fruit juices or pulps can be added to improve the flavor (Laureys and De Vuyst, 2014). The fermented beverage obtained is carbonated, cloudy, slightly alcoholic, and sweet, and it is very popular among vegan consumers. The cultivation conditions and the microbiological composition of the grains mainly determine their composition. The final products of fermentation are ethanol, lactic acid, mannitol, acetic acid, glycerol, and other organic acids (FIORDA et al., 2017; GULITZ et al., 2011).

Because it is a potentially probiotic product with health benefits, interest in kefir consumption has increased. Water kefir fermentation conditions, grains structure, and substrate differences result in different microbial compositions. Commonly, water kefir grains are formed by cultures of lactic and acetic acid bacteria, including the genera *Lactobacillus*, *Acetobacter*, and *Gluconobacter*, as well as yeasts of the genera *Pichia*, *Saccharomyces*, Kazachstania, *Candida*, and *Zygosaccharomyces*, living in symbiosis (GUZEL-SEYDIM; GÖKIRMAKLI; GREENE, 2021; XU et al., 2019). Kefir microflora has been investigated for many years with culture-dependent techniques. However, the discovery of metataxonomic methods for analyzing the microbiota of fermented foods has been a promising approach to understanding the microbial dynamics of this complex biota (Ilıkkan and Bağdat, 2021).

Despite the numerous benefits mentioned above associated with the consumption of water kefir, there are some difficulties in obtaining the beverage; among them, the length of the production process, the difficulty in maintaining the viability of the grains, and the lack of product standardization stand out. In this sense, powdered kefir emerges as a viable alternative, contributing to longer shelf life, easy storage, and instant reconstitution, making it a convenient product. For this, the most widespread methods for producing powdered foods are spray drying and lyophilization techniques (Atalar and Dervisoglu, 2015; Chaturvedi et al., 2021). Several intrinsic and extrinsic parameters affect the overall powder formulation process. For example, resistance to heat and cold by the microorganisms present in the beverage, concentrations of oxygen in the medium, exposure to mechanical and osmotic force, and adequate drying parameters are some criterion to be maintained when drying any potentially probiotic food. To avoid decline in the viability, specific drying agents, such as starches and maltodextrins, are added to the material, and thermoprotective agents, such as trehalose, glucose, inulin, and oligosaccharides, are used to increase the survival of microorganisms during drying processes (CHATURVEDI; KHARTAD; CHAKRABORTY, 2021; TEIJEIRO et al., 2018). Thus, this study aimed to develop and analyze powdered water kefir's physical-chemical, microbiological, and technological characteristics.

6. MATERIAL AND METHODS

6.1. Material

The water kefir grains were acquired by donation from a local producer in the Brazilian state of Santa Catarina. Potable water, brown sugar (DaColônia, Santo Antônio da Patrulha – RS, Brazil), inulin D.E. 10 (Beneo, Mannheim, Germany) and maltodextrin D.E. 10 (Ingredion, Mogi Guaçu – SP, Brazil) were kindly provided by the company Duas Rodas. De Man–Rogosa–Sharpe Agar – MRS (Merck, Germany), Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar – DRBC (Merck, Germany), and Plate Count Agar – PCA (Merck, Germany) were used for the microbiological assays. All reagents used were analytical grade.

6.2. Maintenance of kefir grains

The grains were inoculated and kept in a filtered water and brown sugar solution (soluble solids (SS) concentrations of 10g/100g) at 25 ± 1 °C in a BOD (SolidSteel, Brazil). Kefir grains were reactived with continuous change of the nutrient solution every 24 hours, as described by Alves et al. (2021).

6.3. Fermentation kinetics of water kefir culture

In order to define the best fermentation parameters and subsequently submit the fermented beverage to the drying processes, fermentation kinetics was constructed following a completely randomized design in a 2 x 2 x 2 factorial scheme, where different concentrations of grains and substrate (brown sugar) and different incubation temperatures were evaluated (Table 1). The fermentation processes lasted 48 hours.

Table 1. Water kefir fermentation conditions

	Grains (%)	Substract (%)	Fermentation Temperature (°C)
Experiment 1	5.0	5.0	25
Experiment 2	10.0	10.0	25
Experiment 3	5.0	10.0	25
Experiment 4	10.0	5.0	25
Experiment 5	5.0	5.0	32
Experiment 6	10.0	10.0	32
Experiment 7	5.0	10.0	32
Experiment 8	10.0	5.0	32

To choose the best fermentation condition, the following parameters were used: the condition with the highest lactic bacteria count, the condition with the highest grain mass growth, and finally (according to equation 1), the condition that at the end of the

48 hours of fermentation reached a pH of 4.5, considered optimal for water kefir (FIORDA et al., 2017).

$$X(g/100\,g) = \left(\frac{mkf - mfi}{mki}\right) \times 100 \quad \text{(eq. 1)}$$

Where:

mki = kefir grain starter mass

mkf = kefir grain mass recovered after fermentation

According to the behavior of the data and using non-linear regression, it was possible to adjust mathematical models that describe the variation of the pH value as a function of fermentation time (equation 2).

$$\hat{y} = y_{eq} + \left(y_0 - y_{eq}\right)e^{-kt^n} \quad \text{(eq. 2)}$$

Where:

$\hat{y}$: estimated value for the pH response variable

y_0, y_{eq}, k, and n: model parameters

6.4. Molecular microbial identification

After defining the best fermentation condition, the microbial diversity of the kefir grains and the fermented beverage was determined by metatoxonomic analysis using MiSeq Sequencing System (Illumina Inc., USA) and the V2 kit, with 300 cycles and single-end sequencing. For high-throughput sequencing of the V3/V4 regions of the 16S rRNA gene and the ITS1 and ITS2 regions of the ITS intergenic region, a 25 g/mL aliquot of the sample was homogenized with 225 mL of tryptone saline. After this step, DNA extraction was performed using the magnetic bead technique (Neoprospecta Microbiome Technologies, Brazil). Then, the PCR reaction was performed in triplicate using Platinum Taq Polymerase (Invitrogen, USA) under the conditions: 95 °C for 5 minutes, 25 cycles of 95 °C for 45 seconds, 55 °C for 30 seconds, 72 °C for 45 seconds, and a final extension at 72°C for 2 minutes. The sequences were analyzed using a pipeline and libraries preparation following a proprietary protocol (Neoprospecta Microbiome Technologies, Brazil). Amplification was performed with primers 341F (CCTACGGGRSGCAGCAG) (Wang and Qian, 2009) and 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT) universal for the V3/V4 region of the 16S rRNA gene (CAPORASO et al., 2012). For fungi, amplification was generated with primers for the

ITS1 region, primer ITS1 (GAACCWGCGGARGGATCA) (SCHMIDT et al., 2013) and primer ITS2 (GCTGCGTTCTTCATCGATGC) (WHITE et al., 1990). The DNA sequences obtained were compared with library databases (QUAST et al., 2012) and Greengenes (DESANTIS et al., 2006) containing several previously characterized DNA sequences.

6.5. Drying step

With the established fermentation conditions, the beverage obtained was dehydrated. For spray drying and lyophilization, three formulations with different types of carriers were developed to evaluate the effect on microbial viability and the effect of the obtained powders on the physicochemical characteristics. The feed solution T01 consisted of using 20% (w/v) of maltodextrin as a carrier, feed solution T02 was composed of 10% (w/v) maltodextrin and 10% (w/v) inulin, and finally, the T03 feed solution had 20% (w/v) inulin as a carrier. The carriers were mixed with the fermented beverage with a controllable speed homogenizer before and during the drying process.

6.5.1. Spray drying

Spray drying was performed through atomization in a laboratory-scale spray dryer (B-290 mini spray dryer, Buchi, Flawil, Switzerland) at a constant inlet air temperature of 135°C ± 1°C and a pumping rate of 20% according to Atalar and Dervisoglu (2015) and Verruck et al. (2019), with modifications. Under these conditions, the outlet temperature was between 35°C and 40°C.

6.5.2. Lyophilization

The different feed solutions (T01, T02, and T03) were frozen (-80 °C ± 2 for 24 h) in aluminum trays with a capacity of approximately 150 g of sample each on the same day they were produced. Then, the samples were lyophilized in a Liotop L101 lyophilizer (São Carlos, São Paulo, Brazil) and removed from the lyophilizer 24 h later (vacuum: 0.200–0.300 µmHg and condenser temperature of -37 °C ± 2). All lyophilized and spray-dried samples were submitted to physical-chemical (pH, moisture, and water activity), physical (flow properties, hygroscopicity, solubility, FTIR, DSC, color

parameters, and particle morphology), and microbiological analyses (quantification of acid lactic bacteria, molds and yeasts and acetic bacteria).

6.6. Microbiological analyzes

MRS agar was used to count LAB (Merck, Germany), and the plates were incubated at 37°C under anaerobic conditions for 72 h. DRBC agar was used to count molds and yeasts (Merck, Germany) with incubation of the plates at 25°C for 24-72 h. For the identification of acetic bacteria, Frateur agar was used at an incubation temperature of 25°C for 5-10 days (CASSONI, 2008). The results were expressed in colony-forming units per milliliter (CFU/mL).

6.7. Physicochemical analysis

The pH analysis was performed using the potentiometric method, introducing the electrode directly into the samples and into the powders in a 1% solution (Mettler Toledo Seven Easy S20, Ohio, United States). Moisture was determined by direct heating in an oven at 105°C. Water activity was determined using an Aqualab® 3TE digital hygrometer (Decagon Devices Inc, Pullman, USA) at 25 °C. All analyses were performed according to Adolfo Lutz Institute (2008).

6.8. Densidities

The bulk (*ρbulk*) and tapped (*ρtapped*) densities were calculated as proposed by Jinapong et al. (2008), with modifications. For *pbulk*, 2 g of each spray-dried and lyophilized powder sample were gently placed in 10 mL graduated cylinders, and the filled volume was read. The same procedure was performed for *ptapped*. Before reading the volume, the test tube was tapped vigorously against a surface until there was no further change in volume. Both densities were calculated by dividing the mass of the dry powder by the volume occupied in the graduated cylinder.

6.9. Water Solubility

Water solubility was assessed by adding 1 g of each spray-dried and lyophilized powder sample to 25 mL of distilled and stirred water for 5 min using a magnetic stirrer. The solution was centrifuged at 760 × *g* for 10 min, and 20 mL of the supernatant were

transferred to a pre-weighed Petri dish and subjected to drying in an oven at 105°C overnight, as described by Botrel et al. (2014). Water solubility (%) was calculated as the percentage of dry supernatant compared to the initial amount of powder (1g).

6.10. Fourier Transform Infrared (FTIR)

Absorption spectra in the infrared region were obtained by Fourier Transform Infrared using the Perkin Elmer Spectrum 100 spectrophotometer with a resolution of 4 cm^{-1} in the region of 4,000–600 cm^{-1} with the attenuated total reflection technique (ATR) with a germanium crystal.

6.11. Differential Scanning Calorimetry (DSC)

Differential scanning calorimetry (DSC) of the samples was obtained using a Shimadzu DSC-50 (Shimadzu, Kyoto, Japan). Approximately 5mg of each sample was placed in sealed aluminum containers under a dynamic synthetic air atmosphere of 20 mL min^{-1} and heated from −30 °C to 210 °C, with a heating rate of 5 °C min^{-1}. The DSC device was preliminarily calibrated with an indium reference standard (VERRUCK et al., 2018).

6.12. Color Properties

The powder colors were determined using a Byk Gardner colorimeter (Konica Minolta), operating the CIELAB system, in which L* (lightness), a* (red-green), and b* (yellow-blue) were the coordinates of chromaticity. The total color difference (ΔE) between samples submitted to different methods was calculated according to Verruck et al. (2015).

6.13. Hygroscopicity

The hygroscopicity of the microcapsules was determined according to the method described by Dias et al. (2018). One gram of each kefir powder was placed in Petri dishes and then stored in a glass desiccator containing a saturated sodium chloride solution (75.3% RH at 25 ± 1 °C) for seven days. Hygroscopicity was expressed in g of moisture adsorbed per 100g of dry solids (g/100g).

6.14. Particle Morphology

Morphology was evaluated using a Jeol scanning electron microscope, model JSM 6390 LV (Jeol, Tokyo, Japan), at an accelerating voltage of 10 kV. Samples were fixed onto stubs and coated with gold using a cathodic vacuum atomization coater (Leica, EM SCD 500, Wetzlar, Germany).

6.15. Statistical analysis

Fermentation kinetics, spray and lyophilization (freeze drying) experiments, and powder characterization analyses were duplicated. The results were subjected to analysis of variance and compared by Tukey's test at a significance level of 5% using the Statistica software version 13.3 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA) with the results expressed as mean ± standard deviation.

7. RESULTS AND DISCUSSION

7.1. Fermentation Kinetics

Table 2 shows the values obtained for the growth of lactic acid bacteria, substrate consumption, and mass growth of water kefir grains in different fermentation conditions. It was observed that the populations of lactic acid bacteria ranged from 5.42 ± 0.08 to 6.71 ± 0.19 log CFU/mL. The lowest value for this group was attributed to the T4 and T8 experiments, which may be related to the percentage of kefir grains greater than the amount of substrate available. During the to the dynamics of fermentation, the yeasts present in the kefir grains hydrolyze sucrose by invertase activity, thus raising the levels of glucose and fructose in the medium. Lactic acid bacteria can use these monosaccharides as a carbon source as long as the medium favors their growth (FIORDA et al., 2017). The rapid consumption of sucrose in the T4 and T8 experiments (73.05 ± 0.03 and 72.71 ± 0.01% respectively), suggests that yeast metabolism has been favored. According to Magalhães et al., (2010), during the first 24 hours of fermentation, sucrose consumption provides ethanol production by yeasts (mainly *Saccharomyces cerevisiae*).

Table 2. Response to different water kefir fermentation conditions

	Independent Variables		Response Variables		
Treatment	% of kefir grains	% substrate (brown sugar)	Lactic bacteria (log CFU/ mL)	Substrate consumption (%)	Grain mass growth (%)
T1	5	5	6.50 ± 0.13[ab]	64.57 ± 0.03[ab]	74.10 ± 7.25[ab]
T2	10	10	6.30 ± 0.13[bc]	67.06 ± 0.01[ab]	69.87 ± 1.76[ab]
T3	5	10	6.71 ± 0.19[a]	65.22 ± 0.01[ab]	100.86 ± 10.20[a]
T4	10	5	5.42 ± 0.08[e]	73.05 ± 0.03[a]	54.64 ± 1.47[b]
T5	5	5	6.14 ± 0.09[cd]	55.77 ± 0.02[c]	84.81 ± 7.34[ab]
T6	10	10	5.97 ± 0.17[d]	51.28 ± 0.03[c]	72.67 ± 7.54[ab]
T7	5	10	6.29 ± 0.02[b]	51.73 ± 0.03[c]	96.91 ± 1.15[ab]
T8	10	5	5.52 ± 0.02[e]	72.71 ± 0.01[a]	57.26 ± 3.75[b]

Results are expressed as mean ± standard deviation (n = 2). Equal lowercase letters in the same column do not present statistical difference among the conditions evaluated by the Tukey's test ($p>0.05$). T1, T2, T3, and T4: incubation at 25 °C; T5, T6, T7, and T8: incubation at 30 °C.

T1 and T3 experiments resulted in the highest lactic acid bacteria populations (6.50 and 6.71 log CFU/mL, respectively). Under these conditions, the proportions of available sucrose were 1:1 and 2:1 (sucrose:grains). The greater amount of substrate available in the T3 test hypothetically did not cause disorder in the common fermentation dynamics. After the fermentation process, a statistically significant difference ($p<0.05$) was identified in the average increase in kefir grain masses. These showed growth that varied from 54.64 ± 1.47% to 100.86 ± 10.20% in relation to the initial grain masses during the fermentation period. The grain mass increasing was observed during the backslopping process, being highly affected by the intrinsic characteristics of the grain, by environmental factors such as available nutrients, grain inoculum, temperature, and fermentation time (Laureys et al., 2019; Laureys and De Vuyst, 2017). T3 was the test with the highest grain mass growth, in which substrate availability is greater compared to the number of kefir grains inoculated. The same result was described by Laureys et al. (2018), in which the condition with the highest concentration of nutrients improved grain growth.

Water kefir grain growth can slow down due to excess acid stress during fermentation. Glucansucrases are enzymes produced by LAB responsible for water kefir grain growth. They are extracellular enzymes whose activity is optimal at pH 4.0-5.5 and decreases at lower pH values (Côté and Skory, 2012; Laureys et al., 2019;

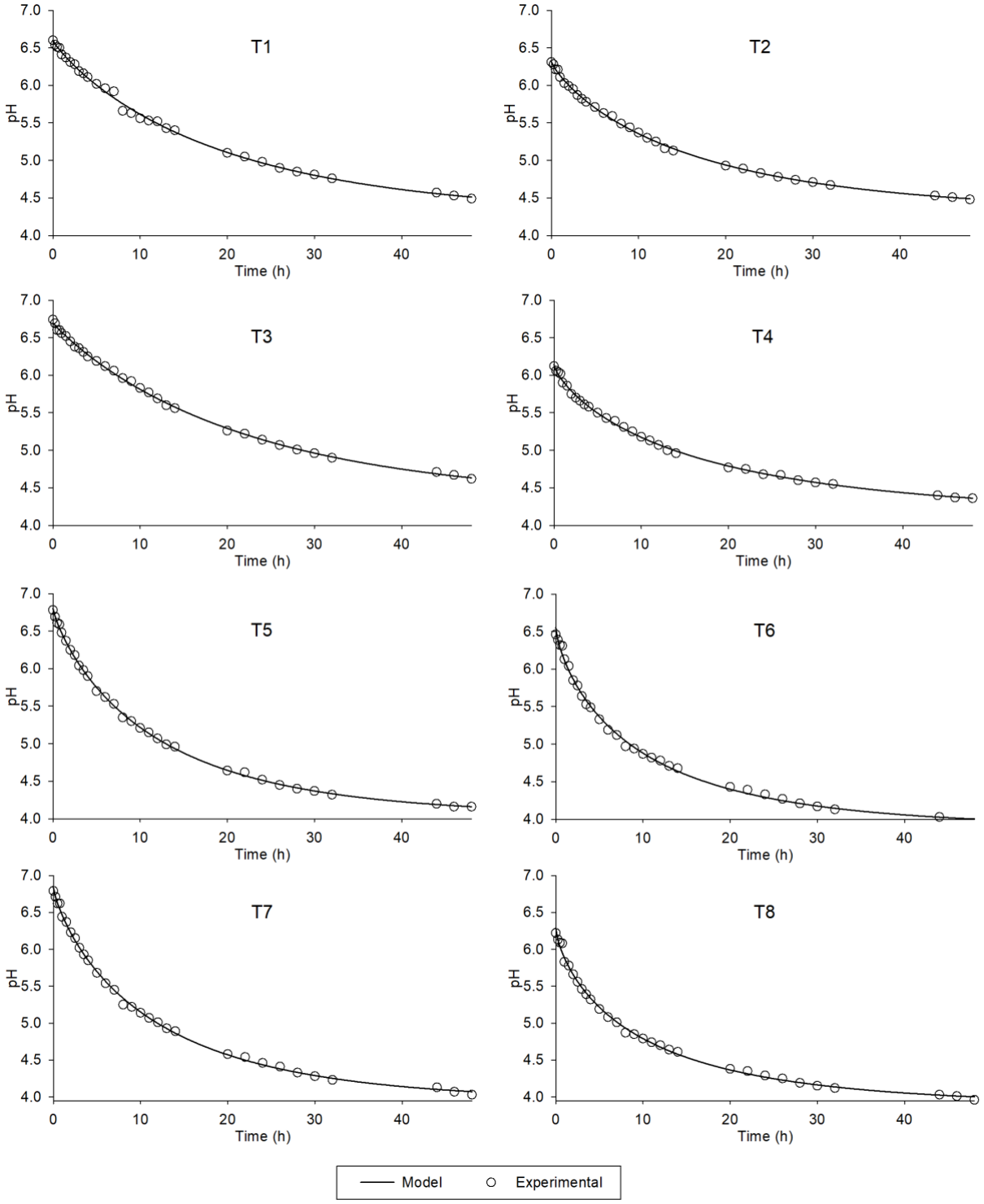
Waldherr et al., 2010). In this sense, the results shown in Figure 1 confirm that the T3 test at the end of 48 hours of fermentation presented the ideal pH condition, with a value of 4.50.

Table 3 presents the adjusted parameter values of the model to this variable. Figure 1 presents the pH variation curves over time for the different treatments. The model proposed presented a good fit, i. e., good agreement between the experimental values and the curve simulated by the model for all treatments, as indicated by the high values of the coefficient of determination (R^2) (above 0.99). The evaluation of the pH value during fermentation proved being a quick and easy-to-obtain response, suitable for evaluating the fermentation process, regardless of the processing conditions used (incubation temperature and percentage of substrate).

Table 3. Adjusted equations and coefficients of determination (R^2) for the different fermentation conditions tested.

Treatment	Adjusted equations	R^2
Standard	$\vartheta = 4.1336 + (6.7439 - 4.1336)e^{-0.1362t^{0.6593}}$	0.9982
T1	$\vartheta = 4.2574 + (6.5979 - 4.2574)e^{-0.0692t^{0.8962}}$	0.9978
T2	$\vartheta = 4.3036 + (6.3174 - 4.3036)e^{-0.0962t^{0.8296}}$	0.9990
T3	$\vartheta = 4.3297 + (6.6983 - 4.3297)e^{-0.0535t^{0.9428}}$	0.9990
T4	$\vartheta = 4.1383 + (6.1374 - 4.1383)e^{-0.1126t^{0.7670}}$	0.9985
T5	$\vartheta = 4.0428 + (6.8043 - 4.0428)e^{-0.1259t^{0.8321}}$	0.9994
T6	$\vartheta = 3.8895 + (6.5527 - 3.8895)e^{-0.1790t^{0.7421}}$	0.9972
T7	$\vartheta = 3.9384 + (6.8387 - 3.9384)e^{-0.1367t^{0.8049}}$	0.9988
T8	$\vartheta = 3.8845 + (6.2884 - 3.8845)e^{-0.1849t^{0.7221}}$	0.9973

Figure 1. Kinetics of pH variation for different water kefir fermentation condition



T1: 5% kefir grains, 5% brown sugar, and incubation at 25°C; T2: 10% kefir grains, 10% brown sugar, and incubation at 25°C; T3: 5% kefir grains, 10% brown sugar, and incubation at 25°C; T4: 10% kefir grains, 5% brown sugar, and incubation at 25°C; T5: 5% kefir grains, 5% brown sugar, and incubation at 30°C; T6: 10% kefir grains, 10% brown sugar, and incubation at 30°C; T7: 5% kefir grains, 10% brown sugar, and incubation at 30°C; T8: 10% kefir grains, 5% brown sugar, and incubation at 30°C.

According to Figure 1, the pH value of all evaluated conditions reduced over the 48 hours of fermentation. In general, we observed that initially, the acidification curve has a steeper slope between 5 and 15 hours of fermentation, when the pH drops more quickly. After this period, this slope becomes less pronounced, and the pH decreases with less speed until it tends to remain in a range of very close values (Garrote, 1999). T5, T6, T7, and T8 experiments that were incubated at 30 °C showed the lowest pH values after 48 hours of fermentation (all with values below 3.98) (Figure 1). Of these, the lowest pH value observed was 3.94 for the T7 test. Caro Velez and León Peláez (2015) state that higher incubation temperatures provide lower pH values, as observed in this study. In addition, the final pH of kefir fermentation is influenced by the amount of inoculum used (Montanuci, 2010). This author reports that in the proportion of 1:10 (grains:milk) pH values between 3.6 and 3.8 were found, while in the proportions of 1:30 and 1:50 (grains:milk), pH values of 4.4 to 4.6 were found, respectively. That is, the greater the proportion of inoculated grains, the lower the pH values. This result corroborates the values obtained in this study since the T4 and T8 experiments, which are the ones with the highest proportion of grains inoculated 2:1 (grains:substrate), resulted in the lowest pH values at their respective incubation temperatures (25 and 30°C). Zongo et al. (2020) evalueted beverages fermented by water kefir grains and observed a pH decreasing from 6.53 to 4.07 after two days of fermentation at room temperature (22ºC). The same authors state that the drop in the samples' pH values is expected, relating to the metabolism of microorganisms, mainly bacteria and yeasts, which, in addition to producing acids, produce ethanol, volatile compounds, and carbon dioxide.

The food pH is considered an indicator of food safety. When the pH value is lower than 4.5, the growth of the most part of microorganisms related to foodborne illness is inhibited (Franco and Landgraf, 2003; Silva et al., 2018). Considering the value of 4.50 as the optimal pH for the completion of fermentation, we notice that the evaluated experiments took different times to reach this value. At the end of the 48 hours of fermentation, which was the predefined time for this study, the experiment that presented the optimal pH value was the T3 experiment. This way, considering the pre-established criteria for choosing the best fermentation condition, the T3 experiment with 5% of grains, 10% of sugar, and an incubation temperature of 25 °C was considered the best condition to proceed with the drying tests.

7.2. Metataxonomic analysis

Nine bacteria genera were identified by metataxonomic analysis in kefir grains and fermented beverage: *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Lactobacillus*, *Liquorilactobacillus*, *Lentilactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Sporolactobacillus*, and *Zymomonas*. Within these genera, nine distinct species were identified, and approximately 94.31% of the grains and 91.68% of fermented beverage were of the *Zymomonas mobilis* species (Figure 2A). *Zymomonas mobilis* is an aerotolerant, rod-shaped Gram-negative anaerobe (Weir, 2016). These bacteria produce high levels of ethanol, competing with the yeast *S. cerevisiae* in terms of yield, and are associated with traditional fermented beverages in tropical regions of America, Africa, and Asia (MARSH et al., 2014; WEIR, 2016). Doelle et al. (1993) state that the species *Zymomonas mobilis* can also form kefiran from the hydrolysis of sucrose, which is one of the responsible agents for the chemical structure and the increase in mass of the grains.

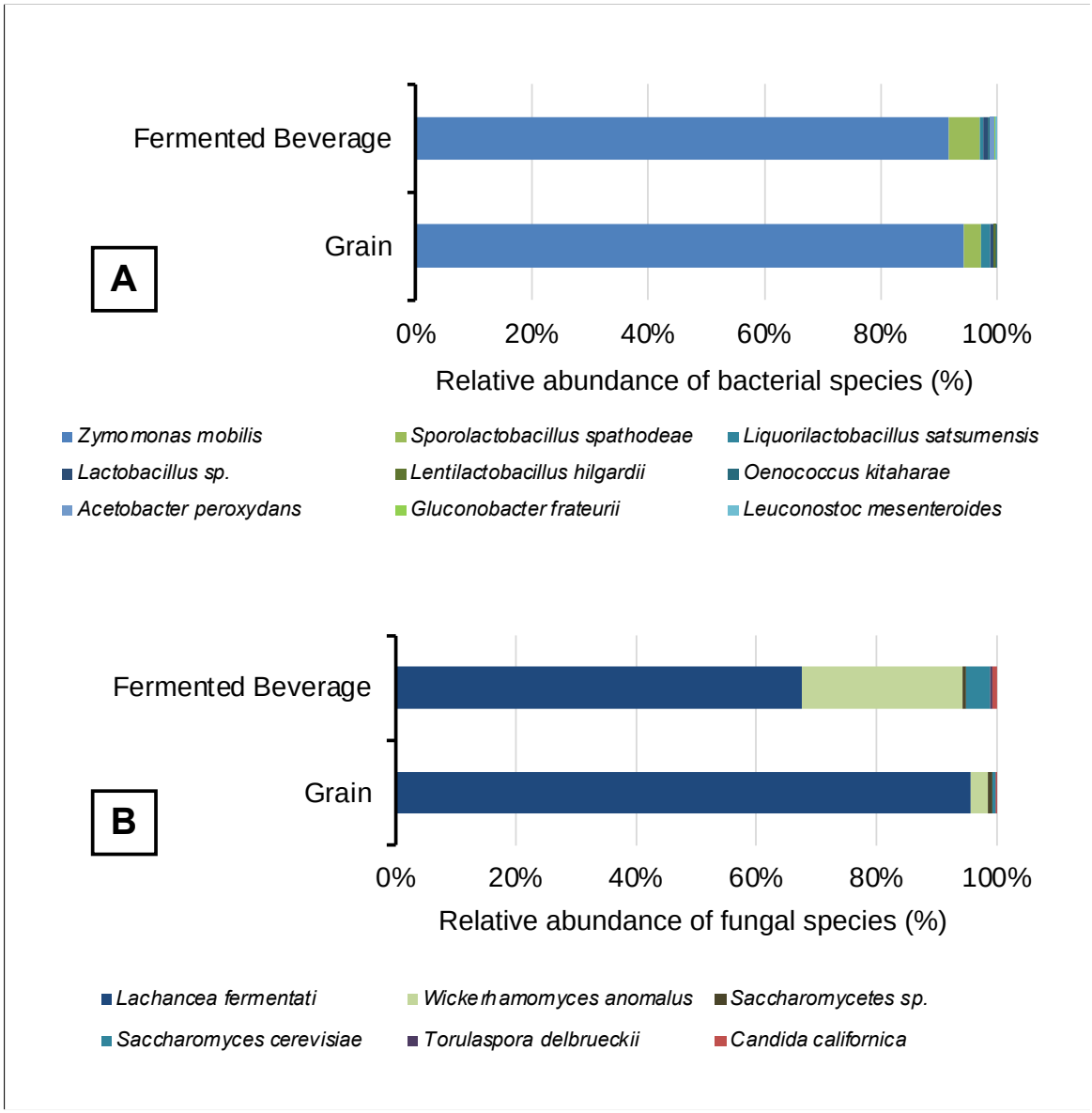
Patel et al. (2022) found similar results in the evaluation of water kefir microbiota and flavor attributes. On the other hand, Cao et al. (2019) conducted a study to evaluate the biodiversity of Chinese water kefir grains. They showed a different result from that obtained in this study because the species *Zymomonas mobilis* was responsible for only about 1% of the relative abundance. This variation may be related to the natural selection that can occur over several generations for the same type of beverage. Therefore, it is vital for product characterization to know the distinct microbiological characteristics of production in different world regions.

Another species in greater abundance consists of *Sporolactobacillus spathodeae* (3.00% in kefir grains and 5.42% in the fermented beverage). This species has yet to be described in any other kefir or fermented beverage study. It is a lactic acid, endospore-forming, Gram-positive species isolated by Thamacharoensuk et al. (2015) from tree bark in Thailand.

Liquorilactobacillus satsumensis was also identified in lower abundance (1.47% in the grains and 0.62% in the fermented beverage). This species was also identified in water kefir grains in the Brazilian states of Goiás, Bahia, and Distrito Federal, in water kefir grains obtained from different regions of Germany, and also isolated from sochu, a traditional Japanese distillate made from fermented rice, sweet potato, barley, and other starches (Miguel et al., 2011; Endo and Okada, 2005; Gulitz et al., 2013).

The other species identified represent about 1.23% of the relative abundance in kefir grains and 2.28% in the fermented beverage. Within these percentages are included in a combined way (both grains and beverage) the genus *Lactobacillus sp.* (1.35%) and the species *Acetobacter peroxydans* (0.74%), *Lentilactobacillus hilgardii* (0.46%), *Oenococcus kitaharae* (0.54%), *Gluconobacter frateurii* (0.23%), and *Leuconostoc mesenteroides* (0.19%).

Figure 2. Relative abundance (%) of bacteria (A) and fungi (B) species in water kefir grains and in the fermented beverage.



Concerning fungal diversity, all readings were assigned to the phylum *Ascomycota*. At the family level, *Saccharomycetaceae*, *Pichiacea*, and

Phaffomycetaceae were detected in the grains and fermented beverages. Five genera were identified both in the grains and in the fermented beverage, which are *Lachancea, Saccharomyces*, *Torulaspora*, *Wickerhamomyces*, and *Pichia*. The species *Lachancea fermentati* corresponded to 95.54% of the composition of the grains and 67.53% of the composition of the fermented beverage (Figure 2B). For years, this species has been associated with grape must and wine fermentation processes in several wine-producing countries (PORTER; DIVOL; SETATI, 2019). Unlike what was obtained in this study, (Gulitz et al. (2011) and Cordeiro (2018) found lower relative abundances for the genus *Lachancea fermentati*. For the first case, the percentage was 6-8% in fermented beverages based on water kefir, and for the second case, the abundance found was 2.27% in kefir grains obtained from consumers in the Brazilian state of Paraná.

The second highest relative abundance was registered for the species *Wickerhamomyces anomalus*, with 3.00% in the grain and 26.77% in the fermented beverage. *W. anomalus* – formerly known as *Hansenula anomala* – *Candida pelliculosa*, and *Pichia anomala* occur naturally in grape must and have been evaluated for enhancing the aroma of wines by producing volatile compounds (LOMBARD, 2016; YE; YUE; YUAN, 2014). Laureys et al. (2017) also identified the species *W. anomalus* while investigating the instability and low growth of water kefir grains during an industrial fermentation process. The same identification occurred in the study of isolation and molecular identification of yeasts in kefir, albeit in milk kefir grains obtained through artisanal producers in Greece (Kalamaki and Angelidis, 2017).

Fungal species with lesser representation were also identified, such as the genus *Saccharomycetes sp.* (0.66% in the grain and 0.60% in the fermented beverage) and the species *Saccharomyces cerevisiae* (0.55% in the grain and 4.03% in the fermented beverage), *Torulaspora delbrueckii* (0.14% in the grain and 0.33% in the fermented beverage), and *Candida californica* (0.11% in the grain and 0.73% in the fermented beverage).

7.3. Microbiological analysis of dehydrated water kefir

Table 4 presents the results of microbial counts demonstrating the effect of the three compositions of carrier materials and two drying methods for the powders obtained from the best fermentation condition previously evaluated for water kefir. The

lactic acid bacteria counts in the different feed solutions did not differ significantly from each other (p>0.05). When these solutions were subjected to spray drying, there was a reduction (p<0.05) in the initial count. Thermal, osmotic, oxidative, and desiccation stresses are generally considered the main mechanisms that cause bacterial inactivation during and after spray drying (SANTIVARANGKNA; KULOZIK; FOERST, 2008). Cellular damage caused by heat action includes DNA and RNA denaturation, ribosomal damage, dehydration, and plasma membrane destabilization due to water removal (Teixeira et al., 1997). Teijeiro et al. (2018) reported that after spray drying, the viability of lactic acid bacteria in kefir powder made with UHT milk was reduced by approximately 2.5 logs CFU/g.

Table 4. Microbial counts before and after spray drying and lyophilization.

Test	Lactic acid bacteria (log CFU/g)	Molds and Yeasts (log CFU/g)	Acetic acid bacteria (log CFU/g)
FST01	7.17 ± 0.43^{aA}	5.14 ± 0.15^{aA}	5.04 ± 0.22^{aA}
FST02	7.07 ± 0.25^{aA}	5.65 ± 0.42^{aA}	5.25 ± 0.65^{aA}
FST03	7.19 ± 0.55^{aA}	5.53 ± 0.40^{aA}	5.75 ± 0.37^{aA}
T01S	3.76 ± 0.20^{aB}	2.99 ± 0.21^{aB}	2.38 ± 0.58^{aB}
T02S	3.41 ± 0.48^{aB}	3.03 ± 0.29^{aB}	2.69 ± 0.53^{aB}
T03S	3.85 ± 0.36^{aB}	3.19 ± 0.43^{aB}	2.92 ± 0.67^{aB}
T01F	6.35 ± 0.18^{aA}	5.03 ± 0.08^{aA}	4.80 ± 0.02^{aA}
T02F	6.75 ± 0.15^{aA}	5.40 ± 0.01^{aA}	4.46 ± 0.30^{aA}
T03F	6.69 ± 0.83^{aA}	5.41 ± 0.03^{aA}	4.66 ± 0.26^{aA}

Results are expressed as mean ± standard deviation (n = 2). Different lowercase letters between lines show a significant difference (p<0.05) among the evaluated tests. Different capital letters between lines are significantly different (p<0.05) between the drying processes used. FS – Feed solution before the drying process; T01S – test using 100% maltodextrin as dry carrier in spray dryer; T02S – test using 50% maltodextrin and 50% inulin as dry carriers in spray dryer; T03S – test using 100% inulin as dry carrier in spray dryer; T01F – test using 100% maltodextrin as dry carrier by lyophilization; T02F – test using 50% maltodextrin and 50% inulin as dry carriers by lyophilization; T03F – test using 100% inulin as lyophilized carrier.

The mold and yeast counts ranged from 5.14 ± 0.15 to 5.65 ± 0.43 in the different feed solutions; no differences were shown (p>0.05). This result corroborates the one obtained by Rodríguez et al., (2023) who found yeast counts close to 5.30 logs CFU/g and with the study of Villanoeva et al., (2021) who reported a value of 5.89 to 6.86 log CFU/g of yeasts for water kefir. In the process of optimizing the parameters of spray drying for kefir powder, Atalar and Dervisoglu (2015) found yeast counts in the 4.54–5.89 logs CFU/mL range. In this study, spray drying promoted a logarithmic reduction (p<0.05) of 2.15, 2.62, and 2.34 for tests T01, T02, and T03, respectively. This result

demonstrates that spray drying failed to maintain the viability of molds and yeasts. In some studies, yeast counts after drying processes were impossible because they were below the detection limit (Atalar and Dervisoglu, 2015; Teijeiro et al., 2018; Tontul et al., 2021). The low thermotolerance of yeasts has been reported in some studies that show that temperatures above 50 °C markedly decrease their survival (TONTUL et al., 2021). When the feed solutions were subjected to the lyophilization process, no difference ($p>0.05$) was observed in the reduction of viability of these microorganisms. In this sense, we can state that freeze-drying emerges as the ideal drying technique for water kefir, in line with the conclusions obtained in investigations focused on drying milk kefir. This research, even though it focuses on milk kefir, provides a solid basis for establishing that freeze-drying stands out as the most effective method for preserving microbial viability (Atalar and Dervisoglu, 2015; Nale et al., 2018; Teijeiro et al., 2018; Tontul et al., 2021).

Regarding acetic bacteria, the counts obtained in the feed solutions ranged from 5.04 ± 0.22 to 5.76 ± 0.38. As similar pattern was observed for drying processes for the lactic acid bacteria group and the molds and yeasts. Thus, there was a reduction in the initial viability for tests dried in a spray dryer and maintenance of viability for tests submitted to lyophilization (Table 3). The logarithmic reduction obtained after the atomization process was 2.67, 2.57, and 2.84 for tests T01, T02, and T03. Tontul et al. (2021) obtained similar results; however, they informed that it is impossible to obtain linearity of the results since there are differences in the tolerance of microorganisms considering the manufacture of kefir, variation in equipment, and conditions of the drying processes.

Some studies evaluated the thermoprotective effect of some carriers in spray drying and lyophilization. In many of them, using carriers maintained the viability of microorganisms (COUTINHO FAVILLA et al., 2022; TEIJEIRO et al., 2018). Within the scope of this research, the evaluated wall materials (maltodextrin and inulin) showed the same performance. In this way, it becomes possible to choose any of the carriers for drying water kefir. Another point we observed is that the spray dryer parameters used in this study, according to the optimization performed by Atalar and Dervisoglu (2015) were not ideal, considering that there was viability loss of the evaluated microorganisms.

7.4. Physical-chemical analyzes of the powders

The results for physicochemical properties are presented in Table 5.

Table 5. Physicochemical characteristics of kefir powders dried by spray and freeze drying.

Analysis	Test	Spray Dryed powder	Lyophilized powder
pH	T01	5.24 ± 0.02^{bB}	5.35 ± 0.05^{bA}
	T02	5.32 ± 0.02^{aB}	5.40 ± 0.02^{bA}
	T03	5.32 ± 0.01^{aB}	5.52 ± 0.04^{aA}
Water activity	T01	0.242 ± 0.004^{bB}	0.336 ± 0.002^{bA}
	T02	0.254 ± 0.011^{bB}	0.341 ± 0.023^{bA}
	T03	0.371 ± 0.005^{aA}	0.392 ± 0.024^{aA}
Moisture (%)	T01	3.05 ± 0.03^{abB}	4.42 ± 0.01^{aA}
	T02	3.19 ± 0.12^{aB}	3.73 ± 0.06^{bA}
	T03	2.68 ± 0.27^{bB}	3.62 ± 0.05^{bA}
Hygroscopicity (%)	T01	12.89 ± 1.65^{bA}	12.28 ± 1.55^{bA}
	T02	16.04 ± 0.35^{aB}	16.91 ± 0.38^{aA}
	T03	16.41 ± 0.28^{aB}	17.44 ± 0.45^{aA}
Solubility (%)	T01	79.09 ± 1.18^{aA}	75.05 ± 1.72^{aB}
	T02	81.34 ± 1.66^{aA}	70.93 ± 3.33^{aB}
	T03	81.26 ± 1.99^{aA}	72.87 ± 1.63^{aB}
Bulk density (g/cm^3)	T01	0.326 ± 0.026^{bA}	0.382 ± 0.025^{bA}
	T02	0.374 ± 0.011^{bA}	0.346 ± 0.048^{bA}
	T03	0.565 ± 0.018^{aA}	0.557 ± 0.02^{aA}
Tapped density (g/cm^3)	T01	0.448 ± 0.006^{bA}	0.360 ± 0.021^{bB}
	T02	0.592 ± 0.007^{aA}	0.391 ± 0.066^{aB}
	T03	0.636 ± 0.010^{aA}	0.410 ± 0.011^{aB}

Results are expressed as mean ± standard deviation (n = 3). Different lowercase letters between lines show a significant difference ($p<0.05$) between the different wall materials. Values followed by different capital letters between columns are significantly different ($p<0.05$) between drying processes. T01 – test using 100% maltodextrin as carrier; T02 – test using 50% maltodextrin and 50% inulin as carrier; T03 – test using 100% inulin as carrier.

The physical characteristics of spray-dried and freeze-dried powders made with different carriers may vary depending on the methods used in production and may affect their functionality. The lowest ($p<0.05$) pH value was observed for T01 test (5.24 ± 0.02) (spray drying), while T03 lyophilized showed the highest ($p<0.05$) value (5.52 ± 0.04). When comparing the drying methods, the samples submitted to the lyophilization process showed higher pH values ($p<0.05$) compared to the tests submitted to spray drying.

Moisture results ranged from 2.68 ± 0.28 to 3.19 ± 0.12% for spray-dried samples and from 3.623 ± 0.05% to 4.42 ± 0.01% for freeze-dried samples. The results obtained in this study are lower than those found by Teijeiro et al. (2018) in the study to determine the effect of different carriers on the viability and resistance to simulated gastric conditions of kefir microorganisms after spray drying. Atalar and Dervisoglu (2015) obtained behavior similar to that found in this study, in which the moisture content of the lyophilized kefir powder was higher than the spray-dried kefir powders.

It is known in the food industry that powdered food categories that have a moisture content between 4 and 7% tend to remain more stable during storage (TEIJEIRO et al., 2018). Thus, all powders obtained meet this premise and are therefore considered stable products. In addition, moisture control is crucial as it strongly impacts microbial viability during storage, which is one of the quality parameters to be considered for powders containing viable microorganisms (SAKOUI et al., 2022).

Water activity (a_w) is related to the availability of free water in the sample and is an important parameter that determines powders' stability and shelf life during storage (Wang et al., 2020). In this study, a_w showed behavior similar to the moisture analysis results. According to Singh and Heldman (1993) water activity values between 0.20 and 0.40 guarantee the stability of the stored product against browning and hydrolytic reactions, liquid oxidation, auto-oxidation, and enzymatic activity. Therefore, all the powders obtained in the different drying methods and by different carrier agents are within the range considered optimal for the stability of powdered products.

Powdered foods with hygroscopicity of less than 10% are classified as non-hygroscopic, as reported by Costa et al. (2014). Therefore, the kefir powders in this study obtained through spray drying and lyophilization can be classified as hygroscopic with potential impairment of shelf-life, demanding storage in a controlled environment and special packaging. The powders produced only with maltodextrin (T01 test) were the powders with the lowest ($p<0.05$) hygroscopic nature for both drying processes. As the addition of inulin was performed as wall material in tests T02 and T03, an increase in hygroscopicity was observed. This behavior corroborates data available in the literature. According to authors, inulin is a hygroscopic material and can form agglomerates when dispersed into water. The addition of maltodextrin can reduce the hygroscopic nature of the material, causing the water content to be considered low (KHETO et al., 2023; SURIATI et al., 2023).

Solubility, i.e., the ability of powders to form a solution or suspension in water, is the most reliable criterion for evaluating powder behavior in an aqueous solution. This parameter shows the ability of the powder to form a solution or suspension in water (BICUDO et al., 2015). Solubility is essential for powdered products, and high solubility is desirable. Different factors such as the chemical composition of food (surface composition, hydrophobicity, and others), physical properties (particle size, porosity, shape, and others), and wall materials (if any) affect the solubility of powdered food (TONTUL & TOPUZ, 2017). In this study, the type of wall material used had no significant effect on powder solubility, while the drying method applied had a significant influence ($p<0.05$). The tests submitted to the spray drying process showed solubility from 79.09 ± 1.18 to 81.34 ± 1.66, being greater ($p<0.05$) than the solubility of the samples that were lyophilized. The higher solubility of the samples submitted to the spray drying process may be due to the smaller particle size obtained for these samples since the smaller the particle size, the greater the surface area available for hydration (Kuck and Noreña, 2016).

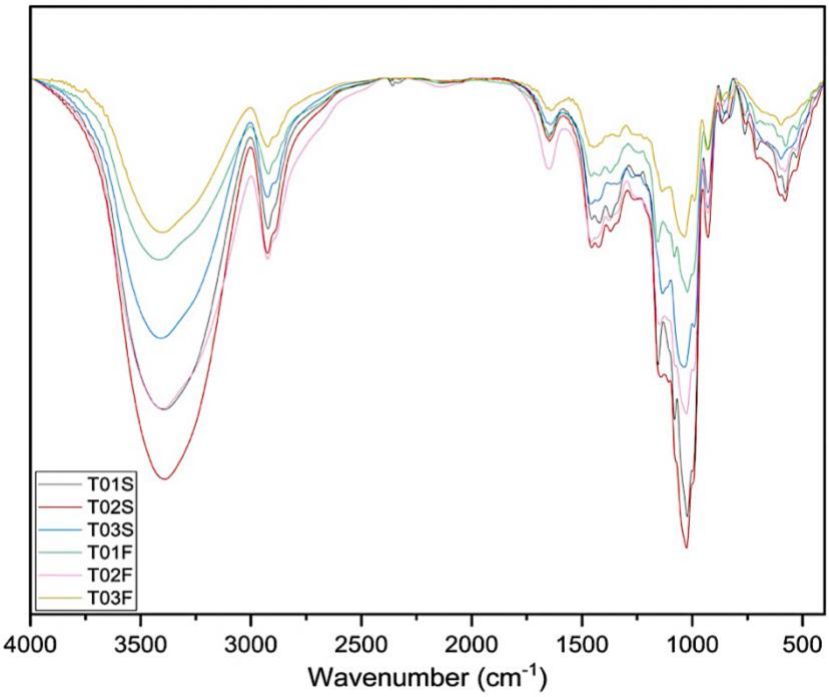
Measuring physical properties such as density is essential because they inherently affect the behavior of the powder during storage, handling, transport, processing, and packaging (TEUNOU; FITZPATRICK; SYNNOTT, 1999). Regarding this property, we observed that the carrier agents employed impacted on the values obtained for the tapped and bulk densities of the powders. For bulk density, T03 samples submitted to spray drying and lyophilization showed higher values ($p<0.05$) compared to the others. Lower bulk densities result in a larger package volume, which difficult the storage. Moreover, high bulk densities increase powder stability and improve protection against oxidation (HIMMETAGAOGLU & ERBAY, 2019).

Furthermore, we observed that the tapped density of the powders tended to increase as inulin was added to the feed solution as wall material. That way, the powders obtained in tests T02 and T03 through spray drying and lyophilization were statistically equal to each other and greater than the powders obtained in test T01 with 100% maltodextrin as a carrier agent. Regardless, when comparing the drying methods, the powders obtained by lyophilization showed lower ($p<0.05$) tapped density than spray drying. The lower tapped density of samples produced by lyophilization may be related to the more porous structure caused by the drying method, thus causing a high volume of air in the structure (PREETHI; MOSES; ANANDHARAMAKRISHNAN, 2021).

7.5. Fourier Transform Infrared (FTIR)

Figure 3 shows the FTIR spectra for spray-dried and lyophilized kefir powders.

Figure 3. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy graphs of water kefir powders dried through spray drying and lyophilization with different carrier agents.



T01S – test using 100% maltodextrin as carrier in spray dryer; T02S – test using 50% maltodextrin and 50% inulin as carriers in spray dryer; T03S – test using 100% inulin as carrier in spray dryer; T01F – test using 100% maltodextrin as carrier in lyophilization; T02F – test using 50% maltodextrin and 50% inulin as carriers in lyophilization; T03F – test using 100% inulin as carrier in lyophilization.

FTIR analysis can be applied to investigate the chemical and structural changes that occur during spray drying and lyophilization of water kefir, using different carriers, such as inulin, maltodextrin, and the mixture of the two materials. When analyzing the spectra, we notice that the most significant absorption bands, which provide a greater volume of information about samples, are in the ranges from 3409 to 2889 cm^{-1} and from 1647 to 930 cm^{-1} (fingerprint region). It is important to emphasize that these bands are present in all samples.

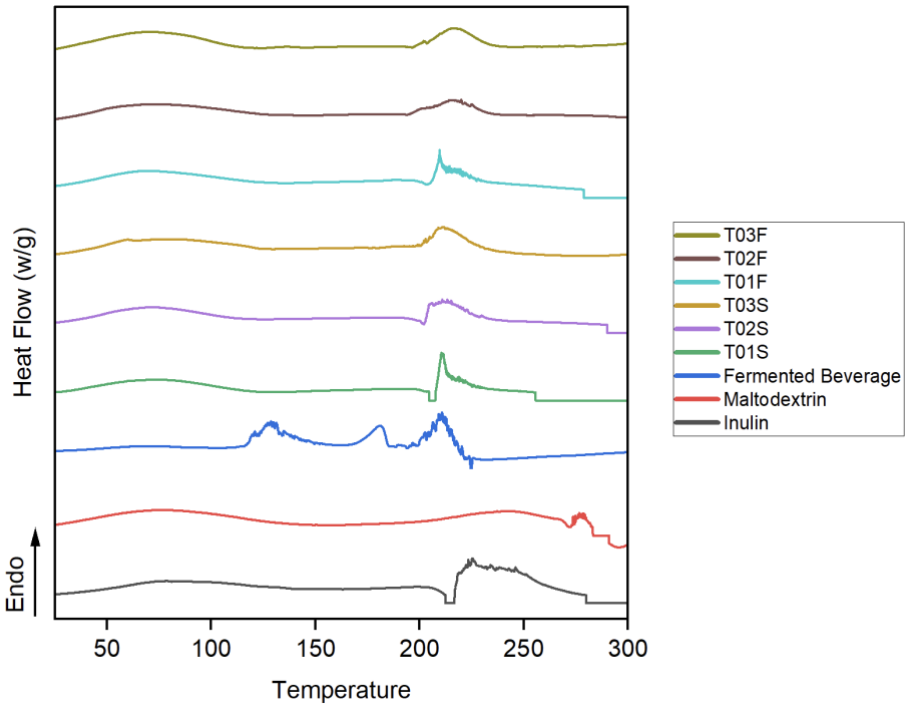
At 3409 cm^{-1}, a broad and intense band was observed, which refers to the stretching of O-H bonds present in carbohydrate molecules, such as maltodextrin and inulin (Barbosa, 2013; Paiva et al., 2013). At 2925 and 2893 cm^{-1}, two bands of medium intensity are observed, referring to asymmetric and symmetric stretching, respectively,

of C-H bonds of sp^3 carbons (Barbosa, 2013; Paiva et al., 2013). In addition to these bands, there is also a band at 1648 cm^{-1}, which is related to the stretching of the C=O bond of carboxylic acids and esters, possibly formed in fermentation processes (Paiva et al., 2013; Romano et al., 2018). Finally, at 1080, 1028, 999, and 930 cm^{-1}, intense bands are observed inherent to the stretching of ether groups present in carbohydrates and of the O-C-O glycosidic bonds of saccharides, such as maltodextrin and inulin (Barbosa, 2013; Paiva et al., 2013; Romano et al., 2018).

7.6. Differential Scanning Calorimetry (DSC)

The DSC curves of the evaluated samples are shown in Figure 4.

Figure 4. DSC thermograms of spray-dried and lyophilized water kefir powders.



T01S – test using 100% maltodextrin as carrier in spray dryer; T02S – test using 50% maltodextrin and 50% inulin as carriers in spray dryer; T03S – test using 100% inulin as carrier in spray dryer; T01F – test using 100% maltodextrin as carrier in lyophilization; T02F – test using 50% maltodextrin and 50% inulin as carriers in lyophilization; T03F – test using 100% inulin as carrier in lyophilization.

DSC analysis can be applied to investigate the thermal changes in water kefir during spray drying and lyophilization using different carriers, such as inulin, maltodextrin, and the mixture of the two materials.

The curve related to the fermented beverage showed a few distinct endothermic events between 65 and 200 °C. For this event, the temperature peak at 114.25 °C stands out, which is characteristic of the evaporation of the water present in the beverage formulation. Another observed peak occurred at a temperature of 179.75°C (ΔH = 24.0024 J/g) which may be associated with the melting and caramelization of sucrose, a constituent of brown sugar used as a substrate in the beverage's fermentation. In the literature, there are quite variable melting temperature records for sucrose with values of 165, 176, 185.9, 184.1 and 192 °C (Maia, 2019; Wang et al., 2019).

The DSC curves of the spray-dried kefir powders showed a well-defined thermal event at temperatures of 190.65, 195.15 and 198.82 °C relative to tests T01S, T02S and T03S respectively. The endothermic peaks observed in the tests are related to the loss of hydrophilic groups present in the samples characteristic of their melting point. The calculated enthalpy of fusion (ΔH) was 43.9302, 26.0924 and 1.2326 J/g relative to tests T01S, T02S and T03S respectively. For the samples obtained by the lyophilization method, the characteristic peaks of powder melting were observed at temperatures of 194.73, 176.56 and 200.46 °C (ΔH = 11.5670, 3.1191 and 1.6036 J/g) for tests T01F, T02F and T03F, respectively.

The endothermic peaks observed in the T01S and T01F tests (194.65 and 194.73 °C) that contain maltodextrin as a carrier suggest a better efficiency in the encapsulation process when compared to the other tests. This hypothesis can be inferred from the difference in values of the characteristic endothermic peaks at the melting point of the tests mentioned and of pure maltodextrin (241.05 °C; ΔH = 95.9417 J/g). According to Maia (2019) when microcapsule formation does not occur, the endo and exothermic peaks remain close to the peak values of pure substances.

It is also verified that as inulin is added as a carrier in the T02S, T03S, T02F and T03F tests, there is an increase in the endothermic temperature when compared to the T01S and T01F tests in which 100% maltodextrin was used as a carrier. This behavior suggests a lower efficiency in the encapsulation process, since the peak temperatures of the T02S, T03S, T02F and T03F tests are close to — or at least approaching — the temperature characteristic of the inulin melting process (203.48 °C; ΔH = 28.2166 J/g).

Based on these results, it can be stated that the microencapsulation process using maltodextrin presents remarkable efficiency and, therefore, a tendency towards stability of the powders obtained when compared to the tests using inulin as a carrier.

7.7. Color Properties

Table 6 presents the results of the color analysis for the powders.

Table 6. Color parameters of kefir powders obtained by different drying processes and with different carrier agents.

Test	Color Space	Spray dryed powders	Lyophilizated powders	ΔE^*
T01	L*	85.17 ± 0.01^{aB}	86.94 ± 0.49^{aA}	3.01
	a*	1.62 ± 0.01^{aA}	1.61 ± 0.07^{aA}	
	b*	10.55 ± 0.03^{aB}	12.97 ± 0.05^{aA}	
T02	L*	84.62 ± 0.08^{aB}	87.88 ± 0.12^{aA}	3.63
	a*	1.62 ± 0.09^{aA}	1.61 ± 0.05^{aA}	
	b*	10.72 ± 0.06^{aB}	12.31 ± 0.32^{aA}	
T03	L*	84.56 ± 0.08^{aB}	86.50 ± 0.40^{aA}	3.49
	a*	1.61 ± 0.04^{aA}	1.61 ± 0.03^{aA}	
	b*	10.47 ± 0.08^{aB}	13.36 ± 0.16^{aA}	

Results are expressed as mean ± standard deviation (n = 3). Different letters between lines show a significant difference ($p<0.05$) between tests of different wall materials. Values followed by different letters between columns are significantly different ($p<0.05$) between drying processes. T01 – test using 100% maltodextrin as carrier; T02 – test using 50% maltodextrin and 50% inulin as carrier; T03 – test using 100% inulin as carrier.

For the parameter L*, representing the lightness, the samples showed values from 83.62 ± 0.08 to 85.17 ± 0.01 for spray drying; for the lyophilization tests, the values found ranged from 84.88 ± 0.12 to 91.50 ± 0.40. Despite varying ($p<0.05$) between the drying methods, it is noted that all powders had high L* values, which indicates a light color with a tendency towards white.

The parameter a*, which represents a tendency towards red if positive or green if negative, did not significantly differ in the tests and conditions evaluated. These values ranged from 1.60 ± 0.03 to 1.62 ± 0.01, and, as they are positive, they indicate a predominance of reddish coloration. For the b* parameter, which measures the tendency towards yellow for positive values and blue for negative values, values between 10.46 ± 0.08 and 13.36 ± 0.16 were obtained. Positive values suggest a

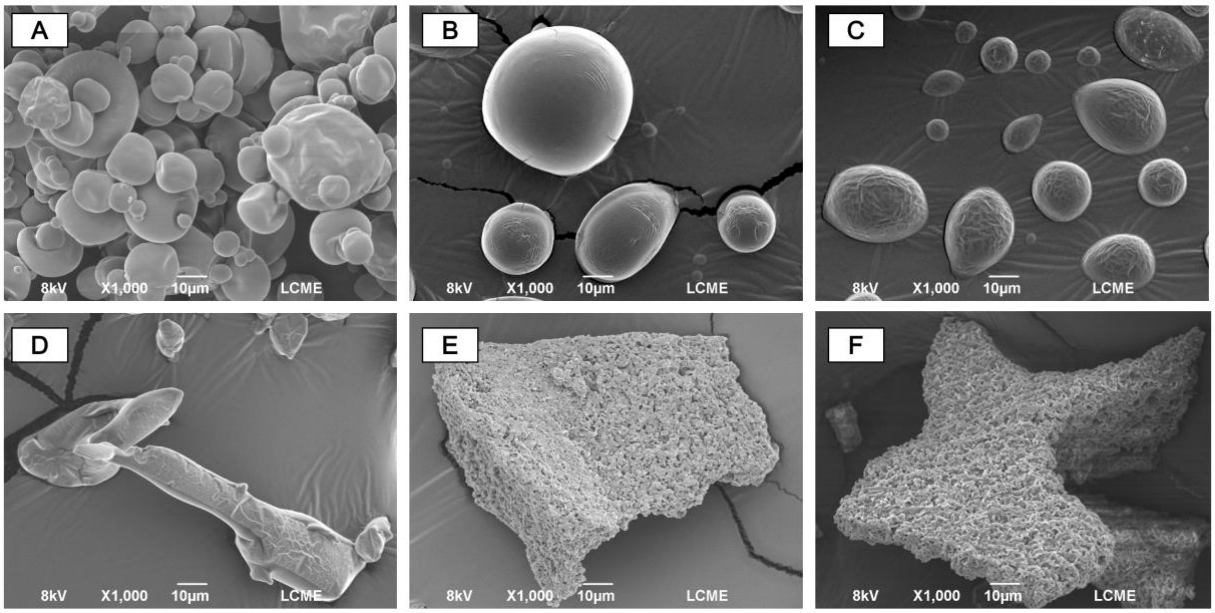
yellowish color, which can be attributed to the brown sugar present in the test formulation. No difference ($p>0.05$) was observed between the drying methods used for the parameter a*.

Martínez-Cervera et al. (2011) report that the human eye cannot visually perceive total color difference (ΔE*) values smaller than 3. Thus, it was possible to verify that all evaluated samples were affected by the drying methods, suggesting a significant change in color perception. Therefore, monitoring ΔE* is crucial to assess product quality and acceptability, ensuring that color variations do not compromise the sensory experience or consumer acceptance.

7.8. Particle morphology

Figure 5 shows the micrographs obtained by scanning electron microscope of the kefir powder particles produced using different carrier agents and two different drying methods.

Figure 5. Microscopic images achieved by scanning electron microscopy (SEM) of kefir powders obtained with different encapsulating agents and dried by different drying methods.



A, B, and C: spray-dried kefir particles using 100% maltodextrin, 50% maltodextrin and 50% inulin; and 100% inulin, respectively; D, E, and F: lyophilized kefir particles using 100% maltodextrin, 50% maltodextrin, and 50% inulin; and 100% inulin, respectively.

The kefir powder particles produced by lyophilization were perceived as porous, irregularly shaped, and disordered. Ice crystals form due to the low temperatures and sublimate under reduced pressure, forming dry and porous products (DOLLY et al., 2011). Cavalcante (2016) observed similar morphology in soursop pulp particles obtained through lyophilization. Caparino et al. (2012) also observed porous surfaces when analyzing microscopic images of powdered mango pulp obtained through lyophilization. On the other hand, the spray-dried kefir microparticles showed different morphologies compared to the lyophilized samples, as well as differences concerning the carrier agents used.

For the sample produced using maltodextrin as wall material (Fig. 3A), the microcapsules were characterized as spherical, with smooth surfaces, without cracks or pores. As inulin was incorporated into the tests as a wall material, the microcapsules showed ovoid morphology and apparent roughness (Fig. 3B and 3C). Another point observed is that with the inclusion of inulin in the samples, the particles increased in size, as shown in the images (Fig. 3B and 3C). This increase corroborates the previously mentioned density values. As the inclusion of inulin as a carrier agent was made, the values of tapped and bulk densities also increased. Silva (2021) found similar behavior when maltodextrin, inulin, and the combination of both were evaluated as carrier agents in the drying process of sapota-do-solimoes extract (*Matisia cordata*). The samples in which inulin was used as a carrier also had a larger particle size.

8. CONCLUSION

The physical and physicochemical properties evaluated revealed that water kefir dehydration is a feasible alternative to implement in the beverage industry. Considering the potentiality of offering a source of probiotic and viable microorganisms, the drying of kefir by lyophilization was an alternative method for the production of a stable food with preserved viability. The values and results obtained support spray drying as a potential method. However, it is necessary to investigate different drying parameters to obtain the highest survival rate of microorganisms. For future studies, we suggest evaluating the viability of microorganisms in the powders during storage and in the gastrointestinal tract to clarify the performance of the drying processes and boost the consumption of water kefir.

CRediT authorship contribution statement

Klinger Vinícius de Almeida: Formal analysis, Conceptualization, Data curation, Writing – original draft. **Vanessa Cortina Zanetti:** Formal analysis, Data curation. **Callebe Camelo Silva:** Formal analysis, Data curation. **Luan Alexandre Amaral:** Formal analysis. **Alice Cristina da Silva:** Formal analysis. **Silvani Verruck**: Conceptualization, Formal analysis, Data curation, Validation, Writing – review & editing, Funding acquisition, Project administration. **Luciano José Quintão Teixeira:** Conceptualization, Data curation, Validation, Writing – review & editing, Funding acquisition, Project administration.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

The authors would like to thank FAPES (Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo - process numbers 2023-XMT1P and 2021-5S41N), CNPq (National Council for Scientific and Technological Development – process number 306063/2022-0) and the Foundation for Research Support of Santa Catarina - FAPESC [grants number 2021TR001446 and 2022TR002005] for the financial support.

9. REFERENCES

AÇIK, M. et al. Alternative source of probiotics for lactose intolerance and vegan individuals: sugary kefir. **Food Science and Technology**, v. 40, n. 3, p. 523–531, set. 2020.

ALVES, V. et al. Development of fermented beverage with water kefir in water-soluble coconut extract (Cocos nucifera L.) with inulin addition. **LWT**, v. 145, p. 111364, jun. 2021.

ATALAR, I.; DERVISOGLU, M. Optimization of spray drying process parameters for kefir powder using response surface methodology. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, n. 2, p. 751–757, mar. 2015.

BARBOSA, L. C. A. **Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos.** 1ª Edição ed. Viçosa: Editora UFV, 2013.

BICUDO, M. O. P. et al. Microencapsulation of Juçara (Euterpe edulis M.) Pulp by Spray Drying Using Different Carriers and Drying Temperatures. **Drying Technology**, v. 33, n. 2, p. 153–161, 25 jan. 2015.

BORGUINI, R. G.; TORRES, E. A. F. DA S. Alimentos orgânicos: qualidade nutritiva e segurança do alimento. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 13, n. 2, p. 64–75, 3 fev. 2015.

BOTREL, D. A. et al. Optimization of Fish Oil Spray Drying Using a Protein:Inulin System. **Drying Technology**, v. 32, n. 3, p. 279–290, 16 jan. 2014.

BUTNARIU, M.; SARAC, I. Functional Food. **International Journal of Nutrition**, v. 3, n. 3, p. 7–16, 8 fev. 2019.

CAO, C. et al. Assessment of the microbial diversity of Chinese Tianshan tibicos by single molecule, real-time sequencing technology. **Food Science and Biotechnology**, v. 28, n. 1, p. 139–145, 3 fev. 2019.

CAPARINO, O. A. et al. Effect of drying methods on the physical properties and microstructures of mango (Philippine ‘Carabao’ var.) powder. **Journal of Food Engineering**, v. 111, n. 1, p. 135–148, jul. 2012.

CAPORASO, J. G. et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **The ISME Journal**, v. 6, n. 8, p. 1621–1624, 8 ago. 2012.

CARO VELEZ, C. A.; LEÓN PELÁEZ, Á. M. Capacidad antifúngica de sobrenadantes libres de células obtenidos de la fermentación de un sustrato de “panela” con gránulos de kefir de agua. **Revista Colombiana de Biotecnología**, v. 17, n. 2, p. 22–32, 1 nov. 2015.

CASSONI, V. **Valorização de resíduo de processamento de farinha de mandioca (Manipueira) por acetificação**. Dissertação - Mestrado em Agronomia—Botucatu: Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, 2008.

CAVALCANTE, C. E. B. **Secagem de polpa de graviola em spray-dryer e liofilizador: Avaliação das características físico-químicas, higroscópicas e morfológicas**. Tese Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos—Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2016.

CHALLENER, C. A. For Lyophilization, Excipients Really Do Matter. **BioPharm International**, v. 30, p. 32–35, jan. 2017.

CHATURVEDI, S.; KHARTAD, A.; CHAKRABORTY, S. The potential of non-dairy synbiotic instant beverage powder: Review on a new generation of healthy ready-to-reconstitute drinks. **Food Bioscience**, v. 42, p. 101195, ago. 2021.

CORDEIRO, N. A. O. **Kefir de água BIONAT-I: análise metagenômica dos grãos, obtenção e caracterização estrutural do exopolissacarídeo consorciana e seu potencial biotecnológico**. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2018.

CORONA, O. et al. Characterization of kefir-like beverages produced from vegetable juices. **LWT - Food Science and Technology**, v. 66, p. 572–581, mar. 2016.

COSTA, J. DE P. DA; ROCHA, É. M. DE F. F.; COSTA, J. M. C. DA. Study of the physicochemical characteristics of soursop powder obtained by spray-drying. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 34, n. 4, p. 663–666, dez. 2014.

CÔTÉ, G. L.; SKORY, C. D. Cloning, expression, and characterization of an insoluble glucan-producing glucansucrase from Leuconostoc mesenteroides NRRL B-1118. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 6, p. 2387–2394, 14 mar. 2012.

COUTINHO FAVILLA, A. L. et al. Microbial and physicochemical properties of spray dried kefir microcapsules during storage. **LWT**, v. 154, p. 112710, jan. 2022.

DA C. P. MIGUEL, M. G. et al. Profile of microbial communities present in tibico (sugary kefir) grains from different Brazilian States. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 8, p. 1875–1884, 9 ago. 2011.

DA SILVA FERNANDES, M. et al. Evaluation of the isoflavone and total phenolic contents of kefir-fermented soymilk storage and after the in vitro digestive system simulation. **Food Chemistry**, v. 229, p. 373–380, ago. 2017.

DESANTIS, T. Z. et al. Greengenes, a Chimera-Checked 16S rRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 7, p. 5069–5072, jul. 2006.

DIAS, C. O. et al. Development and physico-chemical characterization of microencapsulated bifidobacteria in passion fruit juice: A functional non-dairy product for probiotic delivery. **Food Bioscience**, v. 24, p. 26–36, ago. 2018.

DOELLE, H. W. et al. Zymomonas Mobilis — Science and Industrial Application. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 57–98, 27 jan. 1993.

DOLLY, P. et al. Microencapsulation of Lactobacillus plantarum (mtcc 5422) by spray-freeze-drying method and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions. **Journal of Microencapsulation**, v. 28, n. 6, p. 568–574, 10 set. 2011.

ENDO, A.; OKADA, S. Lactobacillus satsumensis sp. nov., isolated from mashes of shochu, a traditional Japanese distilled spirit made from fermented rice and other starchy materials. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 83–85, 1 jan. 2005.

FIORDA, F. A. et al. Microbiological, biochemical, and functional aspects of sugary kefir fermentation - A review. **Food Microbiology**, v. 66, p. 86–95, set. 2017.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. [s.l: s.n.].

GARROTE, G. L. **Bacterias lácticas y levaduras para la industria alimentaria: kefir**. La Plata: Universidad Nacional de la Plata, 1999.

GULITZ, A. et al. The microbial diversity of water kefir. **International Journal of Food Microbiology**, v. 151, n. 3, p. 284–288, dez. 2011.

GULITZ, A. et al. Comparative phylobiomic analysis of the bacterial community of water kefir by 16S rRNA gene amplicon sequencing and ARDRA analysis. **Journal of Applied Microbiology**, v. 114, n. 4, p. 1082–1091, abr. 2013.

GUZEL-SEYDIM, Z. B.; GÖKIRMAKLI, Ç.; GREENE, A. K. A comparison of milk kefir and water kefir: Physical, chemical, microbiological and functional properties. **Trends in Food Science & Technology**, v. 113, p. 42–53, jul. 2021.

HIMMETAGAOGLU, A. B.; ERBAY, Z. Effects of spray drying process conditions on the quality properties of microencapsulated cream powder. **International Dairy Journal**, v. 88, p. 60–70, jan. 2019.

ILIKKAN, Ö. K.; BAĞDAT, E. Ş. Comparison of bacterial and fungal biodiversity of Turkish kefir grains with high-throughput metagenomic analysis. **LWT**, v. 152, p. 112375, dez. 2021.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos**. 4ª (1ª ed. digital) ed. [s.l: s.n.].

JINAPONG, N.; SUPHANTHARIKA, M.; JAMNONG, P. Production of instant soymilk powders by ultrafiltration, spray drying and fluidized bed agglomeration. **Journal of Food Engineering**, v. 84, n. 2, p. 194–205, jan. 2008.

KALAMAKI, M. S.; ANGELIDIS, A. S. Isolation and molecular identification of yeasts in Greek kefir. **International Journal of Dairy Technology**, v. 70, n. 2, p. 261–268, maio 2017.

KANDYLIS, P. et al. Dairy and non-dairy probiotic beverages. **Current Opinion in Food Science**, v. 7, p. 58–63, fev. 2016.

KUCK, L. S.; NOREÑA, C. P. Z. Microencapsulation of grape (Vitis labrusca var. Bordo) skin phenolic extract using gum Arabic, polydextrose, and partially hydrolyzed guar gum as encapsulating agents. **Food Chemistry**, v. 194, p. 569–576, mar. 2016.

LAUREYS, D. et al. Investigation of the instability and low water kefir grain growth during an industrial water kefir fermentation process. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 7, p. 2811–2819, 9 abr. 2017.

LAUREYS, D. et al. Oxygen and diverse nutrients influence the water kefir fermentation process. **Food Microbiology**, v. 73, p. 351–361, ago. 2018.

LAUREYS, D. et al. The Buffer Capacity and Calcium Concentration of Water Influence the Microbial Species Diversity, Grain Growth, and Metabolite Production During Water Kefir Fermentation. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 13 dez. 2019.

LAUREYS, D.; DE VUYST, L. Microbial Species Diversity, Community Dynamics, and Metabolite Kinetics of Water Kefir Fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 8, p. 2564–2572, 15 abr. 2014.

LAUREYS, D.; DE VUYST, L. The water kefir grain inoculum determines the characteristics of the resulting water kefir fermentation process. **Journal of Applied Microbiology**, v. 122, n. 3, p. 719–732, mar. 2017.

LOMBARD, J. **Characterisation of Wickerhamomyces anomalus and Kazachstania aerobia: Investigating fermentation kinetics and aroma production**. Master of Science—Stellenbosch: Stellenbosch University, dez. 2016.

MAGALHÃES, K. T. et al. Microbial communities and chemical changes during fermentation of sugary Brazilian kefir. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 7, p. 1241–1250, 20 jul. 2010.

MAIA, J. L. **Microencapsulação do extrato do jambo vermelho (Syzygium malaccense L.) utilizando spray dryer e liofilizador**. Tese de Doutorado—Natal, RN: Universidade Federal do Rio Grande do Norte , 30 set. 2019.

MARSH, A. J. et al. Fermented beverages with health-promoting potential: Past and future perspectives. **Trends in Food Science & Technology**, v. 38, n. 2, p. 113–124, ago. 2014.

MARTÍNEZ-CERVERA, S. et al. Cocoa fibre and its application as a fat replacer in chocolate muffins. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 3, p. 729–736, abr. 2011.

MONTANUCI, F. D. **Bebidas de Kefir com e sem inulina em versões integral e desnatada: elaboração e caracterização química, física, microbiológica e sensorial**. Programa de Mestrado em Ciência de Alimentos—Londrina: Universidade Estadual de Londrina, 2010.

NALE, Z. et al. Microbial viability, physicochemical and sensory properties of kefir microcapsules prepared using maltodextrin/Arabic gum mixes. **International Journal of Dairy Technology**, v. 71, p. 61–72, mar. 2018.

PAIVA, D. L. et al. **Introdução à espectroscopia**. 5ª Edição ed. [s.l.] Cengage Learning, 2013.

PATEL, S. H. et al. A temporal view of the water kefir microbiota and flavour attributes. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 80, p. 103084, ago. 2022.

PORTER, T. J.; DIVOL, B.; SETATI, M. E. Lachancea yeast species: Origin, biochemical characteristics and oenological significance. **Food Research International**, v. 119, p. 378–389, maio 2019.

PRADO, F. C. et al. Trends in non-dairy probiotic beverages. **Food Research International**, v. 41, n. 2, p. 111–123, jan. 2008.

PREETHI, R.; MOSES, J. A.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Effect of conductive hydro-drying on physiochemical and functional properties of two pulse protein extracts: Green gram (Vigna radiata) and black gram (Vigna mungo). **Food Chemistry**, v. 343, p. 128551, maio 2021.

QUAST, C. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. D590–D596, 27 nov. 2012.

RANDAZZO, W. et al. Development of new non-dairy beverages from Mediterranean fruit juices fermented with water kefir microorganisms. **Food Microbiology**, v. 54, p. 40–51, abr. 2016.

RODRÍGUEZ, M. A. et al. Microbiological and chemical characterization of water kefir: An innovative source of potential probiotics for bee nutrition. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 55, n. 2, p. 176–180, abr. 2023.

ROMANO, N. et al. Physico-chemical and structural properties of crystalline inulin explain the stability of Lactobacillus plantarum during spray-drying and storage. **Food Research International**, v. 113, p. 167–174, nov. 2018.

SAKOUI, S. et al. Effect of encapsulated probiotic in Inulin-Maltodextrin-Sodium alginate matrix on the viability of Enterococcus mundtii SRBG1 and the rheological parameters of fermented milk. **Current Research in Food Science**, v. 5, p. 1713–1719, 2022.

SANTIVARANGKNA, C.; KULOZIK, U.; FOERST, P. Inactivation mechanisms of lactic acid starter cultures preserved by drying processes. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, n. 1, p. 1–13, jul. 2008.

SCHMIDT, P.-A. et al. Illumina metabarcoding of a soil fungal community. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 65, p. 128–132, out. 2013.

SILVA, C. R. P. **Secagem por atomização do extrato de sapotado-solimões (Matisia cordata)**. Dissertação - Mestrado em Ciência dos Alimentos—Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2021.

SILVA, C. F. G. DA et al. Development and characterization of a soymilk Kefir-based functional beverage. **Food Science and Technology**, v. 38, n. 3, p. 543–550, 22 mar. 2018.

SINGH, P. R.; HELDMAN, D. R. **Introduction to food engineering**. 2. ed. New York: Academic Press, 1993.

TEIJEIRO, M. et al. Suitability of kefir powder production using spray drying. **Food Research International**, v. 112, p. 169–174, out. 2018.

TEUNOU, E.; FITZPATRICK, J. J.; SYNNOTT, E. C. Characterisation of food powder flowability. **Journal of Food Engineering**, v. 39, n. 1, p. 31–37, jan. 1999.

THAMACHAROENSUK, T. et al. Sporolactobacillus shoreae sp. nov. and Sporolactobacillus spathodeae sp. nov., two spore-forming lactic acid bacteria isolated from tree barks in Thailand. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, n. Pt_4, p. 1220–1226, 1 abr. 2015.

TONTUL, I. et al. The impact of refractance window drying conditions on the physical and microbiological properties of kefir powder. **Food Bioscience**, v. 43, p. 101317, out. 2021.

TONTUL, I.; TOPUZ, A. Spray-drying of fruit and vegetable juices: Effect of drying conditions on the product yield and physical properties. **Trends in Food Science & Technology**, v. 63, p. 91–102, maio 2017.

VERRUCK, S. et al. Influence of Bifidobacterium Bb-12 on the physicochemical and rheological properties of buffalo Minas Frescal cheese during cold storage. **Journal of Food Engineering**, v. 151, p. 34–42, abr. 2015.

VERRUCK, S. et al. Thermal and water sorption properties of Bifidobacterium BB-12 microcapsules obtained from goat's milk and prebiotics. **LWT**, v. 98, p. 314–321, dez. 2018.

VILLANOEVA, C. N. B. et al. Functionally Active Microbiome and Physicochemical Properties of Milk and Sugary Water Kefir from Brazil. **Austin Food Sciences**, v. 6, n. 1, 16 mar. 2021.

WALDHERR, F. W. et al. Identification and characterization of a glucan-producing enzyme from Lactobacillus hilgardii TMW 1.828 involved in granule formation of water kefir. **Food Microbiology**, v. 27, n. 5, p. 672–678, ago. 2010.

WANG, Y. et al. Co-melting behaviour of sucrose, glucose & fructose. **Food Chemistry**, v. 275, p. 292–298, mar. 2019.

WANG, Y.; QIAN, P.-Y. Conservative Fragments in Bacterial 16S rRNA Genes and Primer Design for 16S Ribosomal DNA Amplicons in Metagenomic Studies. **PLoS ONE**, v. 4, n. 10, p. e7401, 9 out. 2009.

WEIR, P. M. The ecology of Zymomonas: a review. **Folia Microbiologica**, v. 61, n. 5, p. 385–392, 23 set. 2016.

WHITE, T. J. et al. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. Em: **PCR Protocols, a Guide to Methods and Applications**. [s.l.] Academic Press, 1990. p. 315–322.

XU, D. et al. Lifestyle of Lactobacillus hordei isolated from water kefir based on genomic, proteomic and physiological characterization. **International Journal of Food Microbiology**, v. 290, p. 141–149, fev. 2019.

YE, M.; YUE, T.; YUAN, Y. Effects of sequential mixed cultures of Wickerhamomyces anomalus and Saccharomyces cerevisiae on apple cider fermentation. **FEMS Yeast Research**, v. 14, n. 6, p. 873–882, set. 2014.

YERLIKAYA, O.; AKAN, E.; KINIK, Ö. The metagenomic composition of water kefir microbiota. **International Journal of Gastronomy and Food Science**, v. 30, p. 100621, dez. 2022.

ZONGO, O. et al. Physicochemical composition and fermentation kinetics of a novel Palm Sap-based Kefir Beverage from the fermentation of Borassus aethiopum Mart. fresh sap with kefir grains and ferments. **Scientific African**, v. 10, p. e00631, nov. 2020.