UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

RODRIGO SEBASTIÃO HENRIQUE

Uso de grãos de kefir para produção de cerveja artesanal

Lorena
2018

RODRIGO SEBASTIÃO HENRIQUE

Uso de grãos de kefir para produção de cerveja artesanal

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial na área de Microbiologia Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. João Batista de Almeida e Silva

Versão Corrigida

Lorena

2018

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Henrique, Rodrigo Sebastião

Uso de grãos de kefir para produção de cerveja artesanal / Rodrigo Sebastião Henrique; orientador João Batista de Almeida e Silva - Versão Corrigida. Lorena, 2018.
82 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2018

1. Cerveja. 2. Kefir. 3. Planejamento fatorial 2x2x3. 4. Fermentação mista. I. Título. II. Silva, João Batista de Almeida e, orient.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. João Batista de Almeida e Silva, pela orientação e confiança juntamente aos ensinamentos transmitidos durante a realização deste trabalho.

Aos professores do departamento de Biotecnologia: Graça, Rita, Ismael e Júlio Santos pessoas que me proporcionaram aprendizado nas disciplinas cursadas na pós-graduação e contribuíram muito para minha formação.

Ao técnico da planta piloto de bebidas, Waldir, pela ajuda e pela força na realização dos experimentos.

Aos amigos da microcervejaria e companheiros de pesquisa: Oreves, Yanet, Amanda, Eduardo, Guilherme e Júlio, que também estão na luta e buscando sempre o melhor de si.

Aos meus colegas de trabalho: Tarciso, Glauber, Aline e Thaianne que me incentivaram e me deram apoio para cursar o mestrado.

Aos meus amigos Carlos, Claudia Máisa, Fabiana, Guillaume Reiser, Jaíne, Marianna, Patrícia, Thiago e Thomás que sempre estiveram por perto durante essa etapa.

A todos aqueles que contribuíram de forma direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

*“When our souls are happy,
they talk about food.”*

Charles Simic

RESUMO

HENRIQUE, R. S. **Uso de grãos de kefir para produção de cerveja artesanal**. 2018. 82 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, São Paulo, 2018.

O início da produção de cerveja, entre 6000 e 8000 anos, a receita e a forma como era feita mudou com o tempo, passando por inovações conforme os avanços da ciência e tecnologia. As principais mudanças foram a dição do lúpulo na bebida e uso de cultura pura de levedura em sua fermentação. Para inovar na produção de cervejas podemos fazer uso de adjuntos não convencionais e de fermentações mistas com o uso de diferentes micro-organismos para conferir características desejadas à bebida. A fim de se obter uma cerveja única, com características diferenciadas, testamos o uso de grãos de kefir de água como inóculo na fermentação de cerveja artesanal. Foi testada a fermentação do kefir em solução de açúcar mascavo 10% (m/v) com e sem adição de lúpulo. Um planejamento fatorial 2x2x3 foi realizado na fermentação de mosto cervejeiro para avaliarmos o efeito da massa de grãos inoculada, da quantidade de lúpulo e da temperatura. Em seguida foi feita uma fermentação teste iniciando em 16 °C e terminando em 20 °C, depois foi feita uma cerveja de kefir puro malte, uma cerveja de kefir com adição de suco de maracujá e uma cerveja utilizando fermento cervejeiro. Por fim foram feitas as análises físico-químicas e análise sensorial para aceitação e intenção de compra. Observamos que o lúpulo tem efeito sobre a fermentação tradicional do kefir, impactando o crescimento e acidez. Na fermentação de mosto cervejeiro a temperatura é o parâmetro mais significativo para a produção de álcool. Produzindo as cervejas nas melhores condições identificadas, encontramos para o kefir o fator de conversão de 0,41 g/g que corresponde a aproximadamente 76% de eficiência; para o fermento cervejeiro o $Y_{p/s}$ foi de 0,45 g/g e eficiência de 84%. Na análise sensorial, as cervejas de kefir apresentaram desempenho superior a feita com fermento cervejeiro seco, mostrando diferença estatisticamente significativa na aceitação de seu aroma e sabor. Com uso do kefir de água como inóculo na fermentação é possível fazer uma boa cerveja com complexidade de aroma e sabor, de modo a contribuir para o desenvolvimento da tecnologia cervejeira e para o uso de fermentações mistas.

Palavras-chave: Cerveja. Kefir. Planejamento fatorial 2x2x3. Fermentação mista

ABSTRACT

HENRIQUE, R. S. **Use of kefir grains for craft beer production**. 2018. 82 p. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, São Paulo, 2018.

The beginning of beer production was between 6000 and 8000 years, the recipe and the beer process was made changed, through innovations as science and technology advanced. The main changes were the addition of hops in the beverage and use of pure culture of yeast in the fermentation. To innovate in the production of beers we can make use of unconventional adjuncts and mixed fermentations with the use of different microorganisms to impart desirable characteristics to the beverage. In order to obtain a unique beer with complex aroma e balanced taste, we tesetd the use of water kefir grains as inoculum in the fermentation of craft beer. The fermentation of kefir in brown sugar solution 10% (w/v) with and without presence of hops was tested. A 2x2x3 mixed factorial design was carried out in the fermentation of brewer's wort to evaluate the effect of factors inoculated grain mass, hop quantity and temperature. Them a fermentation test was made starting at t 16 °C and ending at 20 °C, for make a pure malt kefir beer, and a kefir beer with the addition of passion fruit juice and also the same recipe using a commercial brewer's yeast. After, the physical-chemical analyzes and sensorial evaluation were done for check acceptance and purchase intention. The presence of hops showed to have effect on the fermentation of kefir, impacting the growth and acidity. In fermentation of brewer's wort the factor that had the greatest impact on the alcohol content was the temperature. Producing the beers under the best conditions identified, resulting for the kefir a ethanol yeild coefficient of 0.41 g/g corresponding to approximately 76% efficiency; for the brewing yeast the $Y_{p/s}$ was 0.45 g/g and 84% efficiency. In the sensorial evaluation the kefir beer presented superior performance that obtained with the dried yeast, showing a statistically significant difference in the acceptance of aroma and taste attribute. In this way the use of water kefir as inoculum in the fermentation it's possible to make a good beer with complexity of aroma and taste, thus contributing to the development of brewing technology and the use of mixed fermentations.

Keywords: Craft beer. Kefir. 2x2x3 mixed factorial design. Mixed fermentation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática do processo cervejeiro.....	23
Figura 2 - Conversão de um dos principais α -ácidos nos seus iso- α -ácidos correspondentes durante a etapa fervura.....	24
Figura 3 - Fluxograma para o processo de produção da bebida fermentada com kefir.....	39
Figura 4 - Variação do tempo e da temperatura durante a etapa de mosturação.....	47
Figura 5 - Modelo da ficha utilizada no teste de aceitação e intenção de compra da análise sensorial.....	49
Figura 6 - Grãos de kefir após serem coados da solução de água e açúcar mascavo 5,0% (m/v).....	53
Figura 7 - Fermentação do kefir em solução de açúcar mascavo (quadrado) e com adição de lúpulo nas concentrações de 1,0 g.L ⁻¹ (círculo) e 2,0 g.L ⁻¹ (triângulo).....	54
Figura 8 - Representação do teor alcoólico médio observado como resposta para cada condição realizada no planejamento experimental 2x2x3.....	59
Figura 9 - Evolução da fermentação teste em função da temperatura da cerveja de kefir puro malte e da cerveja de kefir com suco de maracujá.....	61
Figura 10 - Evolução da densidade do meio (quadrado) e do teor alcoólico (círculo) seguindo o perfil de temperatura indicado pela linha tracejada para a fermentação da cerveja de kefir puro malte (A), cerveja de kefir com suco de maracujá (B) e cerveja feita com fermento cervejeiro comercial.....	63
Figura 11 - Concentração de células viáveis e não viáveis em suspensão durante a fermentação da cerveja de kefir (A), kefir com fruta (B) e usando fermento cervejeiro (C).....	64
Figura 12 - Distribuição dos provadores em função da idade, sendo que a idade mínima foi de 18 anos.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição físico-química para cerveja típica de baixa fermentação.....	26
Tabela 2 - Bactérias encontradas em diferentes amostras de kefir de água.....	35
Tabela 3 - Leveduras encontradas em diferentes amostras de kefir de água.....	36
Tabela 4 - Componentes responsáveis pelo aroma produzido pelo kefir na sua fermentação..	40
Tabela 5 - Características físico-químicas da água mineral utilizada.....	44
Tabela 6 - Composição básica apresentada pelo fabricante por 100 g de açúcar mascavo.....	45
Tabela 7 - Planejamento fatorial para as cervejas produzidas.....	47
Tabela 8 - Resultados encontrados para as cervejas produzidas no planejamento fatorial 2x2x3	58
Tabela 9 - Resultados encontrados para as cervejas de kefir para fermentação teste com perfil de temperatura de 16 e 20 °C.....	61
Tabela 10 - Resultados físico-químicos e parâmetros de fermentação das cervejas produzidas.	65
Tabela 11 - Notas dos atributos sensoriais e intenção de compra das cervejas artesanais produzidas.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância
ASBC	American Society of Brewing Chemists
BAL	Bactérias ácido lácticas
BJCP	Beer Judge Certification Program
DOU	Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil
EBC	European Brewery Convention
EPS	Exopolissarídeos
FAN	Free amino nitrogen
IBU	Escala internacional de amargor (International Bitterness Units scale)
NB-1	Classe de Risco 1 de Nível de Biossegurança
UFC	Unidades formadoras de colônias

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1 Cerveja.....	16
2.1.1 Histórico.....	16
2.1.2 Legislação brasileira.....	20
2.1.3 Matérias-primas.....	21
2.1.4 Processo de produção.....	23
2.1.5 Características.....	25
2.1.6 Adjuvantes convencionais e não convencionais.....	27
2.1.7 Inovações.....	30
2.2 Kefir.....	32
2.2.1 Matriz.....	33
2.2.2 Microbiota.....	34
2.2.3 Cultivo e fermentação.....	37
2.2.4 Propriedades funcionais.....	42
3 OBJETIVOS.....	44
3.1 Objetivo geral.....	44
3.2 Objetivos específicos.....	44
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	45
4.1 Matérias-primas.....	45
4.1.1 Água.....	45
4.1.2 Malte de cevada.....	45
4.1.3 Lúpulo.....	45
4.1.4 Fermento cervejeiro.....	46
4.1.5 Kefir de água.....	46
4.1.6 Açúcar mascavo e suco de maracujá.....	46
4.2 Cultivo tradicional do kefir de água.....	47
4.3 Fermentação do kefir.....	47
4.4 Planejamento fatorial 2x2x3 para elaboração da cerveja de kefir.....	47
4.5 Produção das cervejas.....	49
4.6 Análise sensorial.....	49
4.7 Métodos Analíticos.....	49
4.7.1 Medida da biomassa de grãos de kefir.....	49
4.7.2 Densidade do meio.....	50

4.7.3	Determinação do pH.....	50
4.7.4	Acidez total titulável.....	50
4.7.5	Preparo das amostras de cerveja.....	51
4.7.6	Concentração celular.....	51
4.7.7	Determinação do teor alcoólico.....	51
4.7.8	Extrato real.....	52
4.7.9	Atenuação.....	52
4.7.10	Cálculo do fator de conversão.....	52
4.7.11	Eficiência.....	53
4.8	Análise dos dados.....	53
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
5.1	Cultivo tradicional do kefir de água.....	54
5.2	Fermentação do kefir.....	54
5.3	Planejamento fatorial 2x2x3 para elaboração da cerveja de kefir.....	58
5.4	Produção das cervejas.....	61
5.5	Análise Sensorial.....	68
6	CONCLUSÕES.....	73
7	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	74
	REFERÊNCIAS.....	75

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, houve uma crescente demanda por cervejas artesanais devido o interesse do consumidor por cervejas com características distintas das encontradas comumente no mercado. Embora a cerveja já tenha mais de 6000 anos, ao longo do tempo foi passando por reformulações e sofrendo inovações, e o que era um produto artesanal passou a ser produzido de forma industrial e com alta tecnologia. O controle da fermentação tem importância fundamental na qualidade da cerveja, impactando diretamente no aroma e sabor da bebida. Com os avanços na microbiologia a cerveja foi se aprimorando, e hoje estuda-se o uso de adjuntos não convencionais e o uso de métodos de produção diferentes, incluindo mudanças na fermentação ou nos micro-organismos utilizados, no intuito de se conseguir melhores cervejas e com maior diversidade.

O kefir é uma cultura de micro-organismos envoltos por uma matriz de polissacarídeos e crescem em formato de grãos gelatinosos, sendo constituído por bactérias ácido lácticas, bactérias acéticas e leveduras. Seu cultivo é feito de forma artesanal em meio açucarado, normalmente usa-se açúcar mascavo, esse é tido como kefir de água; o outro tipo é cultivado em leite. Conforme realiza-se a fermentação, os grãos vão se multiplicando, e o costume popular é que o excesso seja doado para outra pessoa; visto que historicamente o consumo de kefir é associado a boa saúde, provavelmente pelo seu efeito probiótico.

Dentre as cervejas que não são muito comuns estão as cervejas que sofrem fermentação espontânea. Normalmente seu processo de fabricação é feito de maneira a favorecer sua fermentação por micro-organismos presentes no ambiente, sendo conhecidas como *Lambic*, com sua origem na região de Bruxelas na Bélgica. A principal característica dessas cervejas é o seu sabor e aroma levemente azedo e ácido. Atualmente, tem-se adaptado métodos de produção de cerveja para alcançar resultados semelhantes em menor tempo e de forma reprodutível. Um deles consiste em realizar uma fermentação ácida por bactérias lácticas e outra alcoólica feita por leveduras, ou ainda usar uma mistura de micro-organismos. Produzindo assim cervejas do tipo *Sour* que ainda podem sofrer adição de frutas ou outros adjuntos.

Nesse sentido, o presente trabalho buscou avaliar o uso de grãos de kefir de água como inóculo na fermentação de cerveja artesanal verificando os parâmetros físico-químicos e fermentativos e com a análise sensorial a fim de se obter uma cerveja com aroma e sabor diferenciados contribuindo assim para a tecnologia cervejeira e para uso de fermentação mista na produção de bebidas e alimentos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cerveja

2.1.1 Histórico

A produção de cerveja é uma atividade desenvolvida pelo homem desde de o período Neolítico, período qual os grupos de pessoas deixaram de ser nômades e começaram a desenvolver a agricultura e domesticação de animais; dando início assim a urbanização e civilização (MEUSSDOERFFER, 2009). A cerveja é considerada uma das bebidas mais antigas já produzida, com idade entre 6000 e 8000 anos, e até os dias atuais continua sendo desenvolvida, seja em escala artesanal ou industrial (BAMFORTH, 2005).

Uma das hipóteses, é que a cerveja tenha surgido na Mesopotâmia, devido o fato do crescimento de cereais selvagens naquela região. Também há evidências de produção de cerveja na Babilônia por volta do ano 6000 a.C. Poemas antigos (escritos por volta de 1800 a.C.) encontrados por historiadores já mencionavam a fabricação de cerveja por aqueles povos (MEUSSDOERFFER, 2009). E dados históricos relatam que no Egito antigo era utilizada em rituais religiosos (BAMFORTH, 2005).

No Egito os cereais eram macerados e deixados de molho, depois moldados em forma de bolos e assados, por fim eram transferidos para potes com água e deixados em repouso, ocorrendo assim a fermentação, dando origem a uma cerveja rudimentar denominada de *Bouza*; que normalmente era distribuída ao povo em rituais religiosos (ALMEIDA e SILVA, 2010). Essa cerveja egípcia também era chamada de *Zythos* no período Helenístico, onde os gregos sob comando de Alexandre, o Grande, conquistaram o Egito em 331 a.C. e passaram a controlar a produção de cerveja ao mesmo tempo introduziram o vinho para que se tornasse a bebida favorita dos povos que lá habitavam (MEUSSDOERFFER, 2009). Com o comércio entre os povos a cerveja se espalhou pela Europa, chegando até a Inglaterra, e se desenvolvendo mais na região Germânica.

Alguns historiadores atribuem a produção da cerveja às mulheres enquanto que os homens ficavam encarregados da lavoura, da caça e das batalhas. Na idade média os monges dos mosteiros utilizavam a cerveja como alimento e começaram a dominar sua produção. Vários mosteiros fabricavam cerveja, empregando diversas ervas para aromatizá-la como mirica (tamargueira, *Tamarix africana*), rosmarinho, louro, sálvia, gengibre e o lúpulo, introduzido no processo entre os anos 700 e 800 pelos monges do mosteiro de *St. Gallen* na

Suíça. A variação da proporção entre os ingredientes e do processo de fabricação resultavam em diferentes tipos de cerveja (ROSA; AFONSO, 2015). Com o conhecimento da escrita, os monges conseguiam fazer registros da produção e de suas receitas, permitindo que o conhecimento sobre a cerveja e sua tecnologia fossem passados a frente.

A incorporação do lúpulo na receita da cerveja pode ser considerada a primeira inovação que a bebida sofreu. Pois além de ser uma especiaria, perceberam que o lúpulo era responsável por um aroma e sabor agradável, além de melhorar a cerveja evitando que ficasse azeda, permitindo assim o seu armazenamento por um tempo maior. Na época das cruzadas para garantir que os soldados tivessem cerveja para tomar, a quantidade de lúpulo na cerveja foi aumentada para que a bebida resistisse às longas viagens, o que resultou em cervejas de maior amargor e mais aromáticas, o que pode ter originado as cervejas conhecidas hoje pelo estilo *Indian Pale Ale* (STRONG; ENGLAND, 2015; VRIESEKOOOP et al., 2012).

Embora já se tenha relatos que no código de Amu rabi haviam inscrições sobre regras para produção de cerveja, foi somente em 23 de abril de 1516 que ocorreu a regulamentação mais importante da cerveja: A Lei da Pureza (*Reinheitsgebot*, literalmente ordem de pureza); que limitava em água, malte de cevada e lúpulo os ingredientes que podiam ser utilizados para se fazer cerveja. Ao mesmo tempo definia de maneira inequívoca o termo *bier* (cerveja em Alemão) e estabelecia medidas administrativas para garantir quantidade e qualidade da cerveja, e em contrapartida havia a cobrança de impostos (MEUSSDOERFFER, 2009).

Com o descobrimento da América a cerveja também se expandiu para o novo mundo junto com os colonizadores. No Brasil (ainda colônia de Portugal), os colonos vindos da Europa foram os primeiros a fabricar cerveja, designada como cerveja de barbante ou de cordão, essa foi a denominação genérica dada a bebida devido sua fabricação rudimentar que acabavam tendo uma grande quantidade de gás carbônico, criando grande pressão nas garrafas; fazendo-se necessário que a rolha fosse amarrada com barbante (COUTINHO, 2009).

O hábito de tomar cerveja teve início com D. João VI, no começo do século XIX, durante a estadia da família real portuguesa no país. Como ainda não existiam cervejarias nacionais, a cerveja tomada tinha de ser importada de países europeus, principalmente da Inglaterra que tinha laços econômico com a cora portuguesa. Somente em 1888 foi fundada na cidade do Rio de Janeiro a “Manufatura de Cerveja Brahma Villigier e Cia.”, e posteriormente, no ano de 1891 na cidade de São Paulo, fundou-se a “Companhia Antártica Paulista”; sendo estas as primeiras cervejarias nacionais (ALMEIDA e SILVA, 2010).

O aumento do consumo de cerveja acompanhou o aumento da população global e a organização da sociedade. Com o passar do tempo ocorreu a concentração da população nas cidades grandes. Ross, Morgan e Hill (2002) consideram que houve uma dramática mudança da produção de alimentos, passando do caseiro e artesanal para larga escala, o que era necessário para atender exigências de mercados em expansão e mais distantes. Resultando no desenvolvimento de processos de fermentação em grande escala para produção comercial de alimentos fermentados e bebidas alcoólicas. Coincidindo com a revolução industrial, começam a surgir as primeiras cervejarias modernas com maior capacidade de produção e mais tecnologia envolvida, mesmo que pequenas se comparadas as atuais. Foi nesse período em que podemos considerar que a cerveja se dividiu em artesanal e industrial.

O primeiro passo na direção da fabricação de maneira industrial e embasada em conhecimentos científicos foi a adaptação de instrumentos de medição às necessidades específicas dos fabricantes de cerveja e malte, além do desenvolvimento de novos dispositivos. Como exemplo, temos o uso de densímetros por James Baverstock para medir o extrato de lúpulo no ano de 1769, e John Richardson que buscou medir com precisão a diminuição da densidade concomitante com a formação de álcool, tida como atenuação. Depois adotou-se o uso de termômetros e sacarímetros em conjunto com outros parâmetros no intuito de que teorias científicas pudessem ser conceitualizadas. Assim a ciência da cerveja começa com pequenos grupos de aprendizes ensinando os fundamentos da física e da química, e suas aplicações na fabricação de cerveja (MEUSSDOERFFER, 2009).

Com o surgimento do microscópio, o fermento que era tido como um “catalisador” para a fabricação de cerveja pode ser observado diretamente, permitindo com que Louis Pasteur, entre 1855 e 1875, realizasse seus estudos sobre os fundamentos da microbiologia e compreendesse o papel do fermento na fermentação alcoólica, tal como a natureza fisiológica da fermentação e as diferenças entre o metabolismo aeróbio e anaeróbio (MEUSSDOERFFER, 2009; ROSS; MORGAN; HILL, 2002). Em 1876, Pasteur já havia recomendado que para garantir a qualidade do produto o fermento deveria ser livre de “fermentos causadores de doenças”, purificando-o de bactérias, mas somente em 1883 que Emil Christian Hansen separou três espécies de leveduras utilizadas na cervejaria Carlsberg (MEUSSDOERFFER, 2009). O que resultou no que podemos considerar ser a segunda grande inovação na cerveja, que foi o uso da cultura pura de leveduras selecionadas para fabricação de cervejas (HAGEN-SCHOW, 1890; ANDERSON, 2012).

A produção de cerveja de forma industrial seguiu em expansão acompanhando o movimento industrial, principalmente na América. A Primeira Guerra Mundial (1914 –1918)

afetou a Europa como um todo e diminuiu drasticamente o consumo de cerveja. E no continente americano em 1917 o Canadá proibiu o consumo de álcool, postura que também foi adotada pelos Estados Unidos (EUA) em 1920 com a “lei seca” (*Volstead Act*) (MEUSSDOERFFER, 2009). A 18ª emenda da Constituição dos EUA proibia a fabricação, transporte e venda de qualquer bebida alcoólica, e ficou em vigor até 1933. A lei definiu “licor intoxicante” como qualquer bebida contendo mais de 0,5% de álcool em volume. Nesse meio tempo, também ocorreram inovações como desenvolvimento de técnicas para acelerar a fermentação e equipamentos para produção de cerveja em casa e em pequena escala. Depois desse período conturbado e da Segunda Guerra Mundial, a escola cervejeira americana se consolida com a tradição da produção artesanal trazendo para si o melhor das escolas cervejeiras inglesa, alemã e belga.

Deste modo, nos EUA, se estabelece o termo cerveja artesanal (*craft beer*) que surge da necessidade de se distinguir as cervejas feitas em casa e por pequenas cervejarias das cervejas comerciais produzidas em larga escala. A associação de cervejeiros dos EUA define a cervejaria artesanal como: pequena; independente e tradicional (Brewers Association, 2018). Logo, pode-se entender por artesanal ou especial uma cerveja produzida com ingredientes e ou processos diferenciados dos que são amplamente utilizados na indústria.

Na era moderna da cerveja surgiram alguns grupos com intuito de organizar as informações sobre o assunto e ajudar a estabelecer a cultura cerveja, dentre eles destaca-se a *American Society of Brewing Chemists* (ASBC), fundada em 1934 para melhorar e uniformizar a indústria da cerveja em nível técnico, e atualmente envolve membros individuais e corporativos em todo o mundo que representam cervejarias de todos os tamanhos, indústrias aliadas que fornecem a indústria de cerveja, pesquisadores acadêmicos, agências governamentais e organizações associadas à regulamentação da indústria de cerveja (American Society of Brewing Chemists, 2018). A *European Brewery Convention* (EBC) de 1946 também desempenhou importante papel no desenvolvimento de métodos para procedimentos modernos de controle de qualidade em laboratórios de fabricação de cerveja, malte e lúpulo em todo o mundo, com enfoque nos aspectos técnicos e científicos (European Brewery Convention, 2018). E mais recentemente, em 1985, foi formando o *Beer Judge Certification Program* (BJCP) que é uma organização visa promover a apreciação da cerveja e reconhecer habilidades na degustação e avaliação de cervejas, hoje o BJCP qualifica e certifica julgadores/juízes através de seu exame de credenciamento (Beer Judge Certification Program, 2018). E também, categoriza a cervejas em diferentes estilos com base nas suas características, essas informações são transcritas para um guia de estilos de cerveja, guia este

que foi adotado à nível internacional pelos cervejeiros e pelo mercado (STRONG; ENGLAND, 2015).

O estilo de cerveja mais produzido e consumido no Brasil, e no mundo, é do tipo *Pilsen* (*Standard American Lager*, pelo guia BJCP), que possui grande percentual de adjuntos, pouco lúpulo, de cor clara, teor de extrato médio, baixa fermentação e baixo teor alcoólico. Limitados as poucas opções de cerveja do mercado nacional, os consumidores mais exigentes eram obrigados a comprar rótulos importados ou a ter que fazer sua própria cerveja. Um fator que pode ser considerado determinante para que fosse resgatado a cultura de se fazer cerveja artesanal no Brasil foi o acesso a material técnico sobre o assunto por meio da internet.

2.1.2 Legislação brasileira

Por definição, bebida é o produto de origem vegetal industrializado, destinado à ingestão humana em estado líquido sem finalidade medicamentosa ou terapêutica. Também temos, que, aditivo é qualquer ingrediente adicionado intencionalmente à bebida, sem propósito de nutrir, com o objetivo de conservar ou modificar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais (BRASIL, 2009).

É regulamentado também que a água destinada à produção de bebidas deverá atender o Anexo XX da Portaria de Consolidação Nº 5 de 28 de setembro de 2017 publicada no Diário Oficial da União (DOU) No 190 de 3 de outubro de 2017 (antiga Portaria nº 2.914 do Ministério da saúde, de 12 de dezembro de 2011). A portaria dispõe sobre os procedimentos de controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade (BRASIL, 2017). Nos quais destaca-se a importância da água potável estar com conformidade com os padrões microbiológicos e físico-químicos estabelecidos.

Bebidas podem ser classificadas como não-alcoólica, com graduação alcoólica até 0,5% (v/v) seja ela fermentada ou não; e bebida alcoólica, com graduação alcoólica acima de 0,5% (v/v) (BRASIL, 2009). O artigo 46 da Lei nº 8.918, define que cerveja é a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto cervejeiro oriundo de malte de cevada e água potável, por ação da levedura, com adição de lúpulo. No qual, malte de cevada e lúpulo poderão ser substituídos por seus respectivos extratos. Parte do malte de cevada poderá ser substituído por adjuntos cervejeiros, cujo emprego não poderão ser superior a 45% em relação ao extrato primitivo. Os adjuntos cervejeiros podem ser a cevada e os demais cereais aptos para consumo humano, maltados ou não-maltados, bem como os amidos e açúcares de origem vegetal (BRASIL, 2009).

O Artigo 38, mostra que as cervejas podem ser classificadas quanto a concentração de extrato primitivo, quanto a cor, se é alcoólica ou não alcoólica, quanto a proporção malte e quanto a fermentação (se é de baixa ou alta fermentação). E o Artigo 39 admite que a cerveja possa ser denominada quanto a seu tipo em: *Pilsen, Export, Lager, Dortmunder, Munchen, Bock, Malzbier, Ale, Stout, Porter, Weissbier, Alt* e outras denominações internacionalmente reconhecidas que vierem a ser criadas, o que permite o uso do guia BJCP que elenca vários estilos de cervejas encontradas em diversas partes do mundo (STRONG; ENGLAND, 2015). Já a denominação chope ou chopp poderá ser utilizada para cerveja estabilizada biologicamente por processo físico apropriado que não será submetida a processo de pasteurização para o envase (BRASIL, 2009).

Algumas práticas também ficam proibidas no processo de produção de cerveja, como adicionar qualquer tipo de álcool, utilizar saponinas ou outras substâncias espumíferas, substituir o lúpulo por outros princípios amargos, utilizar aromatizantes e/ou edulcorantes artificiais, além de realizar a estabilização ou a conservação biológica por meio de processos químicos (BRASIL, 2009).

2.1.3 Matérias-primas

As principais matérias-primas para a produção de cerveja são basicamente: água, malte, lúpulo e fermento. Outros ingredientes também podem ser utilizados em sua fabricação, estes são considerados como adjuntos. Normalmente os adjuntos são utilizados para contribuir com o extrato primitivo do mostro ou para proporcionarem características sensoriais diferenciadas na bebida (VENTURINI; CEREDA, 2001).

A água é tida como o matéria-prima utilizada em maior quantidade na cerveja. Além de ser potável, a água pode ainda passar por algum tipo de tratamento ou correção de sua composição por meio da adição de sais e ajuste do pH (ALMEIDA e SILVA, 2010). Atualmente, as modernas tecnologias de tratamento de água permitem que uma cervejaria tenha água de excelente qualidade e possa se instalar em maior proximidade do mercado consumidor e/ou regiões com incentivos fiscais (OETTERER; ALCARDE, 2006).

Na água cervejeira é importante a presença sais minerais, como os íons cálcio (Ca^{2+}), cloreto (Cl^-) e sulfato (SO_4^{4-}), que podem alterar o sabor, a cor, o aroma e a aparência da cerveja. Historicamente as características dos diferentes estilos de cerveja foram influenciados pela composição da água usada na sua fabricação (KROTTENTHALER; GLAS, 2009). O cálcio é importante para se obter uma cerveja estável e de bom paladar, ele protege as

amilases de sofrer desativação térmica durante a sacarificação (hidrólise) do amido contido no malte; favorece a coagulação proteica durante a fervura do mosto; precipita o oxalato (na forma de CaC_2O_4), evitando a posterior turvação da bebida; estimula o metabolismo e também a floculação da levedura (ROSA; AFONSO, 2015).

O malte é a fonte amilácea que submetido a hidrólise enzimática fornecerá os açúcares para a fermentação. O malte é resultante da germinação controlada de qualquer cereal (cevada, arroz, milho, trigo, aveia, sorgo, etc.); sendo mais comum o malte de cevada e de trigo (ALMEIDA e SILVA, 2010).

O lúpulo são flores femininas da planta *Humulus lupulus*, de cultivo típico em regiões de clima temperado frio. Nessas flores estão os grânulos de lupulina produzida pela planta, onde estão contidas as substâncias que conferirão o amargor e aroma característico da cerveja (ALMEIDA e SILVA, 2010). A composição do lúpulo depende da variedade, safra, procedência, época de colheita, secagem e armazenamento. Sendo que os principais componentes do lúpulo são resinas de amargor, substâncias de aroma e polifenóis. Dentre as resinas temos os α -ácidos e β -ácidos, sendo que os α -ácidos e derivados tem grande potencial de amargor. As resinas favorecem a qualidade, estabilizam a espuma e aumentam o tempo de vida da bebida devido suas propriedades antibacterianas (especialmente contra bactérias Gram-negativas, mas também contra algumas bactérias Gram-positivas) (KROTTENTHALER, 2009).

As leveduras são responsáveis pela fermentação, e tem o etanol como produto majoritário de seu metabolismo, mas também produzem vários outros compostos que são determinantes para o sabor da cerveja. Fatores como a linhagem da levedura, a temperatura, pH do meio, tipo e proporção de adjunto, modelo de fermentador e a concentração do mosto afetam diretamente a produção dos compostos resultantes do metabolismo celular. As leveduras mais utilizadas são *Saccharomyces uvarum* (*carlsbergensis*) para cervejas de baixa fermentação do tipo *Lager* e a *Saccharomyces cerevisiae* para cervejas de alta fermentação do tipo *Ale*. As cervejas produzidas a partir de leveduras selvagens podem apresentar também espécies dos gêneros *Brettanomyces*, *Candida*, *Debaromyces*, *Pichia*, *Kloeckera*, *Rhodotorula*, *Torulaspora* e *Zygosaccharomyces* (ALMEIDA e SILVA, 2010).

Ingredientes adjuntos do malte são materiais formados por carboidratos não maltados com composição e propriedades que complementam de forma benéfica o malte de cevada. Os motivos de utilização dos adjuntos são: menor custo dos adjuntos comparado ao malte, aumento da capacidade da brassagem e produção de cervejas mais claras. No caso dos adjuntos amiláceos, devem inseridos na etapa enzimática de produção do mosto cervejeiros ou

passarem por pré-tratamento para serem incorporados no mostro, visto que precisam da ação de amilases para sua conversão em açúcares fermentescíveis; trigo, milho, arroz e mandioca são exemplos de tais adjuntos. Já adjuntos que possuem alta concentração de carboidratos simples (monossacarídeos ou dissacarídeos) podem ser adicionados diretamente na fervura, como por exemplo o uso de xarope de milho (*High Maltose*) (ROSA; AFONSO, 2015; D'AVILA et al., 2012).

2.1.4 Processo de produção

O processo de produção de cerveja pode sofrer variações conforme o fabricante e o tipo de cerveja, seja em escala industrial ou artesanal basicamente compreende-se das operações essenciais representadas na Figura 1.

Figura 1 - Representação esquemática do processo cervejeiro.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A moagem do malte, normalmente é feita em moinho de rolos, onde se reduz o grão e expõe seu interior para que na etapa de mosturação ou brassagem a mistura de malte moído e água seja submetida a uma rampa de aquecimento; no qual tempo e a temperatura determinará quais enzimas contidas no malte atuarão. Durante a hidrólise enzimática, ocorre a conversão do amido em açúcares fermentescíveis, e outras substâncias responsáveis pelo “corpo” da cerveja e pela consistência da espuma são extraídas para o mosto (ALMEIDA e SILVA, 2010).

Ao término da rampa de mosturação, o bagaço é separado do mosto por meio da filtração, na qual utiliza-se a própria casca do malte como camada filtrante. Em seguida, o mosto filtrado é submetido a fervura que levará a inativação das enzimas, esterilização e coagulação proteica. Durante a fervura é feita a adição do lúpulo, promovendo a solubilização de óleos essenciais responsáveis pelo aroma do lúpulo e isomerização dos α -ácidos em iso- α -ácidos. O momento da adição do lúpulo também é capaz de influenciar as características da cerveja pois interfere no tempo da reação de isomerização dos α -ácidos, como, por exemplo, na reação da humulona mostrada na Figura 2. A adição feita no início da fervura confere mais amargor/gosto e a adição feita no fim da fervura proporciona características de aroma na cerveja (KROTTENTHALER, 2009). Ao final precipitam-se as proteínas desnaturadas agregado as resinas e taninos do lúpulo, que sedimentam no fundo do tanque formando o *trub* (ALMEIDA e SILVA, 2010).

Figura 2 - Conversão de um dos principais α -ácidos nos seus iso- α -ácidos correspondentes durante a etapa fervura.

Fonte: Elaborado pelo autor.

O resfriamento do mosto normalmente é feito com ajuda de um trocador de calor de placas até atingir uma temperatura que seja possível fazer a inoculação da levedura, fornecendo a quantidade de 10^{-6} a 10^{-8} células.mL⁻¹. O mosto ainda pode ser aerado por meio de injeção de oxigênio no fermentador ou agitação mecânica. A fermentação é conduzida em

tanque fermentador com temperatura e pressão controlados até que o mosto seja atenuado e a ação das leveduras diminua. A maturação, também conhecida por fermentação secundária, normalmente é feita em temperaturas menores que a de fermentação e nesta etapa, poucas mudanças ocorrem, sendo que a principal mudança é o consumo de substâncias indesejadas que surgiram na fermentação, como por exemplo a conversão do diacetil (2,3-butanodiona) em 2,3-butanodiol (ALMEIDA e SILVA, 2010).

A clarificação torna a cerveja límpida e brilhante, podendo ser realizada por meio de sedimentação, uso de agentes clarificantes, centrifugação ou filtração. O mais comum é a filtração empregando terra de diatomácea como agente filtrante, que tem a função de remover partículas em suspensão, principalmente leveduras, e substâncias que podem conferir cor ou turbidez desagradável para a cerveja (como pectina e proteínas da resina do lúpulo). Alguns estilos de cerveja não requerem essa operação durante seu processamento pois tem como características serem turvas e opacas. Na etapa de acabamento a cerveja é carbonatada, processo que força a dissolução de gás carbônico no líquido por meio de pressão; depois pode ser pasteurizada ou não, e segue para o envase que pode ser em garrafa, lata ou barril (ALMEIDA e SILVA, 2010).

2.1.5 Características

A composição da cerveja é muito variada, inclusive dentro de um mesmo estilo. Na Tabela 1, temos os valores médios e a faixa de alguns parâmetros e componentes para uma cerveja de baixa fermentação. A composição físico-química acaba sendo mais útil para definir a identidade e qualidade do produto, pois apresentam pouca relação com as características sensoriais do produto final. Uma cerveja pode ser classificada como um determinado tipo, com base na sua análise físico-química, mas ser absolutamente intragável. Atributos como sabor, odor, corpo, entre outros; não podem ser descritos por meio de compostos químicos analisados individualmente (VENTURINI; CEREDA, 2001).

O controle de qualidade é composto por análises físico-químicas, microbiológicas e sensoriais. No caso das análises físico-químicas, o controle do teor de carboidratos ou de etanol nas diversas fases de fabricação da cerveja pode ser feita com o auxílio de densímetros calibrados. Destaca-se também o pH e a dosagem da acidez, visto que uma acidez elevada pode indicar contaminação bacteriana no mosto ou na cerveja e/ou um fraco desempenho da levedura (ROSA; AFONSO, 2015).

Tabela 1 - Composição físico-química para cerveja típica de baixa fermentação.

Componente	Valor médio	Faixa aceitável
Extrato aparente (%)	2,5	2,0–3,1
Extrato real (%)	4,1	3,7–4,8
Teor alcoólico (% v/v)	4,6	4,2–5,2
Extrato original (%)	11,4	10,7–12,1
Açúcares redutores (%)	1,1	0,8–1,5
pH	4,2	3,8–4,7
Acidez (% em ácido láctico)	0,13	0,09–0,15
Proteínas (%)	0,31	0,25–0,37
Gás carbônico (v/v)	2,6	2,4–2,8
Amargor (IBU)	16	10–23
Cor (EBC)	6	4–12
Tanino ($mg.L^{-1}$)	164	120–210
Diacetil ($mg.L^{-1}$)	0,08	—
Cálcio ($mg.L^{-1}$)	56	30–80
Magnésio ($mg.L^{-1}$)	80	60–110
Potássio ($mg.L^{-1}$)	330	200–420
Sódio ($mg.L^{-1}$)	80	30–250
Cloro ($mg.L^{-1}$)	230	100–500
Sulfato ($mg.L^{-1}$)	260	110–450
Fosfato ($mg.L^{-1}$)	380	200–450
Oxalato ($mg.L^{-1}$)	12	7–20
Ferro ($mg.L^{-1}$)	<0,10	—
Cobre ($mg.L^{-1}$)	<0,10	—

Fonte: Adaptado de Venturini e Cereda (2001).

Embora o etanol seja o produto majoritário na fermentação da cerveja, muitos ésteres são formados e mesmo em pequenas quantidades exercem grande impacto nos atributos sensoriais da cerveja, principalmente sobre o aroma e o gosto. Os ésteres são sintetizados principalmente a partir de álcoois superiores (álcoois fúsel) e no metabolismo de ácidos graxos da célula, normalmente catalisado por uma éster sintase, durante a fermentação primária (YEO; LIU, 2014).

O teor alcoólico varia conforme o tipo de cerveja, mas é comumente aceito que fique na faixa de entre 4% e 10% (v/v). A ingestão moderada de álcool é considerada até 1 dose (tipicamente uma lata de cerveja, 330 mL, contendo cerca de 4% de álcool) por dia para as mulheres e até 2 doses por dia para os homens. Sendo que uma lata de 330 mL de cerveja, em média, contém 140 kcal (GAETANO et al., 2016), mas o valor calórico pode variar muito conforme o estilo da cerveja. Por se uma das bebidas com menor quantidade de álcool acaba sendo fácil de tomar e rapidamente assimilada pelo organismo. Os sais minerais (Ca, P, K, Zn, Mg) incluídos em sua composição ficam em torno de $0,4\text{ g.L}^{-1}$, o que corresponde a aproximadamente 10% da necessidade diária de um ser humano. Além disso, a cerveja

também apresenta algumas vitaminas, dentre elas, as do complexo B (B1, B2, B5) (ROSA; AFONSO, 2015).

Segundo Gaetano et al. (2016), o consumo de cerveja, em qualquer dosagem, não é recomendado para crianças, adolescentes, gestantes, indivíduos em risco de desenvolver alcoolismo, pessoas com cardiomiopatia, arritmias cardíacas, depressão, doenças hepáticas e pancreáticas ou qualquer pessoa envolvida em ações que exijam concentração e habilidade ou coordenação. Mas para adultos saudáveis que já são consumidores regulares de cerveja de maneira leve e moderada não há motivos para desencorajar seu consumo.

2.1.6 Adjuntos convencionais e não convencionais

A principal matéria prima utilizada no preparo do mosto para fornecer o substrato para fermentação é o malte de cevada, em alguns casos o malte de trigo. Outros ingredientes também são utilizados em conjunto com o malte para fornecer os componentes ao meio, esses são denominados adjuntos.

Um dos principais motivos para o uso de adjuntos é possibilitar a redução da quantidade de malte, que depois da água, é a matéria prima utilizada em maior quantidade na produção de cerveja. Com a substituição de parte do malte por um adjunto de menor preço consequentemente o custo com as matérias primas diminuirá. Os adjuntos contribuem fornecendo açúcares e também podem conferir novas características sensoriais do produto final.

As matérias primas usadas como adjuntos do malte podem ser classificadas como matérias primas açucaradas e matérias primas amiláceas e feculentas D'Avila et al. (2012). As açucaradas contribuem para o extrato primitivo do mosto diretamente, sem nenhum pré-tratamento, pois são constituídas basicamente por açúcares fermentescíveis; normalmente são utilizadas na forma de xarope. As amiláceas não são malteadas e necessitam passar por gelatinização, solubilização e hidrólise do amido para fornecer os carboidratos para o mosto. Os adjuntos podem ser introduzidos no processo cervejeiros na forma de grãos moídos, *grits*, fécula e farinhas, ou ainda como extratos e xaropes.

Meussdoerffer e Zarnkow (2009) consideram que os principais motivos para usar alguma matéria-prima como adjunto do malte é o preço favorável, a disponibilidade para produção em regiões que não são adequadas para a produção de malte e as características especiais de coloração, aroma e sabor que podem conferir a cerveja.

ALMEIDA e SILVA (2010) descrevem que o adjunto melhora a estabilidade físico-química da cerveja, reduzindo a sua turvação; e que também é responsável por conferir à cerveja cor mais clara, corpo mais leve, sabor e aroma mais suave, uma vez que, com seu uso, ocorre redução das concentrações de extrato do malte.

Uma desvantagem do uso de adjuntos é que o adjunto, quando utilizado em excesso, pode causar alguns problemas, tais como, mosto com baixo teor de nitrogênio, prejudicando o metabolismo da levedura; elevada viscosidade, retardando a filtração; e cerveja “aguada” e com baixa qualidade de espuma (BRADEE et al., 1977).

Segundo Palmer (2006), a cevada maltada supre todos os FAN (*free amino nitrogen*) e os nutrientes que as leveduras precisam para crescer e se adaptar ao ambiente da fermentação. Entretanto, se a receita incorporar um grande número de adjuntos, o mosto pode não ter os níveis mínimos de nutrientes necessários para que as leveduras gerem células fortes. É sempre aconselhável adicionar um pouco extrato de levedura em mostos feitos exclusivamente de extratos leves porque esses mostos são tipicamente mais ralos quando usa-se xarope de milho.

Os adjuntos tido como convencionais são os mais utilizados pelas cervejarias, são eles: milho, arroz, cevada, trigo, sorgo e açúcares e xaropes. Estão presentes em grande maioria das cervejas *Lagers* produzidas de forma industrial. No Brasil e nos EUA, o milho e arroz são os principais adjuntos das cervejas que tem como característica ser leves (D’AVILA et al., 2012).

Castro (2014) estudou a produção de cervejas utilizando mostro superconcentrado com xarope de milho como adjunto nas proporções 70/30 e 55/45 de malte/adjunto. O autor verificou a necessidade do uso de papaína na mosturação para conferir maior quantidade de FAN no mosto, o que é essencial para melhorar a nutrição da levedura no processo fermentativo. Como foi notado ao se testar a proporção 20/80, na qual a eficiência e atenuação do extrato foi insuficiente devido ao estresse que foi submetido a levedura, como baixo níveis de nutrientes e altas concentrações de açúcares e de álcool.

Aizemberg (2015) empregou caldo de cana (*Saccharum* sp) e melado como adjuntos, constatou que a cerveja elaborada com 25% de melado foi a mais aceita para ser produzida em escala piloto, e se manteve preferida quando comparada a duas cervejas de mercado. Demonstrando que é viável o uso de melado como adjunto para cervejas *Lager* e *Ale*.

Santos (2011) utilizou quirera de arroz preto (*Oryza sativa* L.), que é um subproduto do beneficiamento do arroz e não apresenta valor comercial, como adjunto na produção de cerveja. A cerveja apresentou cor acastanhado e uma espuma bastante consistente, o autor considera que são as principais características da cerveja feira com o adjunto. No trabalho a mosturação com arroz preto previamente hidrolisado apresentou bom rendimento quando

comparado a uma mosturação feita apenas com malte, e também que não houve sinais de que os compostos fenólicos do arroz preto podem ter inibido a fermentação. Do ponto de vista sensorial a cerveja apresentou sabor agradável e intenso.

Duarte (2015) empregou o café (*Coffea arabica*) como aromatizante na produção de cerveja, na pesquisa foram testadas diferentes quantidade de café e concluíram que a bebida usando 45% de café foi considerada pela maioria dos provadores como uma bebida com sabor de café muito mais intenso que o ideal, ao mesmo tempo que o ajunto conferiu cor ao produtor final.

Batista (2014) utilizou diferentes proporções de malte de cevada e pinhão (*Araucaria angustifolia*) para produzir uma cerveja diferenciada. Constatou-se que a presença da casca do pinhão impacta de maneira negativa no teor alcoólico da bebida, e analisando duas cervejas com 10% de pinhão com casca e 45% de pinhão sem casca, as formulações proporcionaram bons resultados nos parâmetros físico-químicos e sensoriais avaliados.

Nunes et al. (2017) avaliaram o efeito do uso de polpa de cacau (*Theobroma cacao* L.) como adjunto do malte em mostro de 12 °P para produção de cerveja em escala piloto. A quantidade de adjunto foi de 30% para aumentar a concentração de açúcares fermentescíveis no mosto e após as fermentações o teor alcoólico das cervejas ficaram em torno de 6,0%, resultando em boa aceitação na análise sensorial.

Os trabalhos de Carvalho (2009) e Carvalho et al. (2009) mostram o uso de banana (*Musa* spp.) como adjunto na produção de cerveja. Consideraram a banana como uma boa matéria-prima para fermentação alcoólica por ser rica em carboidratos e minerais e que apresenta baixa acidez. Após a etapa de otimização e estudo cinético, a cerveja foi produzida em escala piloto de 140 L. Com a fermentação do mostro elaborado com malte de cevada e banana observaram atenuação aparente na faixa de 70–75%. Obtendo uma cerveja com teor alcoólico de 4,8% e que apresentou concentração de potássio de aproximadamente 600 mg.L⁻¹, enquanto que cervejas convencionais têm cerca de 200 mg.L⁻¹. Para o acetato de isoamila, que é o principal componente volátil responsável pelo aroma da banana, foi quantificado o valor de 1,20 mg.L⁻¹.

Através da análise sensorial com teste de preferência observaram que as cervejas de banana foram estatisticamente preferidas em relação as amostras do mercado e em teste de aceitação foram tão bem aceitas pelos provadores quanto as cervejas comerciais servidas. O estudo preliminar da viabilidade econômica mostrou-se favorável a produção do chope com adjunto de banana quando comparado a um chope puro malte produzido nas mesmas condições (CARVALHO, 2009).

Para o desenvolvimento de cervejas com adjuntos nunca utilizados para a mosturação um recurso que pode ser muito útil para melhor compreensão e posterior otimização do processo e da bebida é o uso da modelagem, como utilizado por Muller (2000) no estudo em que fizeram uso da modelagem matemática para aumentar a formação de açúcares fermentescíveis na hidrólise do amido durante a etapa de brassagem.

O estudo de adjuntos não convencionais é de grande importância para o desenvolvimento de novos produtos e para agregar valor e dar um destino mais nobre a subprodutos de outras cadeias produtivas do setor agrícola.

2.1.7 Inovações

Atualmente, a ciência e a indústria dedicam esforços em pesquisas para o desenvolvimento de novas tecnologias e inovações para a expansão da variedade de cerveja, sendo essa grande variedade é obtida a partir de mudanças na fabricação da bebida; como modificações nas etapas de mosturação (brassagem), fermentação, maturação e o uso de adjuntos não convencionais ou diferenciados como aveia, sorgo, centeio, arroz, mel, mandioca, frutas, etc.

As cervejas tidas como *Specialty beer* acabam não se enquadrando nas categorias de cervejas convencionais, e atualmente têm despertado o interesse dos consumidores, destacando-se a cerveja de baixa caloria, cerveja de baixo teor alcoólico ou sem álcool, cerveja sem glúten e cerveja funcional. Esse tipos de cervejas especiais são difíceis de se produzir quando comparadas as cervejas tradicionais pois ainda carecem de tecnologias e de informações científicas, mas oferecem um apelo especial aos consumidores na perspectiva da saúde e do sabor (YEO; LIU, 2014).

Cervejas obtidas utilizando fermentação espontânea, como as *Lambics*, ocorrem a fermentação mista composta por vários micro-organismos e várias etapas. Esse estilo de cerveja é de difícil reprodução e não é produzida de forma industrial em larga escala. As *Lambics* são cervejas produzidas na Bélgica, mais especificamente em torno de Bruxelas, sendo que as características da bebida são fortemente afetadas pelas características exclusivas da região onde são produzidas (*terroir*). No processo de produção de uma *Lambic* o mosto é preparado e deixado esfriar naturalmente em tanques abertos para que os micro-organismos presentes no ambiente tenham contato com o mosto e comecem a fermentação. Depois são transferidas para barris de madeira onde continuam sua fermentação e envelhecimento. O acabamento é feito misturando diferentes *Lambics* já envelhecidas, etapa essa conhecida por

blend. Processo que ao todo pode levar 3 anos para se obter o produto final (BURBERG; ZARNKOW, 2009).

Como a acidez é uma das principais características da cerveja Lambic, métodos modernos foram criados para se produzir cervejas ácidas em tempo hábil. Esses métodos são utilizados para produzir cervejas estilo *Sour* e *Berliner Weisse*, e podem ser simplificados em três tipos: acidificação, *sour mash/kettle souring*, e fermentação mista. A acidificação consiste apenas de usar ácido láctico ou cítrico como aditivo na cerveja para diminuir o pH da cerveja, normalmente entre 3,0 e 4,0. No método *sour mash* a produção de ácido ocorre por adição de bactérias ácido-láticas após terminar a hidrólise dos açúcares na mosturação, já o *kettle souring* a fermentação láctica ocorre na tina de fervura antes da fervura e lupulagem; em ambas as técnicas a busca-se a temperatura ótima para a fermentação láctica que pode levar de 12 horas a 4 dias. A fermentação mista é feita inoculando vários micro-organismos que atuarão em conjunto na conversão dos açúcares do mosto nos seus respectivos produtos de fermentação; esse método se destaca por conter os metabólitos secundários gerados pela gama de micro-organismos, resultando em sabor e aroma mais complexo e diferenciado (TONSMEIRE, 2014; OSBURN et al., 2018).

Recentemente, Osburn et al. (2018) propõem um novo método para produção de cervejas *Sour*, denominado de “*primary souring*”, que consiste no uso de leveduras capazes de realizar fermentação heteroláctica convertendo os açúcares em ácido láctico, etanol e CO₂. Método esse que evitaria o uso de bactérias ácido lácticas; nos estudos de bioprospecção do trabalho foram encontradas as seguintes leveduras: *Hanseniaspora vineae*, *Lachancea fermentati*, *Lachancea thermotolerans*, *Schizosaccharomyces japonicus*, e *Wickerhamomyces anomalus*.

Segundo Yeo e Liu (2014) a cerveja probiótica pode ser a grande inovação futura ao se tratar de cerveja, devido da crescente popularidade dos probióticos. Embora a cerveja já possua substâncias que impactam de maneira benéfica para saúde, incluindo minerais, vitaminas, polifenóis, fibras bem como níveis relativamente baixos de etanol; pode servir como base promissora para o desenvolvimento grande variedade de bebidas funcionais. Probióticos são micro-organismos vivos que, quando consumidos em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2006), relacionado principalmente ao aumento da imunidade e equilíbrio da microbiota intestinal. A informação sobre cerveja com propriedades probióticas ainda são escassas e a possibilidade é pouca relatada em estudos científicos, isso mostra a possibilidade do desenvolvimento de uma nova bebida alcoólica probiótica.

Dentre todos os tipos de cerveja, a cerveja não pasteurizada e não-filtrada é potencialmente um bom veículo para o fornecimento de probióticos. Yeo e Liu (2014) consideram que as cervejas pasteurizadas e filtradas não são adequadas devido à natureza dos processos envolvidos na produção, a menos que os probióticos sejam adicionados pós-pasteurização ou pós-filtração. Ao se pensar nas cervejas artesanais que não são filtradas e nem pasteurizadas podemos considerar que são as mais adequadas para tal tecnologia.

Com base nos trabalhos de Suzuki (2011) e Vriesekoop et al. (2012), Yeo e Liu (2014) sugerem que a incorporação de probióticos levaria à acidificação devido à produção de ácido láctico, que teria um efeito protetor na estabilidade microbiana da cerveja final e poderia ser feita sem a adição usual de ácidos. No entanto, níveis excessivos de ácido acético podem ser produzidos se bactérias acéticas estiverem presentes. Além disso, como a viabilidade é crucial para a eficácia dos probióticos, deve-se atentar para a sensibilidade dos probióticos aos ácidos do lúpulo, que podem inibir a sobrevivência de bactérias lácticas Gram-positivas. Os autores ainda destacam que é necessário avaliar impacto dos probióticos na cerveja e sua viabilidade.

Cervejas com novos sabores também mostram ser uma possibilidade de inovação cervejeira, as cervejas de frutas (*Fruity beers*) são a produzidas com a adição de frutas, sucos ou extratos de frutas ou até aromas. Yeo e Liu (2014) definem as cervejas de frutas (ou cerveja frutada) como cervejas produzidas pela fermentação sem aditivos, nas quais o aroma ou sabor que nos remete a característica frutada provem exclusivamente da fermentação. Huges (2009) considera que o sabor da cerveja é a percepção resultante de uma complexa interação entres os componentes voláteis e não voláteis. Além da adição de frutas, ésteres alifáticos voláteis sintetizados pela levedura também contribuem para o aroma frutado da cerveja. Segundo Verstrepen et al. (2003), os ésteres mais importantes que impactam no aroma da cerveja são: acetato de etila, acetato de isoamila, hexanoato de etila, octanoato de etila e 2-fenil-etil acetato. Dentre os ésteres, a concentração de acetato de isoamila normalmente fica acima da concentração limite, tornando-o um dos componentes principais para a característica frutada da cerveja.

2.2 Kefir

Kefir (ou quefir) é a bebida produzida de forma artesanal quando se adiciona de grãos de kefir como inóculo para fermentar a matéria-prima, que pode ser leite de cabra, leite de vaca ou solução açucarada de rapadura, açúcar mascavo ou melado (FARNWORTH, 2005). Conforme o meio em que se utiliza para a fermentação, os grãos de kefir acabam sendo

divididos em dois tipos: kefir de leite (*milk kefir grains*) e o kefir de água (*water kefir grains* ou *sugary kefir grains*).

Segundo levantamentos históricos, acredita-se que o kefir de leite surgiu na região do Cáucaso e Tibete, ambos situados na fronteira entre a Europa e a Ásia. O hábito caseiro de se fermentar leite de vaca, de búfala, ou de cabra com os grãos de kefir foi passado de geração em geração; e acabou se espalhando pelo leste europeu e posteriormente se disseminando para outras regiões (FARNWORTH, 1999).

O kefir de água também pode ser encontrado em várias partes do mundo, podendo receber diferentes nomes como “Tibico” ou “tibi” (LAUREYS; VUYST, 2014; FIORDA et al., 2017).

Sua origem específica ainda é tida como incerta, as hipóteses são que o kefir de água possa ter se originado da adaptação de uma cultura de kefir de leite ou que tenha surgido a partir da combinação de micro-organismos e grânulos de polissacarídeos originários de folhas de *Opuntia Cactus* (LAUREYS; VUYST, 2014).

Os grãos de kefir consistem em uma complexa microbiota formada por bactérias e leveduras, que se desenvolvem de maneira simbiótica envoltos por uma matriz de polissacarídeos em forma de pequenos grânulos gelatinosos. O cultivo é feito com a adição da matéria prima e dos grãos de kefir em um frasco semiaberto, que é deixado em repouso para fermentação por um período de 12 a 48 horas. Depois de decorrido esse tempo, os grãos são separados do líquido por filtração, onde o líquido é consumido na forma de uma bebida e os grãos são adicionados no frasco para uma nova fermentação. O costume popular tido como tradição é de que os grãos utilizados como inóculo sejam compartilhados por meio de doação.

2.2.1 Matriz

A matriz dos grãos de kefir é composta por polissacarídeos que são produzidos por alguns dos micro-organismos de sua microbiota. O principal exopolissacarídeo (EPS) é a dextrana, que é um homopolissacarídeo de alta massa molecular constituído por moléculas de glicose. A cadeia principal é formada por ligações glicosídicas α -1,6; e as ramificações podem ocorrer na forma de ligações do tipo α -1,3 (PIDOUX; BRILLOUET; QUEMENER, 1988). Devido a relativa estabilidade e diferentes solubilidades das moléculas, a dextrana é amplamente usada por indústrias da área médica, farmacêutica, alimentícia, têxtil e química; destacando-se as dextranas insolúveis que podem ser aplicadas à imobilização de biomoléculas ou micro-organismos (SHUKLA et al., 2011).

A temperatura ótima para a produção de dextrana por cepas de *Leuconostoc* dependendo subespécie fica na faixa de 23–30 °C. Sendo que para células de *Leuconostoc mensenteroides* isoladas de grãos de kefir de água, Davidovic et al. (2015) observaram que a maior produção foi à 23 °C, indicando potencial para ser explorado comercialmente. Os trabalhos de Pidoux, Brillouet e Quemener (1988) e Waldherr et al. (2010) mostram que o *Lactobacillus hilgardii* também é um micro-organismo importante na produção de EPS, o que se relaciona com a formação dos novos grãos de kefir de água durante sua fermentação, no entanto Laureys e Vuyst (2017) observaram em seu trabalho que apenas cepas de *Lactobacillus hilgardii* não são suficientes para promover um bom crescimento dos grãos.

2.2.2 Microbiota

A diversidade das espécies de micro-organismos presentes no kefir de água consiste numa associação estável principalmente de bactérias ácido lácticas (BAL), bactérias acéticas e leveduras; e entre as diferentes espécies há relação simbiótica estabelecida pela liberação de seus bioprodutos no meio que servem como fonte de energia ou fatores de estímulo para que outra espécie sobreviva ou se multiplique (FIORDA et al., 2017).

As BAL são bactérias Gram-positivas que usam carboidratos como fonte de energia e tem como principal produto de fermentação o ácido láctico. Normalmente crescem em condições anaeróbias ou microaerófilas e não formam esporos. Maior parte deles são mesófilos e geralmente se desenvolvem bem quando o pH do meio está na faixa de 4,0 a 4,5; entretanto algumas espécies conseguem crescer em condições mais extremas de pH e temperatura (BAMFORTH, 2005). Os gêneros mais importantes são *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus* (KLEIN et al., 1998; CARR; CHILL; MAIDA, 2002). Sendo que no kefir de água encontra-se principalmente as espécies dos gêneros *Lactobacillus* e *Leuconostoc* (GULITZ, 2013).

Os grãos de kefir apresentam em torno de 10^8 UFC.g⁻¹ de bactérias e valores entre 10^6 a 10^7 UFC.g⁻¹ de leveduras (MAGALHÃES et al., 2010; GULITZ et al., 2011; LAUREYS; VUYST, 2014). Laureys et al. (2016) relatam a presença de uma nova espécie de *Bifidobacterium* no kefir de água, e recentemente verificaram que o *Bifidobacterium aquikefiri* não exerce influência significativa no crescimento dos grãos e nem processo de fermentação (LAUREYS; VUYST, 2017). As Tabelas 2 e 3 mostram a diversidade de micro-organismos encontrados em amostras de kefir de água.

Tabela 2 - Bactérias encontradas em diferentes amostras de kefir de água.

Gêneros e espécies	Referências
<i>Acetobacter fabarum</i>	A, B
<i>Acetobacter lovaniensis</i>	B, D, F, G
<i>Acetobacter okinawensis</i>	E
<i>Acetobacter tropicalis</i>	E
<i>Acetobacter orientalis</i>	A, E
<i>Bifidobacterium aquikefiri</i>	C
<i>Bifidobacterium psychraerophilum</i>	B
<i>Lactobacillus buchneri</i>	D, F
<i>Lactobacillus brevis</i>	B
<i>Lactobacillus casei</i>	A, B, D, E, F
<i>Lactobacillus fermentum</i>	G
<i>Lactobacillus ghanensis</i>	C, E
<i>Lactobacillus harbinensis</i>	B
<i>Lactobacillus helveticus</i>	F
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	A, B, C, E
<i>Lactobacillus hordeii</i>	A, B, C
<i>Lactobacillus kefiranoferiens</i>	F, G
<i>Lactobacillus kefir</i>	F
<i>Lactobacillus kefir</i>	D, F
<i>Lactobacillus lactis</i>	D
<i>Lactobacillus nagelii</i>	A, B
<i>Lactobacillus mali</i>	B, C
<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	D
<i>Lactobacillus paracasei</i>	B, C, D, F
<i>Lactobacillus plantarum</i>	G
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	B
<i>Lactobacillus satsumensis</i>	C, F
<i>Lactobacillus sunkii</i>	F
<i>Leuconostoc citreum</i>	A, D
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	A
<i>Gluconobacter liquefaciens</i>	F
<i>Oenococcus kitaharae</i>	C
<i>Pseudarthrobacter chlorophenolicus</i>	E

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: (A) Gulitz et al. (2011), Alemanha; (B) Laureys e Vuyst (2014), Bélgica; (C) Laureys e Vuyst (2017), Bélgica e Países Baixos; (D) Magalhães et al. (2010), Brasil; (E) Martínez-Torres et al. (2017), México; (F) Miguel et al. (2011), Brasil; (G) Puerari, Magalhães e Schwan (2012), Brasil.

Segundo Laureys e Vuyst (2017) há entre 2 e 10 células de bactérias ácido lácticas para cada célula de levedura, e sempre são os micro-organismos majoritários nos grãos. As espécies presentes nos grãos e no meio líquido são similares e se mantêm estáveis em ambas as fases durante o processo de fermentação. Entretanto, a densidade de micro-organismos é maior nos grãos do que no líquido, indicando que a matriz de polissacarídeos serve como suporte para as células (LAUREYS; VUYST, 2014).

Tabela 3 - Leveduras encontradas em diferentes amostras de kefir de água.

Gêneros e espécies	Referências
<i>Candida californica</i>	E
<i>Candida valdiviana</i>	F
<i>Dekkera bruxellensis</i>	B, C
<i>Hanseniaspora valbyensis</i>	A
<i>Kazachstania aerobia</i>	D, F
<i>Kazachstania unispora</i>	G
<i>Kluyveromyces lactis</i>	D
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	G
<i>Lachancea fermentati</i>	A
<i>Lachancea meyersii</i>	D
<i>Pichia caribbica</i>	F
<i>Pichia cecembensis</i>	F
<i>Pichia fermentans</i>	F
<i>Pichia membranifaciens</i>	E, F
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	A, B, C, D, E, F, G
<i>Yarrowia lipolytica</i>	F
<i>Zygosaccharomyces fermentati</i>	F
<i>Zygorhizula florentina</i>	A, C

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: (A) Gulitz et al. (2011), Alemanha; (B) Laureys e Vuyst (2014), Bélgica; (C) Laureys e Vuyst (2017), Bélgica e Países Baixos; (D) Magalhães et al. (2010), Brasil; (E) Martínez-Torres et al. (2017), México; (F) Miguel et al. (2011), Brasil; (G) Puerari, Magalhães e Schwan (2012), Brasil.

Um estudo comparativo entre diferentes inóculos de kefir de água indica que *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus nagelii* e *Saccharomyces cerevisiae* são os micro-organismos chave dentro da ampla gama de espécies encontradas nos grãos (LAUREYS; VUYST, 2017). Em diferentes amostras de kefir, a espécie de *Lactobacillus* mais abundante pode variar conforme a amostra; já a *Saccharomyces cerevisiae* foi a espécie de levedura em maior quantidade encontrada tanto líquido fermentado quanto nos grãos. Laureys e Vuyst (2017) observaram também que quando o *Lactobacillus paracasei* era maioria, foi quando houve maior crescimento dos grãos, embora ele provavelmente não foi o responsável pelo crescimento; visto que no estudo nenhuma das cepas de *Lactobacillus paracasei* isoladas do kefir de água foi capaz de produzir EPS a partir de sucrose, o que contrasta com cepas isoladas em estudos anteriores realizados por Gulitz et al. (2011). Fato que nos remete a importância da relação simbiótica entre os micro-organismos presentes nos grãos.

A microbiota dos grãos de kefir pode apresentar variações dependendo da sua origem e do meio de cultura usado na fermentação, consequentemente o inóculo influencia a diversidade de micro-organismos e as características do processo de fermentação (DAVIDOVIC et al., 2015; LAUREYS; VUYST, 2017).

A produção de alimentos fermentados sob condições controladas é crucial para garantir sua segurança ao ser consumido. A complexa atividade microbiana das bactérias e leveduras presentes nos grãos de kefir geralmente garante que o processo de fermentação seja livre de micro-organismo patogênicos (KOUTINAS et al., 2005). A manipulação e processamento não adequados podem alterar a microbiota do kefir e a qualidade do produto final. A deterioração do fermentado ocorre quando os grãos são contaminados com coliformes, *Bacillus* spp., *Micrococcus* spp. e bolores. A fermentação de meios com concentração favorável de açúcares e/ou baixa taxa de inóculo abre a possibilidade para que micro-organismos patogênicos possam competir com a microbiota do kefir (FIORDA et al., 2017).

Ao longo dos anos em que se é relatado o consumo do kefir de água, os micro-organismos não se mostraram patogênicos e todos já descritos na literatura (vide Tabelas 2 e 3) se enquadram na Classe de Risco 1 de Nível de Biossegurança (NB), que compreende de micro-organismos que não representam riscos para o manipulador e nem para a comunidade. A classe NB-1 inclui os agentes biológicos conhecidos por não causarem doenças no homem ou nos animais adultos saudáveis, com por exemplo: *Lactobacillus* sp. e *Bacillus subtilis* (BRASIL, 2010).

Estudos realizados com a suspensão do kefir mostraram sua capacidade de suprimir o crescimento de alguns patógenos como *Salmonella* e *Shigella* (BERGMANN et al., 2010). Miguel et al. (2011) afirmam que em seu trabalho a presença de *Bacillus cereus* em amostras grãos de kefir oriundas de doadores caseiros é devida a contaminação em algum estágio da preparação ou envio dos grãos, os autores ainda ressaltam que a segurança na produção de alimentos fermentados dependem do conhecimento e controle da microbiota incluindo as condições higiênico-sanitárias.

2.2.3 Cultivo e fermentação

O preparo da bebida é feito adicionando os grãos de kefir em solução açucarada em torno de 5 a 10% (m/v) onde o principal componente é a sacarose, normalmente usa-se açúcar mascavo. Pode ser adicionado junto frutas desidratadas ou pedaços de frutas frescas, as mais comuns são figos secos, damasco, uva-passa e fatias de limão ou maçã. Essa mistura é deixada fermentar a temperatura ambiente de 1 a 3 dias, decorrido esse tempo os grãos podem ser removidos por filtração e o líquido pode ser consumido. Enquanto que os grãos são lavados com água e reutilizados para próxima fermentação (STADIE, 2013; LAUREYS; VUYST, 2014; LAUREYS; VUYST, 2017; FIORDA et al., 2017).

A bebida pode ser descrita como levemente carbonatada, com sabor refrescante e moderadamente ácida (DAVIDOVIC et al., 2015). Stadie (2013) descreve a bebida como um fermentado efervescente e turvo, carbonatado, pouco ácido, um tanto doce e ligeiramente alcoólico, dependendo de quanto tempo foi fermentado. Considerado com um sabor único e diferenciado (FARNWORTH, 2005), a sensação marcante é gosto azedo e ácido mais o aroma de fermentado, condizente com termo *sour*.

Atualmente, a bebida do kefir de água é predominantemente feita de maneira caseira, no qual os grãos são passados de pessoa a pessoa. Esta prática é possível porque a biomassa de kefir aumenta de uma fermentação para outra (LAUREYS; VUYST, 2017). Como os grãos possuem uma microbiota dinâmica e complexa, não é considerado propício para produção de um produto uniforme e estável (FARNWORTH, 2005). Do ponto de vista comercial o processo de fermentação é de difícil controle podendo formar diversos produtos finais de forma instável, sendo que não há ainda um processo industrial estabelecido. Além de que equipamentos para a produção em escala precisam ser desenvolvidos e testados. Fiorda et al. (2017) ressaltam as dificuldades relacionadas a fermentação, transporte e contaminação; mostrando a necessidade de se estabilizar o crescimento da microbiota e garantir que os mesmos grupos de micro-organismos estejam presentes nas diferentes bateladas, levando em conta uma produção por processo de fermentação descontínuo.

Para a produção de uma bebida fermentada com kefir de água, Fiorda et al. (2017) sugerem o fluxograma de processo ilustrado na Figura 3. Neste processo utiliza como matéria prima uma solução açucarada que é pasteurizada, resfriada e transferida para o fermentador onde inocula-se os grãos de kefir (10% m/v) e deixa-se fermentar por aproximadamente 24 horas à temperatura de 25 a 30 °C. Depois da fermentação os grãos são separados do líquido por filtração; os grãos podem passar por algum tratamento e ser reinseridos no fermentador, enquanto que o fermentado segue para envase e armazenamento, ambos a temperatura de 4 °C.

O baixo crescimento dos grãos do kefir de água é associado com grãos muito pequenos, apresentando aspecto areoso, de massa ou de farelo. O kefir possui certa fragilidade, pois os grãos quebram com facilidade ao serem coados e manuseados, e esse baixo crescimento pode fazer com que os grãos diminuam gradativamente. O baixo crescimento também pode ser relacionado com a fermentação rápida, pois o aumento dos grãos resulta da atividade de glucansucrases que catalisam a conversão de sacarose em EPS (MONCHOIS; WILLEMOT; MONSAN, 1999; MONSAN et al., 2001). A atividade dessas enzimas diminui conforme se abaixa o pH do meio (WALDHERR et al., 2010), e como o pH vai diminuindo ao longo da

fermentação, pode causar o baixo crescimento dos grãos. Entretanto o pH não decresce tão rápido a ponto de cessar completamente a atividade da enzima, Laureys e Vuyst (2017) sugerem que o estresse ácido pode ser o responsável pela diminuição do crescimento, fato que ainda precisa ser investigado com mais detalhes. Os autores também observaram que depois de vários reusos dos grãos de kefir como inóculo, o constante estresse ácido pode ter causado a diminuição do crescimento dos grãos; o que mostra a necessidade de se ajustar os parâmetros do processo com base nas características da fermentação para que mantenha os grãos de kefir estáveis.

Figura 3 - Fluxograma para o processo de produção da bebida fermentada com kefir.

Fonte: Adaptado de Fiorda et al. (2017).

Os principais metabólitos produzidos durante a fermentação do kefir de água são: etanol, ácido láctico, glicerol, ácido acético e manitol; os principais componentes responsáveis pelo seu aroma são o 2-metil-1-propan-1-ol (isobutanol), álcool isoamílico, acetato de etila, acetato de isoamila, hexanoato de etila e octanoato de etila (LAUREYS; VUYST, 2014). Laureys e Vuyst (2017) observaram que as concentrações de álcool isoamílico, isobutanol, hexanoato de etila, octanoato de etila e acetato de isoamila tiveram aumento durante as primeiras 48 horas da fermentação. Já as concentrações de acetato de etila e decanoato de etila

aumentaram lentamente nas primeiras 24 horas de fermentação, mas continuaram crescendo até o fim do processo.

Os ésteres produzidos durante a fermentação possuem aromas de frutas e flores, e podem exercer uma grande influência no aroma do fermentado do kefir de água, como apresentado na Tabela 4. Em concentrações muito acima dos valores limites aceitos, estes podem contribuir para um gosto áspero e aroma desagradável de solvente; em baixas concentrações podem conferir uma complexidade desejável para as bebidas fermentadas (LAUREYS; VUYST, 2017).

Tabela 4 - Componentes responsáveis pelo aroma produzido pelo kefir na sua fermentação.

Composto volátil	Limite aceito ($mg.L^{-1}$)	Descrição do aroma
Isobutanol	40	Espiritoso, alcoólico
Álcool isoamílico	30	Áspero, esmalte
Acetato de etila	7,5	Frutado
	>150	Verniz, esmalte
Acetato isoamílico	0,03	Doce, frutado, banana, pera
Hexanoato de etila	0,014	Frutado, maçã, banana, pera
Octanoato de etila	0,005	Frutado, abacaxi, pera
Decanoato de etila	0,2	Floral
Butanoato de etila	0,02	Floral, frutado
2-metilbutanoato de etila	0,001	Frutado, morango, abacaxi

Fonte: Adaptado de Laureys e Vuyst (2014).

As características da bebida podem variar de acordo com o substrato utilizado, mas de maneira geral resultaram numa boa aceitação por provadores em estudos já realizados. Ao se utilizar matérias-primas açucaradas o metabolismo das leveduras do kefir pode ser estimulado e consequentemente aumentar as concentrações de etanol, glicerol e ésteres no produto final; o que pode resultar em características interessantes como sabor refrescante e aroma frutado (FIORDA et al., 2017).

A composição química e a qualidade sensorial de diferentes bebidas não lácteas produzidas com o kefir de água tem sido estudadas. Puerari, Magalhães e Schwan (2012) utilizaram grãos de kefir para fermentar uma bebida a base de polpa de cacau (*Theobroma cacao* L.), avaliando a fermentação nas condições de temperaturas de 10 e 25 °C por 48 e 72 horas. A bebida fermentada a temperatura de 10 °C resultou numa bebida não alcoólica (0,36% v/v de etanol) e teve boa aceitação em análise sensorial para ambos os tempos de fermentação. E quando o processo foi conduzido a 25 °C mostraram que foi possível produzir

uma bebida alcoólica de kefir a base de polpa de cacau com aproximada de 3,6% v/v de etanol.

O processo de produção de uma bebida mel fermentada por kefir foi estudada por Fiorda et al. (2016), no qual observaram que não é necessário o enriquecimento do meio com uma fonte de nitrogênio para que o kefir aumente sua biomassa, e que a temperatura entre 25 a 35 °C foi o parâmetro menos significativo para o processo. Depois de 35 dias de armazenamento, a bebida manteve as características químicas e a viabilidade dos micro-organismos necessários para ser classificado como um produto probiótico. Concluindo que a produção da bebida em larga escala certamente é possível.

Frutas encontradas na região do Mediterrâneo (Sul da Itália) também já foram usadas como base para desenvolvimento de uma bebida fermentada por micro-organismos encontrados no kefir de água (RANDAZZO et al., 2016). Os resultados indicaram que bactérias ácido lácticas e leveduras são capazes de se desenvolver nos sucos testados. Quando utilizado quiuí (*Actinidia chinensis*) e romã (*Punica granatum*) as bebidas apresentaram grande atividade antioxidante. Os ésteres estavam presentes em maior quantidade depois da fermentação, principalmente na uva (*Vitis vinifera*), romã e marmelo (*Cydonia oblonga*). A avaliação com provadores mostrou que a bebida feita com maçã (*Malus domestica*) e com uva foram as mais apreciadas, sugerindo a possibilidade de se desenvolver fermentados de frutas utilizando kefir visando um produto com alto valor agregado e propriedades funcionais.

Dornelles e Rodrigues (2006) estudaram a fermentação alcoólica de caldo de cana (*Saccharum* sp) utilizando grãos de kefir de água, a fermentação foi conduzida à temperatura ambiente (em torno de 30 °C) em erlenmeyers de 250 mL protegidos com tampões de algodão por 7 dias. Observaram que o pH final obtido para as fermentações realizadas com o kefir é mais baixo que o obtido para os ensaios realizados com levedura (*Saccharomyces cerevisiae*), devido a maior produção de ácidos orgânicos pelo kefir, que também possui bactérias lácticas e acéticas além das leveduras. O vinho produzido com kefir apresentou níveis maiores de açúcar residual quando comparado com a fermentação pela levedura. Constataram também que a biomassa inicial não exerceu influência significativa no teor de etanol produzido. A fermentação feita pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, resultou em uma maior quantidade de etanol produzido, quando comparada com a fermentação utilizando kefir. Entretanto, os autores ressaltam que o produto apresentou aroma diferenciado e agradável; destacando seu potencial para aplicação na produção de álcool potável (cachaça e aguardente de cana).

2.2.4 Propriedades funcionais

O kefir é amplamente conhecido como uma excelente fonte de probióticos e por potenciais benefícios para a saúde. Maioria dos estudos publicados sobre o kefir foram realizados usando leite como matéria-prima (FIORDA et al., 2017). A bebida fermentada a base de leite é frequentemente associada à longevidade sendo popularmente considerada terapêutica (DORNELLES; RODRIGUES, 2006).

Acredita-se que um dos mecanismos pelo qual as bactérias probióticas exerçam seus benefícios aos hospedeiros, é através da estimulação do sistema autoimune; e que peptídeos formados durante a fermentação ou digestão são considerados bioativos para uma vasta gama de processos fisiológicos já estudados em modelo animal. O que também pode ocorrer devido a ação de exopolissacarídeos encontrados no kefir, como o kefiran (FARNWORTH, 2005).

O kefir e o kefirano (extrato de polissacarídeos insolúveis) foram testados por Rodrigues et al. (2005) para atividades antimicrobiana e cicatrizante frente a várias espécies de bactérias, usando modelo animal com lesões de pele induzidas. Tanto o kefir quanto o kefirano mostraram alguma atividade contra todos micro-organismos testados, sendo que a maior atividade foi contra *Streptococcus pyogenes*. Com base nos resultados os autores sugerem que os biofilmes de kefir e de polissacarídeos podem ser um bom agente antimicrobiano, anti-inflamatório, e cicatrizante para algumas infecções.

Resultados já descritos na literatura mostram que muitas bactérias do gênero *Lactobacillus* são capazes de produzir uma ampla gama de moléculas antimicrobianas, incluindo ácidos orgânicos (ácido lático e ácido acético), dióxido de carbono, peróxido de hidrogênio, etanol, diacetil e peptídeos (bacteriocinas). Substâncias que podem inibir o crescimento de patógenos e diminuir a contaminação na produção e armazenamento de produtos em estejam presentes. Também podem ajudar na prevenção de distúrbios gastrointestinais e infecções vaginais (FARNWORTH, 2005).

Rodrigues et al. (2016) realizaram ensaios de edema de pata e modelo de úlcera gástrica induzida por etanol para avaliar as atividades anti-inflamatórias e antiulcerogênicas do kefir e de uma cerveja fermentada por grãos de kefir. As cervejas foram produzidas em escala artesanal usando como inóculo kefir e *Saccharomyces cerevisiae* (grupo controle), apresentaram teor alcoólico de 4,0% (v/v) e valores de pH na faixa de 4,3–4,4. Os autores atribuem as atividades observadas ao efeito sinérgico entre o conteúdo de polifenóis oriundo dos maltes e lúpulos com as propriedades prebióticas e probióticas inerentes ao kefir, classificando a bebida como uma *Specialty Beer* com propriedades funcionais. Entretanto

informações sobre a fermentação e características sensoriais da cerveja fermentada com kefir não foram objetos de estudo do trabalho.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Utilizar grãos de kefir de água como inóculo na fermentação de cerveja artesanal.

3.2 Objetivos específicos

- Observar se o lúpulo exerce influência na fermentação do kefir;
- Verificar se os parâmetros temperatura de fermentação, quantidade de kefir inoculado e quantidade de lúpulo tem efeito na cerveja produzida;
- Testar a variação da temperatura durante a fermentação;
- Produzir uma cerveja de kefir sem adjunto e outra com adição de suco de fruta (maracujá);
- Realizar avaliação físico-química e sensorial das cervejas produzidas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Matérias-primas

4.1.1 Água

Para o processo de produção do mosto cervejeiro foi utilizada água mineral sem gás, classificada como água mineral fluoretada e com as características físico-químicas mostradas na Tabela 5.

Tabela 5 - Características físico-químicas da água mineral utilizada.

Características	Resultados
pH a 25 °C	7,14
Temperatura da água na fonte	22,3 °C
Condutividade elétrica a 25 °C	89,6 $\mu\text{S}/\text{cm}$
Bicarbonato	64,32 mg.L^{-1}
Cálcio	9,56 mg.L^{-1}
Sódio	4,28 mg.L^{-1}
Magnésio	4,18 mg.L^{-1}
Potássio	2,36 mg.L^{-1}
Sulfato	0,39 mg.L^{-1}
Nitrato	0,15 mg.L^{-1}
Fluoreto	0,11 mg.L^{-1}
Estrôncio	0,12 mg.L^{-1}
Bário	0,058 mg.L^{-1}

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.1.2 Malte de cevada

O malte de cevada utilizado foi do tipo *Pilsen*, gentilmente doado pela Malteria do Vale S/A, situada em Taubaté, SP.

4.1.3 Lúpulo

Foi utilizado lúpulo em *pellets* da variedade Zeus T90 com teor de α -ácidos de 14,0%, gentilmente doado pela Willersien Industrial e Comercial Ltda. São Paulo, SP.

4.1.4 Fermento cervejeiro

Para a produção da cerveja fermentada levedura comercial para a análise sensorial, foi utilizado o fermento Safale s-04 da Fermentis LESAFFRE, França. Composto por *Saccharomyces cerevisiae* e agente reidratante. Segundo a descrição do fabricante é uma levedura com característica de rápida fermentação e de boa sedimentação. Normalmente é recomendada para a produção de uma grande variedade de cervejas e tem capacidade de atenuação média, com temperatura ótima de fermentação entre 15 °C e 20 °C.

4.1.5 Kefir de água

Os grãos de kefir de água utilizados no trabalho são originários de acervo pessoal do autor.

4.1.6 Açúcar mascavo e suco de maracujá

O açúcar mascavo orgânico com composição apresentada na Tabela 6, e o suco de maracujá concentrado composto por 30% de polpa de maracujá (*Passiflora edulis*) e água. Ambos foram comprados em supermercados da região.

Tabela 6 - Composição básica apresentada pelo fabricante por 100 g de açúcar mascavo.

Componente	Quantidade
Água	1,34 g
Valor energético	380 kcal
Proteína	0,12 g
Gorduras totais	0 g
Carboidratos	98,09 g
Fibra alimentar	0 g
Cálcio	83 mg
Ferro	0,71 mg
Magnésio	9 mg
Fósforo	4 mg
Potássio	133 mg
Sódio	28 mg
Zinco	0,03 mg
Niacina	0,11 mg
Vitamina B6	0,041 mg
Ácido fólico, total	1 µg

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2 Cultivo tradicional do kefir de água

Os Grãos de kefir de água inicialmente foram obtidos por meio acervo pessoal e posteriormente foram cultivados seguindo o método tradicional no qual o meio de fermentação consiste de uma solução de água e açúcar mascavo de aproximadamente 5% (m/v) trocada a cada 24 horas. O frasco foi deixado fermentar sem agitação e à temperatura ambiente para que ocorresse a multiplicação dos grãos até atingir a quantidade necessária para os ensaios.

4.3 Fermentação do kefir

Foram preparados três meios de fermentação a base de açúcar mascavo 10% (m/v) para a fermentação do kefir. O primeiro foi somente a solução de açúcar mascavo, o segundo foi adicionado lúpulo na proporção de $1,0 \text{ g.L}^{-1}$, e o terceiro foi adicionado lúpulo $2,0 \text{ g.L}^{-1}$. Ambas as soluções passaram por fervura durante 60 minutos. As fermentações foram realizadas em frascos erlenmeyer de 125 mL contendo 100 mL de meio e inoculando grãos de kefir na proporção de 20 g.L^{-1} para fermentar à temperatura ambiente, similar as condições do processo artesanal. Foram monitorados a biomassa de grãos de kefir, densidade do meio, acidez e pH pelo período de 7 dias.

4.4 Planejamento fatorial 2x2x3 para elaboração da cerveja de kefir

Foi realizado um planejamento fatorial 2x2x3 com os fatores quantidade de inóculo (10 e 20 g.L^{-1}), lúpulo ($1,0$ e $2,0 \text{ g.L}^{-1}$), e temperatura de fermentação (12°C , 20°C e temperatura ambiente/sem controle); conforme mostrado na Tabela 7. Analisando como resposta o teor alcoólico, a acidez e o pH da cerveja.

A quantidade do malte foi fixada em $0,25 \text{ kg.L}^{-1}$ de malte cevada, que foi submetido a moagem de forma a expor o interior dos grãos atingindo uma granulometria de aproximadamente 0,6 mm mediante a regulagem do moinho; evitando a formação de pó e farinha durante a moagem. Na mosturação foi realizada a rampa de temperatura apresentada na Figura 4 e seguida da filtração (recirculação) utilizando a própria casca do malte como camada filtrante.

Tabela 7 - Planejamento fatorial para as cervejas produzidas.

Ensaio	Kefir (g.L ⁻¹)	Lúpulo (g.L ⁻¹)	Temperatura (°C)
1	20	1,0	12
2	40	1,0	12
3	20	2,0	12
4	40	2,0	12
5	20	1,0	20
6	40	1,0	20
7	20	2,0	20
8	40	2,0	20
9	20	1,0	Ambiente/sem controle
10	40	1,0	Ambiente/sem controle
11	20	2,0	Ambiente/sem controle
12	40	2,0	Ambiente/sem controle

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 4 - Variação do tempo e da temperatura durante a etapa de mosturação.

Fonte: Elaborado pelo autor.

No início da fervura foi feita a adição do lúpulo e mantida em ebulição por 60 minutos. Ao término do tempo, foi retirado o coagulado formado após a fervura; e o mosto, resfriado até próximo à temperatura de fermentação. Então transferidos para galões e os grãos de kefir foram adicionados para iniciar a fermentação. Após a atenuação do mosto, foi feito a transferência (trasfega) para outro galão e deixado maturar à 5 °C por 10 dias.

No envase utilizou-se garrafas de vidro de 600 mL, e foi feita a adição de açúcar (*priming*) na concentração de 7,0 g.L⁻¹ para a carbonatação da cerveja na própria garrafa. As garrafas foram fechadas com ajuda de um tampador mecânico.

4.5 Produção das cervejas

Para a produção das cervejas basicamente seguiu-se o processo de produção descrito no Item 4.4. A água utilizada sofreu adição de CaCl_2 para se atingir 100 mg.L^{-1} de Ca^{2+} . Para a produção do mosto foi utilizado malte *Pilsen* na quantidade de $0,19 \text{ kg.L}^{-1}$ e a mosturação feita apenas em 65°C por 60 min, com inativação enzimática a 78°C por 10 min. Foram usadas a temperaturas de 16°C e 20°C para a fermentação.

Primeiramente realizou-se fermentações teste iniciando-se a 16°C e posteriormente aumentando para 20°C . Foram testadas uma cerveja de kefir sem adjunto e outra utilizando suco de maracujá como adjunto na proporção de 50 mL de suco por litro de cerveja. O segundo passo foi a produção das duas cervejas de kefir em escala artesanal de 20 L e uma cerveja nas mesmas condições utilizando fermento cervejeiro como inóculo.

4.6 Análise sensorial

Para análise sensorial das cervejas produzidas foram seguidos os critérios sugeridos pelo Instituto Adolfo Lutz (ZENEBO; PASCUET; TIGLEA, 2008). O teste afetivo para a aceitação das cervejas foi realizado utilizando uma escala hedônica estruturada de nove pontos, onde 9 corresponde a “gostei extremamente” e 1 em “desgostei extremamente”, sendo que 5 equivale a “nem gostei/nem desgostei”. Para a avaliação de intenção da compra foi utilizado uma escala estruturada de cinco pontos, conforme o modelo da ficha mostrada na Figura 5. Foram selecionados provadores maiores de 18 anos e que afirmaram ter o hábito de tomar cerveja.

As amostras foram servidas em copos plásticos transparentes e descartáveis, codificados com números aleatórios de três dígitos, contendo aproximadamente 50 mL de cerveja na temperatura de consumo ($4\text{--}5^\circ\text{C}$). Cada provador recebeu três amostras juntamente com um copo de água e um biscoito sem sabor para limpar o paladar entre uma amostra e outra.

4.7 Métodos Analíticos

4.7.1 Medida da biomassa de grãos de kefir

Para a medida da biomassa, os grãos de kefir foram filtrados do meio de fermentação e sua massa foi medida utilizando uma balança analítica previamente calibrada.

Figura 5 - Modelo da ficha utilizada no teste de aceitação e intenção de compra da análise sensorial.

Nome: _____ . Idade: _____	
Quanto ao seu gosto por cerveja, você se considera:	
( ) Gostar pouco ( ) Gostar moderadamente ( ) Gostar muito	
Por favor, avalie a amostra codificada e use a escala abaixo para indicar o quanto você gostou ou desgostou da mesma.	
9 - gostei extremamente	Código da amostra: _____
8 - gostei muito	
7 - gostei moderadamente	Aparência: _____
6 - gostei ligeiramente	Cor: _____
5 - nem gostei/ nem desgostei	Aroma: _____
4 - desgostei ligeiramente	Sabor: _____
3 - desgostei moderadamente	Impressão global: _____
2 - desgostei muito	
1 - desgostei extremamente	
Assinale qual seria sua atitude quanto à compra deste produto.	
5 - eu certamente compraria	
4 - eu provavelmente compraria	
3 - eu tenho dúvidas se compraria	
2 - eu provavelmente não compraria	
1 - eu certamente não compraria	
Comentários: _____	

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.7.2 Densidade do meio

As medidas da densidade do meio foram feitas com auxílio de uma proveta e um densímetro com escala de massa específica (densidade relativa) 0,990 a 1,100.

4.7.3 Determinação do pH

O valor do pH da amostra foi determinado seguindo a norma estabelecida pelo Instituto Adolfo Lutz (ZENEBO; PASCUET; TIGLEA, 2008). O valor foi medido por um pHmetro previamente calibrado e operado de acordo com as instruções descritas no manual do fabricante.

4.7.4 Acidez total titulável

A acidez foi determinada pelo método Acidez Total para bebidas fermento-destilladas estabelecido pelo Instituto Adolfo Lutz (ZENEBO; PASCUET; TIGLEA, 2008). Método que baseia-se na titulação de neutralização dos ácidos com solução padronizada de álcali, e a acidez total expressa em g de ácido acético por 100 mL de amostra como mostrado na

Equação 4.1. A titulação de neutralização dos ácidos contidos na amostra foi feita com solução de NaOH 0,05 mol.L⁻¹ padronizada com biftalato de potássio previamente seco a 110 °C por duas horas, utilizando duas gotas de solução alcoólica de fenolftaleína 1,0% (m/v) como indicador.

$$AT = \frac{n \times M \times f \times PM}{10 \times V} \quad (4.1)$$

Onde:

AT = ácidos totais, em g de ácido acético por 100 mL

n = volume gasto na titulação da solução de hidróxido de sódio, em mL

M = molaridade da solução de hidróxido de sódio

f = fator de correção da solução de hidróxido de sódio

PM = massa molecular do ácido acético (60 g)

V = volume tomado da amostra, em mL

4.7.5 Preparo das amostras de cerveja

Todas as determinações foram realizadas na amostra descarbonatada. Para remover o CO₂ transferiu-se a amostra para um béquer de 500 mL e agitou-se com um bastão ou por meio de um banho de ultra-som. Mantendo sempre a temperatura da cerveja entre 20 °C e 25 °C (ZENEBO; PASCUET; TIGLEA, 2008).

4.7.6 Concentração celular

A concentração de células em suspensão foi determinada usando uma Câmara de Neubauer, e o resultado expresso em células/mL. A determinação da viabilidade celular foi realizada pelo Método Internacional de Coloração utilizando azul de metileno e calculada pela Equação 4.2 (ASBC Methods of Analysis, Approved 1958, rev. 2011).

$$\text{Viabilidade (\%)} = \frac{\text{células viáveis}}{\text{total de células}} \times 100 \quad (4.2)$$

4.7.7 Determinação do teor alcoólico

Foi utilizado método de Álcool em volume a 20 °C ou grau alcoólico real para bebidas fermento-destiladas conforme sugerido pelo Instituto Adolfo Lutz (ZENEBO; PASCUET;

TIGLEA, 2008). Este método consiste na separação do álcool por destilação e posterior determinação da densidade do destilado por picnômetro ou densímetro digital e convertida em porcentagem de álcool em volume.

4.7.8 Extrato real

A determinação do extrato real por este método baseia-se na pesagem do resíduo seco de um certo volume de amostra submetido à evaporação (ZENEBO; PASCUET; TIGLEA, 2008). Foi transferido, com auxílio de uma pipeta volumétrica, 20 mL de amostra descarbonatada para uma cápsula e aquecida até a secagem, em seguida foi levada à estufa a 100 ± 5 °C por 1 hora, após resfriada à temperatura ambiente em dessecador, foi medida sua massa. O valor do extrato real foi calculado segundo a Equação 4.3.

$$E_r = \frac{100 \times P}{V} \quad (4.3)$$

Onde:

E_r = extrato real % (m/v)

P = massa do resíduo, em g

V = volume da amostra, em mL

4.7.9 Atenuação

O cálculo da atenuação foi feito segundo a Equação 4.4 (PALMER, 2006)

$$\text{Atenuação (\%)} = \frac{(OG - FG)}{(OG - 1)} \quad (4.4)$$

Onde:

FG = densidade final

OG = densidade inicial

4.7.10 Cálculo do fator de conversão

O fator de conversão de açúcares em etanol da fermentação foi calculado a partir da Equação 4.5.

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{-\Delta S} = \frac{(P_f - P_i)}{(S_i - S_f)} \quad (4.5)$$

Onde:

$Y_{P/S}$ = fator de rendimento, g/g

P_f = concentração final de etanol, g.L⁻¹

P_i = concentração inicial de etanol, g.L⁻¹

S_f = concentração final de açúcares, g.L⁻¹

S_i = concentração inicial de açúcares, g.L⁻¹

4.7.11 Eficiência

A eficiência da fermentação foi calculada com base no rendimento teórico proveniente da equação de Gay-Lussac e de acordo com a Equação 4.6.

$$\eta = \frac{Y_{P/S} \text{ experimental}}{Y_{P/S} \text{ teórico}} \quad (4.6)$$

Onde:

η = eficiência, %

$Y_{P/S} \text{ teórico} = 0,538 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{maltose}}$

4.8 Análise dos dados

Para a análise estatística dos dados e construção dos gráficos foi utilizado o software R versão 3.4.1 (R Development Core Team, 2008) junto a interface RStudio versão 1.0.153 (RStudio Team, 2015) utilizando os pacotes *rsm* (LENTH, 2009) e *DoE.wrapper* (GROEMPING, 2017) para o planejamento fatorial 2x2x3 e os pacotes *car* (FOX; WEISBERG, 2011) e *onewaytests* (DAG; DOLGUN; KONAR, 2018) para as análises não-paramétricas. Sendo feita a inferência quanto a normalidade dos dados pelo teste de Shapiro-Wilk e homogeneidade de variância (homoscedasticidade) pelo teste de Levene. Quando os dados seguiram a distribuição normal e apresentaram homogeneidade de variância realizou-se a Análise de Variância (ANOVA) e teste post-hoc para comparação pareada das médias pelo teste de Tukey. Quando os dados não se adequaram a distribuição normal ($p < 0,05$ no teste de Shapiro-Wilk), realizou-se os testes de Welch e Kruskal-Wallis para verificar se havia diferença significativa, seguido pela análise *post-hoc* comparando par a par pelo teste de Wilcoxon com ajuste de Bonferroni. Adotando o nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Cultivo tradicional do kefir de água

Os grãos de kefir apresentaram-se com tamanho entre 0,4 e 1,5 cm, com aspecto translúcido gelatinoso, superfície enrugada e coloração levemente amarelada devido o seu cultivo em solução açúcar mascavo de cor escura (Figura 6). A aparência do kefir aqui cultivado é igual ao da amostra apresentada por Schneedorf (2012) que descreve o kefir de água como grãos gelatinosos e irregulares, e observando os grãos de kefir usado por Laureys et al. (2017) nota-se a mesma aparência quando foram cultivados de forma doméstica. Pequenas variações no aspecto do kefir também poderiam ser aceitas e considerá-lo normal, visto que, segundo Fiorda et al. (2017) os grãos de kefir podem variar de acordo com a fonte de carbono e essas diferenças têm maior efeito sobre o tamanho dos grãos e o crescimento dos micro-organismos

Com esse cultivo inicial de kefir foi possível obter a quantidade necessária de grãos para a realização dos demais ensaios.

Figura 6 - Grãos de kefir após serem coados da solução de água e açúcar mascavo 5,0% (m/v).

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2 Fermentação do kefir

A Figura 7 mostra a fermentação do kefir cultivado em solução de açúcar mascavo e em soluções de açúcar mascavo que foram lupuladas em duas concentrações diferentes. No Gráfico A da Figura 7 temos que o kefir em meio somente de açúcar mascavo apresentou

maior produção de biomassa. Nos meios com adição de lúpulo observamos baixo crescimento dos grãos de kefir, e com aumento da quantidade de lúpulo para $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ a produção de biomassa teve variação total menor que 10 g.L^{-1} ao longo dos 7 dias de fermentação. Para o kefir em meio sem adição de lúpulo, observou-se que nas primeiras 48 horas de fermentação foi onde ocorreu a maior produção de biomassa.

O consumo de açúcar para a três condições de fermentação foi semelhante, sendo que a densidade final para o fermentado do grupo composto somente por açúcar sem a adição do lúpulo ficou em 1,000 e para o meio com lúpulo $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ e $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ a densidade final foi de 0,997 e 1,003, respectivamente. Pelo comportamento mostrado no Gráfico B da Figura 7, o grupo com maior quantidade de lúpulo parece consumir mais lentamente o açúcar do meio quando comparado ao meio sem lúpulo e ao com $1,0 \text{ g.L}^{-1}$.

Figura 7 - Fermentação do kefir em solução de açúcar mascavo (quadrado) e com adição de lúpulo nas concentrações de $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ (círculo) e $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ (triângulo).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Ao observarmos a acidez total do fermentado temos que a quantidade de $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ de lúpulo apresentou menor acidez, que aumentou principalmente nas primeiras 72 horas de

fermentação, sendo que a acidez final foi de 0,24% (expresso em ácido acético). O grupo sem adição do lúpulo foi o que apresentou maior variação da acidez ao longo da fermentação, entretanto no final sua acidez foi de 0,43%, valor de acidez igual ao do meio lupulado com $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ no final dos 7 dias.

As primeiras 48 horas de fermentação foi o período que houve maior diminuição do pH em todos os meios. Para o kefir cultivado em meio somente de açúcar, nas primeiras 24 horas de fermentação o valor de pH foi de 6,40 para 4,54 e com a presença de lúpulo a $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ essa variação foi de 6,40 para 4,76. Comportamento muito similar observado por Schneedorf (2012) que verificou a diminuição do pH do valor de 6,1 para 4,5 nas primeiras 20 horas de fermentação. Resultados obtidos por Laureys e Vuyst (2014) também mostram que a queda mais acentuada do pH ocorre nas primeiras 48 horas da fermentação; comportamento semelhante ao observado por Stadie (2013) que em sua fermentação com kefir, o pH diminuiu de 6,5 para 3,5 nas primeiras 48 horas do processo.

Praticamente não houve diferença no valor de pH para o uso somente de açúcar mascavo ou com concentração de lúpulo a $1,0 \text{ g.L}^{-1}$. Para o fermentado com lúpulo a $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ o pH final foi de 4,02; o que corresponde a 0,5 unidade de pH maior que a observada para os outros meios. Observação nos remete a limitação da produção de ácidos pelas bactérias, que não são totalmente resistentes ao lúpulo, comportamento que complementa o verificado com a acidez total.

A bebida do kefir cultivado em açúcar mascavo, principalmente consumida no México e no Brasil, é uma bebida fermentada levemente gaseificada com forte sabor ácido e aroma de levedo, o que a torna uma bebida refrescante de baixo teor alcoólico (MAGALHÃES et al., 2010). Os principais compostos formados pela fermentação do kefir são o etanol, o ácido lático, o ácido acético e outros metabólicos, como manitol, glicerol, ésteres e outros ácidos orgânicos (FIORDA et al., 2017). Essa gama de produtos da fermentação deve-se a diversidade de micro-organismos presentes nos grãos de kefir, e entres eles há uma complexa relação simbiótica.

O metabolismo das leveduras favorece o crescimento das bactérias ácido lácticas e das bactérias acéticas. Sendo que a hidrólise da sacarose pela invertase das leveduras proporciona um aumento nos níveis de glicose e frutose, tornando essa fonte de carbono disponível para as bactérias lácticas. Ao mesmo tempo que parte do etanol produzido pelas leveduras se torna disponível para o metabolismo das bactérias acéticas (FIORDA et al., 2017). Stadie et al. (2013) mostram que a relação simbiótica é ainda mais complexa pois a produção de ácidos pelos *Lactobacillus* favorecem o metabolismo da levedura *Zygorulasporea florentina* na

produção de aminoácidos e vitamina B6, que depois são aproveitados pelos *Lactobacillus* ao mesmo tempo fornecem fatores de crescimento ainda desconhecidos para a *Saccharomyces cerevisiae*.

O lúpulo além de conferir amargor também exerce efeito antibacteriano frente a bactérias Gram-positivas e em maioria de bactérias ácido lácticas, entretanto várias espécies dessas bactérias possuem genes que as tornam lúpulo resistente, assim seu metabolismo segue a produção normal de ATP podendo utilizar como fonte de carbono: citrato, malato, piruvato, arginina e açúcares fermentescíveis. Parte da energia produzida é responsável por manter o mecanismo de resistência ao efeito intracelular dos ácidos do lúpulo como proposto por Suzuki et al. (2006).

Observa-se que a presença de lúpulo exerce maior efeito sobre a produção de biomassa de kefir pois ao fim da fermentação a quantidade de $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ de lúpulo praticamente não apresentou diferença do kefir cultivado apenas em açúcar mascavo, exceto para o crescimento de biomassa. Como a matriz dos grãos de kefir é composta principalmente pelos exopolissacarídeos produzidos pelas bactérias (PIDOUX; BRILLOUET; QUEMENER, 1988; WALDHERR et al., 2010; DAVIDOVIC et al., 2015) e o lúpulo possui efeito antimicrobiano alguns micro-organismos (SAKAMOTO; KONINGS, 2003; SUZUKI et al., 2006), pelos resultados observados no experimento é possível inferir que a diminuição da produção de biomassa pode ser decorrente do efeito bacteriostático do lúpulo, que afetou principalmente as bactérias responsáveis pelo crescimento dos grãos de kefir.

O efeito antimicrobiano do lúpulo sugere ser o responsável pela diferença de comportamento da acidez entre as fermentações do kefir. As bactérias têm grande contribuição para a acidez do kefir. Os componentes do lúpulo afetam o metabolismo das bactérias, com o aumento da carga de lúpulo houve diminuição da acidez. Na condição em que se utilizou pouco lúpulo podemos assumir que parte da acidez é devido à atuação das bactérias na fermentação.

A presença de substâncias que possam afetar as bactérias do kefir impactará diretamente na produção de biomassa que constitui os grãos de kefir. Assim para produzir um fermentado tão ácido quanto kefir em seu cultivo tradicional, deve-se usar quantidade de lúpulo $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ ou menor, tendo como meio basicamente constituído de sacarose como fonte de energia. A acidez acaba sendo uma característica inerente ao kefir, o que é vantajoso para a produção de bebidas ácidas em que se busca um produto diferenciado com complexidade de aroma e sabor.

5.3 Planejamento fatorial 2x2x3 para elaboração da cerveja de kefir

O mosto cervejeiro é um meio constituído por diversos açúcares e conta com a presença de nutrientes tais como aminoácidos e sais minerais, além dos compostos provenientes do lúpulo e do malte. Durante a etapa de cozimento de malte na faixa de temperatura de 60–65 °C atua a β -amilase que converte o amido em moléculas de açúcares fermentescíveis, principalmente maltose; enquanto que a α -amilase que tem atividade entre 65–75 °C, converte o amido em polissacarídeos (KROTTENTHALER; ZARNKOW, 2009). Assim o mosto cervejeiro é um meio totalmente diferente quando comparado ao cultivo tradicional do kefir em solução de açúcar constituído basicamente por sacarose.

Na fermentação ocorre a metabolização dos substratos em produtos pela atividade de micro-organismos que simultaneamente produzem a sua energia. Durante este processo ocorre a formação das substâncias que irão compor a cerveja, tendo considerável efeito sobre o gosto e o perfil aromático do produto final (ESSLINGER, 2009). No caso da cerveja, o principal bioproduto desejado é o etanol, mas também é importante a produção concomitante em pequena quantidade de compostos como ésteres, álcoois superiores e ácidos orgânicos.

Conforme Esslinger (2009), parâmetros são estabelecidos para controlar a fermentação no sentido de se obter o produto desejado. Sabendo-se que numerosos fatores podem influenciar a fermentação, como por exemplo, a composição do meio, temperatura, quantidade de células e aeração do mosto.

Para avaliar em que condições o kefir melhor se comporta para uso na fermentação de uma cerveja artesanal, foi realizado o planejamento fatorial completo 2x2x3. Neste tipo de delineamento realiza-se todas as combinações possíveis entre os fatores e seus níveis (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010), no qual foram elencados os fatores: massa de kefir inoculadas, quantidade de lúpulo e temperatura de fermentação. A Tabela 8 apresenta os resultados correspondentes ao planejamento, que totalizou 12 condições experimentais.

Os mostos preparados apresentaram densidade inicial de 1.057 e extrato original de 15,7%. O tempo de fermentação foi observado monitorando a atenuação do mosto até que ocorresse a estabilização da densidade do meio. Para as cervejas fermentadas a 12 °C o tempo de fermentação foi de 15 dias, sendo que utilizando a temperatura de 20 °C foram necessários 9 dias para a atenuação do mosto, e fermentando a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C), foram precisos 7 dias. A fermentação do kefir mostra-se ser mais rápida em temperaturas maiores, condição em que o metabolismo dos micro-organismos presentes nos

grãos possui maior atividade, o que condiz com o cultivo tradicional do kefir, principalmente em países de clima tropical no qual a temperatura média anual fica acima dos 20 °C.

Tabela 8 - Resultados encontrados para as cervejas produzidas no planejamento fatorial 2x2x3

Ensaio	Álcool (% v/v)	Acidez (%)	pH	Tempo (dias)	Atenuação (%)	$Y_{P/S}$ (g/g)	η (%)
1	1,51	0,14	4,72	15	45,3	0,149	27,78
2	1,55	0,14	4,75	15	36,5	0,181	33,68
3	1,89	0,15	4,59	15	36,5	0,221	41,07
4	1,75	0,14	4,72	15	38,2	0,197	36,70
5	4,90	0,17	4,53	9	68,2	0,347	64,47
6	5,44	0,17	4,56	9	71,8	0,369	68,56
7	5,83	0,16	4,82	9	71,8	0,395	73,58
8	5,51	0,16	4,87	9	71,8	0,374	69,45
9	4,79	0,20	4,27	7	73,5	0,318	59,13
10	5,17	0,18	4,30	7	75,3	0,336	62,53
11	5,25	0,20	4,37	7	70,0	0,364	67,59
12	5,12	0,19	4,41	7	73,5	0,340	63,20

Fonte: Elaborado pelo autor.

A acidez das cervejas não mostrou-se variar muito entre os ensaios realizados, sendo os menores valores ocorreram na temperatura de 12 °C, que foi a mais baixa utilizada, e para as condições de temperaturas mais altas ficou em torno de 0,20%. Segundo Venturini e Cereda (2001) a faixa de acidez para cervejas de baixa fermentação ficam entre 0,06–0,10% (expressa em % de ácido acético), para cervejas do tipo *Ale* em que se utiliza temperaturas de fermentação maiores, é de se esperar uma maior acidez devido a produção de ácidos orgânicos pelo metabolismo das leveduras.

Na produção de cervejas do tipo *Saison* utiliza-se linhagens de leveduras que possuem característica de gerar acidez e produzir ésteres durante sua fermentação, para as cervejas *Sours* a própria metodologia de produção já é voltada para se obter uma cerveja ácida. Ao utilizar o kefir as cervejas ficaram mais ácidas do que o considerado como comum para uma cerveja do tipo *Pilsen*. Sendo que já era esperado uma maior acidez, similar as cervejas *Ale* e *Sour*, devido à presença das bactérias e leveduras selvagens que compõe os grãos de kefir.

Os valores de pH para as cervejas ficaram entre 4,3–4,9, sendo que as fermentações realizadas sem o controle de temperatura foram as que apresentaram os menores pH. Venturini e Cereda (2001) assumem que geralmente o valor de pH da cerveja fica entre 3,8–4,7. Taylor e Organ (2009) consideram que o pH da cerveja está tipicamente na faixa de 3,8–4,3; mas consideram que tanto o pH, quanto os níveis de acidez podem variar dependendo da levedura utilizada. As fermentações com o kefir praticamente apresentaram valores de pH acima de 4,3. As condições de fermentação ou mesmo a formulação do meio podem ter sido

responsáveis pelos valores de pH não tão baixos. Embora a acidez é marcante e parece ser uma característica inerente ao kefir, o que sugere que parte da acidez não seja propriamente causada por ácidos orgânicos que proporcionam a diminuição do pH, e sim constituída por outros produtos de fermentação, como ésteres e álcoois superiores.

Ao observarmos a fermentação do mosto cervejeiro pelos grãos de kefir e adotando o teor alcoólico como resposta, temos a Figura 8 que mostra como os fatores utilizados nos planejamento tem efeito sobre a cerveja produzida. A linha horizontal destacada no gráfico indica o teor alcoólico médio obtido no planejamento, sendo que cada barra corresponde a resposta média de álcool para cada condição. Realizando a análise dos resultados do planejamento no software R utilizando o pacote *Doe.wrapper* e verificando o gráfico half normal de efeitos, adotando o método da distância dos pontos (*Lenth method*) e $\alpha = 0,05$, temos que os tratamentos com efeito significativo foram temperatura de 20 °C e temperatura ambiente. Os fatores massa de kefir inoculada e quantidade de lúpulo utilizada mostraram não ter impacto significativo sobre o teor alcoólico. A temperatura foi a condição que promoveu maior efeito na produção de álcool pela fermentação; no qual as temperaturas de 20 °C e ambiente tiveram efeito positivo no sentido de aumentar o teor alcoólico quando comparada a média experimental do planejamento.

Figura 8 - Representação do teor alcoólico médio observado como resposta para cada condição realizada no planejamento experimental 2x2x3.

Elaborado pelo autor.

Como mostrado na Tabela 8, os ensaios realizados utilizando temperatura de fermentação de 12 °C foram os que apresentaram menor atenuação, ficando abaixo de 50%, o

que indica que foi incapaz de consumir ao menos metade da quantidade de açúcares fermentescíveis do mosto. Palmer (2006) classifica a atenuação aparente como baixa (65–70%), média (71–75%) e alta (76–80%), sendo que valores abaixo de 65% não são desejados para a produção de cerveja. Para as fermentações conduzidas a 20 °C e a temperatura ambiente a atenuação ficou em torno de 72%, chegando a atingir 75% para o ensaio de número 10, mostrando assim que em temperaturas mais altas o kefir possui boa capacidade atenuação.

Por se tratar de um meio complexo em que além de açúcares fermentescíveis também há dextrinas, polissacarídeos, peptídeos e compostos do lúpulo, não podemos levar em conta somente a atenuação. Também devemos considerar o coeficiente de rendimento $Y_{p/s}$, no qual o maior valor encontrado foi de 0,395 para ensaio número 7 do planejamento, que corresponde a uma eficiência de fermentação alcoólica de 73,58%. Assim temos que a temperatura de 20 °C e o uso de 20 g.L⁻¹ de grãos de kefir como inóculo são condições adequadas e favoráveis para o uso do kefir na produção de cerveja. Entretanto foi notável o aroma e gosto de solvente simultaneamente com a presença de acidez na cerveja.

Canonico, Comitini e Ciani (2017) descrevem que fermentações mistas mostram quantidades significativamente altas de acetato de etila e acetato de isoamila, e normalmente baixos níveis de hexanoato de etila e octanoato de etila para fermentações utilizando inóculo misto de *Saccharomyces cerevisiae* e *Torulaspora delbrueckii*. Os autores também verificaram que as fermentações mistas também foram afetadas pelas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas, o que resultou em cervejas com sabores distintos, concluindo que a fermentação mista é uma estratégia adequada para controlar a produção de componentes de aroma e sabor durante a fermentação da cerveja.

5.4 Produção das cervejas

A Figura 9 mostra perfil da fermentação teste das cervejas, onde foi aumentado a temperatura com 15 dias de fermentação e seguiu a 20 °C até a atenuação do mosto com 25 dias de fermentação. Observando o perfil da fermentação teste, temos que a partir do quinto dia a fermentação ocorreu lentamente, período qual não ocorreu mudança na densidade do mosto. Para diminuir o tempo de fermentação consideramos que a temperatura pode ser aumentada para 20 °C no quarto dia de fermentação. A Tabela 9 traz os resultados obtidos para as cervejas da fermentação teste; nelas não percebeu-se gosto ou aroma de solvente, o

que pode ser resultado da combinação entre o uso do perfil de temperaturas na fermentação com a mudança no preparo do mosto.

Figura 9 - Evolução da fermentação teste em função da temperatura da cerveja de kefir puro malte e da cerveja de kefir com suco de maracujá.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 9 - Resultados encontrados para as cervejas de kefir para fermentação teste com perfil de temperatura de 16 e 20 °C.

Análises	Kefir	Kefir com fruta
Álcool (%)	4,41	4,78
pH	3,75	3,75
Acidez (%)	0,26	0,36
Atenuação (%)	78,6	78,6
$Y_{P/S}$ (g/g)	0,357	0,387
η (%)	66,40	71,97

Fonte: Elaborado pelo autor.

Após a fermentação teste foram feitas as cervejas de kefir, uma sem adjunto e outra com suco de maracujá como adjunto, e também uma cerveja feita com as mesmas condições utilizando fermento cervejeiro. O perfil da fermentação das cervejas feitas com os grãos de kefir como inóculo apresentaram comportamentos similares, Figura 10 Gráficos A e B. Para o fermento cervejeiro comercial fica evidente o rápido consumo de substrato e subsequente produção de álcool, como mostrado na Figura 10 Gráfico C. A diferença observada entre as

fermentações utilizando kefir e fermento cervejeiro, pode ser atribuída ao fato do kefir ser constituído por vários micro-organismos de diferentes espécies, enquanto que o fermento seco, trata-se apenas de uma única espécie, sendo uma linhagem selecionada de *Saccharomyces cerevisiae*.

A Figura 11 traz as concentrações celulares de leveduras observadas ao longo da fermentação. Para as amostras das fermentações em que o kefir foi utilizado como inóculo, observou-se a presença de grande quantidade de células de bactérias, principalmente de *Lactobacillus*. As concentrações de leveduras ficaram em 10^6 – 10^7 células/mL. Para o fermento cervejeiro a concentração máxima de células suspensas no meio ocorreu logo no início da fermentação, atingindo $2,57 \cdot 10^7$ células/mL, e diminuiu bruscamente conforme o avanço da fermentação, visto que o fabricante descreve que o fermento possui boa capacidade de floculação. A viabilidade das células do fermento também diminuiu consideravelmente a partir do quarto dia de fermentação, ficando em torno de 20–25% de células viáveis. Esse comportamento é tido como esperado pois todo o substrato já havia sido consumido e a presença do etanol em boa concentração causaria efeito tóxico para as células remanescentes.

Para as fermentações utilizando kefir, ao se pensar que inicialmente os micro-organismos estão envolvidos pela matriz de polissacarídeos, o comportamento esperado no decurso da fermentação é que a quantidade de células em suspensão no meio aumente até atingir um nível máximo e em seguida inicie o declínio. Comportamento esse que é possível se observar na Figura 11 (Gráficos A e B), de forma mais evidente na fermentação da cerveja de kefir com suco de maracujá como adjunto, que atingiu concentração máxima de $3,08 \cdot 10^7$ células/mL, e sem adjunto foi de $2,30 \cdot 10^7$ células/mL. Valores esse que são considerados adequados para a fermentação da cerveja. Verbelen et al. (2009) consideram que taxa de inóculo utilizada normalmente nas cervejarias é de $2,0 \cdot 10^7$ células/mL.

A viabilidade celular das leveduras nas fermentações com o kefir manteve-se acima de 95% até o sexto dia de fermentação, só então começou a diminuir, o que pode ter relação com o teor alcoólico ainda estar abaixo de 2%. Indicando possível sensibilidade do kefir frente a altos níveis de álcool. Ao fim da fermentação a quantidade de células estava em $7,3 \cdot 10^6$ e $4,3 \cdot 10^6$ células/mL com viabilidade de 54,79% e 67,44%, respectivamente. Apontando-se a dificuldade de floculação natural pelas leveduras presentes no kefir. Característica que é desejável na produção de cervejas destinadas ao envelhecimento (cervejas de guarda) que necessitam que as células mantenham-se suspensas para que possam atuar na bebida durante esse processo; como mostrado por Spitaels et al. (2014) que analisaram a microbiota envolvida na fermentação de cervejas *Lambic* por amostragem durante dois anos em uma

cervejaria tradicional da Bélgica, onde a contagem máxima de células foi de 10^6 células/mL entre a semana 2 e 4 de fermentação, e também observaram a quantidade total de leveduras e bactérias após 24 meses, ficou em cerca de 10^3 – 10^4 células/mL.

Figura 10 - Evolução da densidade do meio (quadrado) e do teor alcoólico (círculo) seguindo o perfil de temperatura indicado pela linha tracejada para a fermentação da cerveja de kefir puro malte (A), cerveja de kefir com suco de maracujá (B) e cerveja feita com fermento cervejeiro comercial.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Callejo, González e Morata (2017) relatam que o uso de leveduras não *Saccharomyces* é uma tendência em muitas indústrias de alimentos fermentados (vinhos, cerveja, pão, etc.).

Abrindo novas possibilidades para modular o sabor e outras propriedades sensoriais durante a fermentação e envelhecimento biológico. É possível aplicar esta técnica adicionando culturas puras de diferentes espécies e linhagens de leveduras não *Saccharomyces* para aumentar a complexidade do produto final.

Figura 11 - Concentração de células viáveis e não viáveis em suspensão durante a fermentação da cerveja de kefir (A), kefir com fruta (B) e usando fermento cervejeiro (C).

Fonte: Elaborado pelo autor.

A Tabela 10 mostra os resultados encontrados para as cervejas finais produzidas. A densidade e o extrato real das cervejas tiveram valores bem próximos. Esses dois parâmetros estão relacionados a quantidade de açúcares residuais, sejam eles fermentescíveis ou não, o que pode ser uma característica favorável para a bebida pois são capazes de proporcionar um pouco de dulçor, propiciando um gosto mais equilibrado a cerveja.

Tabela 10 - Resultados físico-químicos e parâmetros de fermentação das cervejas produzidas.

Análises	Kefir	Kefir com fruta	Fermento cervejeiro
Álcool (%)	4,47	4,78	5,09
Densidade	1,011	1,010	1,011
Extrato real (%)	4,405	3,885	4,185
pH	3,81	3,81	4,07
Acidez (%)	0,26	0,39	0,19
Atenuação (%)	75,6	77,8	75,6
$Y_{P/S}$ (g/g)	0,407	0,411	0,452
η (%)	75,66	76,33	84,03

Fonte: Elaborado pelo autor.

O pH das cervejas ficaram dentro da faixa tido como adequado para cerveja, sendo que as de kefir apresentaram menor valor de pH do que a feita com fermento cervejeiro. Segundo o fabricante do fermento cervejeiro utilizado, a sua faixa ótima é de 15–20 °C, temperatura de fermentação de cervejas *Ales*, que possuem como características notas frutadas e leve acidez. Assim a acidez da cerveja feita com o fermento é aceitável o valor de 0,19%. As cervejas de kefir apresentaram maior acidez, 0,26% e 0,39%, essa diferença entre elas se deve a adição do suco de maracujá como adjunto, já que o maracujá além de aromático é uma fruta ácida.

A atenuação das cervejas ficou em 75–78% podendo ser considerada alta atenuação, e que reflete também boa fermentabilidade de mosto preparado para a produção das cervejas. O fator de rendimento utilizando o kefir ficou em aproximadamente 0,41 g/g e para o fermento cervejeiro observamos o valor de 0,452 g/g. Valores de $Y_{P/S}$ que podem ser considerados como bons e satisfatórios para a produção de cerveja. Nunes et al. (2017) utilizando a levedura SC52 do seu acervo de micro-organismos isolados e o fermento s-04 para produzir cervejas com polpa de cacau como adjunto, observou valores de $Y_{P/S}$ de 0,46 e 0,44 g/g, respectivamente. A eficiência da fermentação das cervejas de kefir ficou em torno de 76% e para o fermento chegou a 84%. Mesmo resultando em bons valores para produção de álcool, espera-se que a fermentação também contribua com outros compostos em menor quantidade que enriqueçam o aroma e sabor da cerveja.

Laureys et al. (2017) em seus testes para uso de kefir como inóculo para fermentações em escala industrial, relata que as fermentações progrediram lentamente, fato causado pela excessiva concentração de substrato que acaba resultando num alto estresse osmótico para os micro-organismos presentes no kefir. Logo para a produção da cerveja utilizando kefir é interessante diminuir a quantidade de substrato. Adotamos assim a diminuição da quantidade de malte utilizado, passando de 0,25 kg.L⁻¹ para 0,19 kg.L⁻¹.

Venturini e Cereda (2001) consideram que o extrato inicial de uma cerveja tipo *Pilsen* pode ser de 10,7–12,1%. Com a redução na quantidade de malte buscou-se a produção de um mosto com extrato inicial de aproximadamente 10,7%, resultando numa densidade de 1,042. A mudança da rampa de temperatura utilizada na brassagem foi feita para priorizar a ação das enzimas β -amilases no intuito de uma maior conversão do amido do malte em açúcares fermentescíveis. Muller (2000) afirma que comumente usa-se a isoterma de 65 °C na etapa de preparação do mosto, pois é capaz de promover a gelatinização do amido presente com subsequente quebra em açúcares (mono, di e trissacarídeos) pela atividade das enzimas do malte. Como exemplo da importância da temperatura o autor cita o uso de altas temperaturas (em torno de 85 °C) para diminuir a fermentabilidade do mosto na produção de cervejas de baixo teor alcoólico.

Segundo Verstrepen et al. (2003) os ésteres são responsáveis pelo sabor frutado e constituintes importantes do aroma da cerveja. Dentre os fatores que influenciam na produção de ésteres durante a fermentação, a temperatura e a densidade do mosto são parâmetros que podem ser adaptados. Permitindo com que os fabricantes de cerveja controlem as concentrações de ésteres formados, e assim, controlem o caráter frutado de suas cervejas; evitando o excesso desses compostos, dos quais o acetato de etila é descrito como responsável pelo gosto e aroma de solvente.

De acordo com Callejo, González e Morata (2017) algumas cervejas tradicionais, como as do tipo *Lambic*, são produzidas por fermentações espontâneas com o desenvolvimento de leveduras não *Saccharomyces*, mais especificamente *Brettanomyces bruxellensis*. Seu perfil sensorial distinto está relacionado ao metabolismo da levedura que é capaz de produzir vários ésteres com aroma frutado, como acetato de etila, octanoato de etila, decanoato de etila e lactato de etila. Além disso, a acidez proporciona um sabor azedo/*sour* típico da cerveja *Lambic*. Metabólitos secundários como os álcoois superiores contribuem para o sabor alcoólico, o aroma picante, vinoso, pungente; podendo ter efeito sinérgico com a presença de ésteres em maiores concentrações.

Para evitar a formação excessiva de ésteres que possivelmente está relacionada ao gosto e aroma de solvente percebido nas cervejas produzidas anteriormente no planejamento experimental, foi testado o perfil de fermentação iniciando a 16 °C e depois aumentando a temperatura de 20 °C para favorecer o curso da fermentação. Ao mesmo tempo foi testado a adição de suco de maracujá como adjunto, em razão do seu aroma e sabor marcantes poderem conferir características agradáveis e complexidade à cerveja.

Macoris et al. (2011) ao identificar os componentes voláteis da polpa de maracujá encontraram butanoato de metila, acetato de butila, hexanal, 1-butanol, butanoato de butila, e outros compostos que foram relacionados ao aroma. Os componentes considerados mais importantes do sabor característico do maracujá são ésteres, o que pode balancear as características sensoriais da cerveja fermentada utilizando kefir, resultando numa cerveja do tipo *Fruity beer*.

5.5 Análise Sensorial

Segundo Zenebon, Pascuet e Tiglea (2008), análise sensorial é realizada em função das respostas transmitidas pelos indivíduos às várias sensações que se originam de reações fisiológicas e são resultantes de certos estímulos, gerando a interpretação das propriedades intrínsecas aos produtos. O estímulo é medido por processos físicos e químicos e as sensações por efeitos psicológicos.

As sensações produzidas podem dimensionar a intensidade, extensão, duração, qualidade, gosto ou desgosto em relação ao produto avaliado. Os métodos afetivos consistem na manifestação subjetiva dos provadores, pois não usam apenas das sensações proporcionadas pelos órgãos, mas também de sua memória afetiva. São capazes de demonstrar se tal produto agrada ou desagrade, se é aceito ou não. Por advir de uma manifestação pessoal, esses testes são os que apresentam maior variabilidade nos resultados, sendo mais difíceis de serem interpretados (TEIXEIRA, 2009).

Venturini e Cereda (2001) afirmam que apenas a caracterização físico-química não é suficiente para inferir sobre a qualidade e aceitação de uma cerveja, pois pode ter a composição físico-química desejada e ainda assim a cerveja pode ser intragável. O que ressalta a importância da Análise Sensorial como forma de avaliar a aceitação da cerveja. Segundo Teixeira (2009) a aceitação de um produto varia com os padrões de vida e base cultural, e demonstra a reação do consumidor diante de vários aspectos como, por exemplo, o preço, e não somente se agradou ou não. E ao se pensar em um produto passa a ser interessante avaliar não só os atributos sensoriais mas também a intenção de compra.

Granato, Calado e Jarvis (2014) consideram que os métodos estatísticos são importantes auxiliares para detectar tendências, explorar relações e tirar conclusões de dados experimentais. No entanto, não é incomum descobrir que muitos pesquisadores aplicam testes estatísticos sem verificar se são adequados para a aplicação pretendida. Já que a normalidade dos resultados experimentais é uma premissa importante para o uso de testes estatísticos

paramétricos, como Análise de Variância (ANOVA), Análise de Correlação, regressão simples e múltipla e Testes t. Se a suposição de normalidade não for confirmada por testes relevantes, a interpretação e a inferência de qualquer teste estatístico podem não ser confiáveis ou válidas.

A maioria dos constituintes químicos e contaminantes se adequam bem ou razoavelmente bem, para uma distribuição normal, mas sabe-se que os dados microbiológicos não. Granato, Calado e Jarvis (2014) sugerem o uso do teste de Shapiro-Wilk para verificar a normalidade dos dados, independentemente do tamanho da amostra, e também recomenda fortemente o uso do Teste de Levene para verificar a homogeneidade das variações para conjuntos de dados analíticos, bem como para testes sensoriais (por exemplo, testes hedônicos).

O painel de provadores para análise sensorial das cervejas produzidas foi formado por 60 consumidores não treinados, sendo 40 do sexo masculino e 20 do sexo feminino, com idade entre 18 e 65 anos, com média 28,85 anos; a Figura 12 mostra a distribuição etária dos provadores. Para as cervejas produzidas foram avaliadas os atributos sensoriais (aparência, cor, aroma, sabor e impressão global) e a intenção de compra conforme mostrado na Tabela 11.

Figura 12 - Distribuição dos provadores em função da idade, sendo que a idade mínima foi de 18 anos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A aparência e cor das cervejas não apresentaram diferença significativa na aceitação, sendo que a cerveja feita com o fermento Safale s-04 e a de kefir com adição de suco de maracujá tiveram melhor desempenho do que a somente utilizando kefir. O atributo cor já era

esperado que não apresentasse diferença, já que para todas as cervejas foi utilizado a mesma matéria-prima e mesmas condições de produção.

Tabela 11 - Notas dos atributos sensoriais e intenção de compra das cervejas artesanais produzidas

Atributos	Kefir	Safale s-04	Kefir com fruta
Aparência	7,17 ± 1,38	7,30 ± 1,36	7,43 ± 1,39
Cor	6,78 ± 1,48	7,25 ± 1,31	7,23 ± 1,54
Aroma	6,83 ^a ± 1,47	6,16 ^b ± 1,52	6,81 ^a ± 1,92
Sabor	6,85 ^c ± 1,62	6,05 ^d ± 1,92	6,81 ^c ± 2,19
Impressão global	6,80 ± 1,49	6,40 ± 1,63	6,75 ± 1,71
Intenção de compra	3,70 ± 1,08	3,35 ± 1,15	3,55 ± 1,32

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: Valores com letras sobrescritas diferentes indicam que houve diferença estatística a nível de significância de 5% para a e b, e de 10% para c e d.

Feita a análise estatística encontramos que houve diferença significativa para o aroma das cervejas, no qual as feitas utilizando kefir tiveram melhor aceitação do que a utilizando o fermento cervejeiro. Para as cervejas em que usou-se kefir na fermentação, mesmo com a adição de um adjunto que tem características sensoriais de aroma e sabor marcantes, a aceitação dos provadores não teve diferença significativa, resultando nas notas de 6,83 e 6,81, que na escala hedônica corresponde mais próximo a “gostei moderadamente”. Para a cerveja feita com o fermento, embora a aceitação do aroma tenha sido inferior às de kefir, o resultado ainda é considerado como bom, com nota média de 6,12 que equivale a “gostei ligeiramente”.

Ao realizarmos a análise estatística seguindo os critérios adotados, os testes de Welch e Kruskal Wallis indicaram que houve diferença significativa para o sabor com $\alpha = 0,10$, correspondendo a 90% de confiança. A aceitação do sabor das cervejas de kefir tiveram melhor desempenho do que a cerveja feita usando somente a levedura comercial, com as notas 6,85 e 6,81 contra 6,05, respectivamente.

A impressão global das cervejas teve o mesmo comportamento quanto ao sabor. A cerveja de kefir sem adjunto foi a que apresentou maior nota 6,80, seguida da cerveja de kefir com adição de suco de maracujá, com média de 6,75. Embora o sabor e impressão global das cervejas de kefir tenham sido bem próximos, a intenção de compra revelou a preferência dos provadores pela cerveja de kefir sem adjunto, com nota de 3,70, sugerindo que provavelmente eles comprariam, enquanto que a cerveja com adição de suco de maracujá e a fermentada com o Safale s-04 tiveram nota média de 3,35, que corresponde aproximadamente a “eu tenho dúvida se compraria”. Contudo, essas notas indicam uma tendência, visto que não houve

diferença significativa entre as cervejas considerando esses atributos sensoriais e a intenção de compra.

Nunes et al. (2017) consideram que a adição de adjuntos nas formulações de cerveja contribuiu para a fabricação de produtos com características distintas. Além de contribuir para o desempenho da fermentação, no seu trabalho foi utilizado polpa de cacau com ajunto e resultou em um produto com boa aceitação sensorial, sendo o aroma o atributo mais positivamente mencionado pelos provadores, corroborando os dados dos ésteres na cerveja. Na análise sensorial realizada pelos autores a cerveja produzida que recebeu notas mais altas relacionadas ao aroma, sabor e impressão geral, foi a com maiores concentrações de ésteres, que são responsáveis pelo sabor da cerveja.

Callejo, González e Morata (2017) concluem que o uso leveduras não *Saccharomyces* são uma tendência crescente na nova biotecnologia cervejeira por causa das melhorias que podem produzir na qualidade e diferenciação sensorial, especialmente em cervejas artesanais. Corroborando assim com o uso do kefir na fermentação das cervejas, que proporcionou uma bebida com acidez e aroma frutado balanceados com as outras características sensoriais esperadas para uma cerveja com boa aceitação.

De acordo com Canonico, Comitini e Ciani (2017) a escolha da levedura no processo de fabricação de cerveja também é crucial para alcançar um produto com os sabores distintos esperados pelos consumidores. Recentemente, com o objetivo de obter cervejas com perfis aromáticos mais complexos, os pesquisadores concentraram sua atenção em leveduras não convencionais. Investigações também foram focadas em métodos para melhorar a eficiência de fermentação e perfil aromático, alguns estudos têm focado em cerveja obtida por fermentação espontânea, como as cervejas belgas *Lambic*, *Gueuze*, *Berliner Weisse*, e algumas cervejas trapistas.

Rogers et al. (2016) relatam que embora a maioria das cervejas comercialmente disponíveis sejam fermentadas exclusivamente pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, os micro-organismos selvagens que inoculam as cervejas de fermentação espontânea e *Sours* incluem diversas espécies de leveduras (dentre elas *Saccharomyces*, *Brettanomyces*, e *Hanseniaspora*) bem como bactérias lácticas e acéticas. Os produtos do metabolismo dos micro-organismos acidificam a cerveja e conferem sabor característico levemente azedo. O que pode ser observado com o uso do kefir, que trouxe complexidade principalmente para o aroma da cerveja produzida.

Os resultados da análise sensorial mostraram que as cervejas feitas utilizando grãos de kefir como inóculo em sua fermentação tem aceitação igual à de uma cerveja artesanal

utilizando fermento cervejeiro. O mesmo comportamento foi observado para a intenção de compra. Ao observar as notas médias identifica-se a boa aceitação de todas cervejas, ressaltando o melhor desempenho das que foram fermentadas utilizando grãos de kefir de água como inóculo.

6 CONCLUSÕES

Conclui-se que a presença de lúpulo no meio de fermentação constituído de açúcar mascavo tem efeito sobre a fermentação do kefir, impactando diretamente sobre o crescimento dos grãos e sobre a acidez.

Pelo planejamento fatorial 2x2x3 foi possível verificar que o kefir é capaz de fermentar mosto cervejeiro e que o parâmetro mais significativo na fermentação foi a temperatura, sendo que o kefir apresentou resultados satisfatórios nas temperaturas de 20 °C e em temperatura ambiente (em torno de 25 °C). Observou-se que os fatores massa de kefir inoculada e quantidade de lúpulo utilizado não exerceram efeito significativo na fermentação alcoólica do kefir.

A acidez é uma característica inerente ao kefir pois concomitante com a fermentação alcoólica ocorre a produção de ácidos, o que é desejável para se produzir cervejas do tipo *Sour*, *Ale* com maior acidez, ou mesmo cervejas destinadas ao envelhecimento seguindo o processo cervejeiro tradicional.

O uso de perfil de temperatura de 16 e 20 °C na fermentação permitiu produzir a cerveja de kefir sem adjunto e outra usando suco de maracujá como adjunto, avaliando os parâmetros físico-químicos e fermentativos que apresentaram bons resultados e características sensoriais aceitáveis.

As cervejas feitas utilizando kefir apresentaram diferença significativa no aroma e no sabor quando comparadas a uma feita utilizando fermento cervejeiro convencional. Na análise sensorial, também observou-se melhor aceitação das cervejas feitas com kefir.

Por fim, temos que é possível fazer uma boa cerveja usando grãos de kefir de água como inóculo na fermentação, resultando numa cerveja única com complexidade de aroma e sabor, contribuindo assim para o desenvolvimento da tecnologia cervejeira e para o uso de fermentações mistas.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Para complementação desse trabalho, elencamos alguns pontos que ainda carecem ser estudados:

- Análise microbiológica do kefir de água e da dinâmica das populações de micro-organismos durante a fermentação;
- Isolar os micro-organismos do kefir e testá-los na produção de cerveja para identificar seu impacto na bebida;
- Análise de componentes de aroma e sabor;
- Análise das características sensoriais com provadores treinados;
- Atividade probiótica da cerveja de kefir;
- Produção em planta piloto e estudo de aumento de escala.

REFERÊNCIAS

AIZEMBERG, R. **Emprego do caldo de cana e do melado como adjunto de malte na produção de cervejas**. 2015. 272 f. Tese (Doutorado em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena, 2015.

ALMEIDA e SILVA, J. B. Cervejas. In: VENTURINI, W. F. G. (Ed.). **Bebidas alcoólicas: ciência e tecnologia**. São Paulo: Blucher, 2010. v. 1, cap. 2, p. 23–58.

American Society of Brewing Chemists. **About ASBC**. 2018. Disponível em: <<https://www.asbcnet.org/membership/about/Pages/default.aspx>>. Acesso em: 21 mar. 2018.

ANDERSON, R. One yeast or two? pure yeast and top fermentation. **Journal of the Brewery History Society**, n. 149, p. 30–38, 2012.

ASBC Methods of Analysis. **Microscopic yeast cell counting**. St. Paul, MN, U.S.A.: American Society of Brewing Chemists, Approved 1958, rev. 2011.

BAMFORTH, C. W. **Food, fermentation and micro-organisms**. St Paul, MN: John Wiley & Sons, 2005.

BATISTA, R. de A. **Produção e avaliação sensorial de cerveja com pinhão (*Araucaria angustifolia*)**. 2014. 108 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena, 2014.

Beer Judge Certification Program. **Introduction to the BJCP**. Disponível em: <<http://dev.bjcp.org/about/introduction-bjcp>>. Acesso em: 21 de mar. de 2018.

BERGMANN, R. S. d. O.; PEREIRA, M. A.; VEIGA, S. M. O. M.; SCHNEEDORF, J. M.; OLIVEIRA, N. d. M. S.; FIORINI, J. E. Microbial profile of a kefir sample preparations: grains in natura and lyophilized and fermented suspension. **Food Science and Technology**, v. 30, n. 4, p. 1022–1026, 2010.

BRADDEE, L. H.; DUENSING, W.; HALSTAD, S.; KLIMOVITZ, R.; LAIDLAW, A. Adjuncts. In: M, B. H. (Ed.). **The practical brewer: a manual for the brewing industry**. Madison, WI: Master Brewers Association of the Americas, 1977. cap. 4, p. 53–82.

BRASIL. Decreto no 6.871, de 4 de junho de 2009, regulamenta a lei que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. **Diário Oficial da União**. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2009/Decreto/D6871.htm>. Acesso em: 23 mar. 2018.

BRASIL. **Classificação de risco dos agentes biológicos / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento do Complexo Industrial e Inovação em Saúde**. 2. ed. Brasília, 2010. Série A. Normas e Manuais Técnicos.

BRASIL, Ministério da Saúde. Portaria de consolidação no 5 - consolidação das normas sobre as ações e os serviços de saúde do sistema Único de saúde. **Diário Oficial da União**. 03 dez. 2017. Disponível em: <ftp://ftp.saude.sp.gov.br/ftpsssp/bibliote/informe_eletronico/2017/iels.out.17/Iels194/U_PRC-MS-GM-5_280917.pdf>. Acesso em: 23 mar. 2018.

Brewers Association. **Craft Brewer Defined - An American craft brewer is small, independent and traditional**. Disponível em: <<https://www.asbcnet.org/community/about/Pages/default.aspx>>. Acesso em: 21 mar. 2018.

BURBERG, F.; ZARNKOW, M. Special production methods. In: ESSLINGER, H. M. (Ed.). **Handbook of Brewing: processesm technology, markets**. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2009. cap. 10, p. 235–256.

CALLEJO, M. J.; GONZÁLEZ, C.; MORATA, A. Use of non-saccharomyces yeasts in bottle fermentation of aged beers. In: KANAUCHI, M. (Ed.). **Brewing Technology**. London: InTech, 2017. p. 101–119.

CANONICO, L.; COMITINI, F.; CIANI, M. *Torulaspora delbrueckii* contribution in mixed brewing fermentations with different *saccharomyces cerevisiae* strains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 259, p. 7–13, 2017.

CARR, F. J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The lactic acid bacteria: a literature survey. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 28, n. 4, p. 281–370, 2002.

CARVALHO, G. B.; SILVA, D. P.; BENTO, C. V.; VICENTE, A. A.; TEIXEIRA, J. A.; GRAÇAS, A. F. Maria das; SILVA, J. B. A. e. Banana as adjunct in beer production: Applicability and performance of fermentative parameters. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 155, n. 1-3, p. 53–62, 2009.

CARVALHO, G. B. M. de. **Obtenção de cerveja usando banana como adjunto e aromatizante**. 2009. 163 f. Tese (Doutorado em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Conversão de Biomassa) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena, 2009.

CASTRO, O. M. **Obtenção de cerveja superconcentrada com a utilização de xarope de milho como adjunto de malte**. 2014. 144 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Conversão de Biomassa) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena, 2014.

COUTINHO, C. A. T. **Fábrica de Cerveja da Guarda Velha / Cervejaria Guarda Velha / Centro Industrial**. 23 maio 2013. Disponível em: <<http://cervisiafilia.blogspot.com.br/2013/05/fabrica-de-cerveja-da-guarda-velha.html>>. Acesso em: 19 mar. 2018.

DAG, O.; DOLGUN, A.; KONAR, N. onewaytests: An r package for one-way tests in independent groups designs. **The R Journal**, v. 10, n. 1, p. 175–199, 2018.

DAVIDOVIC, S. Z.; MILJKOVI, C. M. G.; ANTONOVI, C. D. G.; RAJILIC-STOJANOVI, C. M. D.; DIMITRIJEVIC-BRANKOVI, C. S. I. Water kefir grain as a source of potent dextran producing lactic acid bacteria. **Hemijaska Industrija**, v. 69, n. 6, p. 595–604, 2015.

DORNELLES, A. S.; RODRIGUES, S. Fermentação alcoólica de caldo de cana utilizando grãos de kefir. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 37, n. 3, p. 386–390, 2006.

DUARTE, L. G. R. **Avaliação do emprego de café torrado como aromatizando na produção de cervejas**. 2015. 115 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena, 2015.

D’AVILA, R. F.; LUVIELMO, M. d. M.; MENDONÇA, C. R. B.; JANTZEN, M. M. Adjuntos utilizados para produção de cerveja: características e aplicações. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, v. 8, n. 2, p. 60–68, 2012.

ESSLINGER, H. M. Fermentation, maturation and storage. In: ESSLINGER, H. M. (Ed.). **Handbook of Brewing: processes, technology, markets**. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2009. cap. 8, p. 207–224.

European Brewery Convention. **About the European Brewery Convention**. Disponível em: <<https://europeanbreweryconvention.eu>>. Acesso em: 21 de mar. 2018.

FAO/WHO. Probiotics in food - health and nutritional properties and guidelines for evaluation. **FAO - Food and Nutrition Paper**, 2006. Disponível em: <www.fao.org/3/a-a0512e.pdf>. Acesso em: 20 abr. 2018.

FARNWORTH, E. R. Kefir: from folklore to regulatory approval. **Journal of Nutraceuticals, Functional & Medical Foods**, v. 1, n. 4, p. 57–68, 1999.

FARNWORTH, E. R. Kefir—a complex probiotic. **Food Science and Technology Bulletin: Fu**, IFIS Publishing, v. 2, n. 1, p. 1–17, 2005.

FIORDA, F. A.; PEREIRA, G. V. de M.; THOMAZ-SOCCOL, V.; RAKSHIT, S. K.; SOCCOL, C. R. Evaluation of a potentially probiotic non-dairy beverage developed with honey and kefir grains: fermentation kinetics and storage study. **Food Science and Technology International**, v. 22, n. 8, p. 732–742, 2016.

FIORDA, F. A.; PEREIRA, G. V. de M.; THOMAZ-SOCCOL, V.; RAKSHIT, S. K.; PAGNONCELLI, M. G. B.; VANDENBERGHE, L. P. de S.; SOCCOL, C. R. Microbiological, biochemical, and functional aspects of sugary kefir fermentation—a review. **Food Microbiology**, v. 66, p. 86–95, 2017.

FOX, J.; WEISBERG, S. **An R Companion to Applied Regression**. Second. Thousand Oaks, CA: Sage, 2011.

GAETANO, G. D. et al. Effects of moderate beer consumption on health and disease: a consensus document. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, Elsevier, v. 26, n. 6, p. 443–467, 2016.

GRANATO, D.; CALADO, V. M. de A.; JARVIS, B. Observations on the use of statistical methods in food science and technology. **Food Research International**, v. 55, p. 137–149, 2014.

- GROEMPING, U. **DoE.wrapper: Wrapper Package for Design of Experiments Functionality**. Berlin, 2017. R package version 0.9. Disponível em: <<https://CRAN.R-project.org/package=DoE.wrapper>>. Acesso em: 23 jun. 2018.
- GULITZ, A.; STADIE, J.; WENNING, M.; EHRMANN, M. A.; VOGEL, R. F. The microbial diversity of water kefir. **International Journal of Food Microbiology**, v. 151, n. 3, p. 284–288, 2011.
- GULITZ, A. J. **Analysis of the diversity of water kefir microbiota by culture-dependent and-independent approaches**. 2013. 136 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Ciências do Centro Weihenstephan para Nutrição, Uso do Solo e Ambiente, Universidade Técnica de Munique, Munique, 2013.
- HAGEN-SCHOW, A. Pure yeast and fermentation. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 3, n. 6, p. 122–138, 1890.
- HUGES, P. Identification of taste-and aroma-active components of beer. In: PREEDY, V. (Ed.). **Beer in health and disease prevention**. 1. ed. San Diego: Academic Press, 2009. p. 227–238.
- KEUKELEIRE, D. D. Fundamentals of beer and hop chemistry. **Química Nova**, v. 23, n. 1, p. 108–112, 2000.
- KLEIN, G.; PACK, A.; BONAPARTE, C.; REUTER, G. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 103–125, 1998.
- KOUTINAS, A.; ATHANASIADIS, I.; BEKATOROU, A.; ICONOMOPOULOU, M.; BLEKAS, G. Kefir yeast technology: scale-up in scp production using milk whey. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 89, n. 7, p. 788–796, 2005.
- KROTTENTHALER, M. Hops. In: ESSLINGER, H. M. (Ed.). **Handbook of Brewing: processes, technology, markets**. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2009. cap. 3, p. 85–104.
- KROTTENTHALER, M.; GLAS, K. Brew water. In: ESSLINGER, H. M. (Ed.). **Handbook of Brewing: processes, technology, markets**. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2009. cap. 4, p. 105–118.
- KROTTENTHALER, W. B. M.; ZARNKOW, M. Wort production. In: ESSLINGER, H. M. (Ed.). **Handbook of Brewing: processes, technology, markets**. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2009. cap. 7, p. 165–205.
- LAUREYS, D.; CNOCKAERT, M.; VUYST, L. D.; VANDAMME, P. Bifidobacterium aquikefiri sp. nov., isolated from water kefir. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 3, p. 1281–1286, 2016.
- LAUREYS, D.; JEAN, A. V.; DUMONT, J.; VUYST, L. D. 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, 2017.

- LAUREYS, D.; VUYST, L. D. Microbial species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of water kefir fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 8, p. 2564–2572, 2014.
- LAUREYS, D.; VUYST, L. D. 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, 2017.
- LENTH, R. V. Response-surface methods in R, using rsm. **Journal of Statistical Software**, v. 32, n. 7, p. 1–17, 2009.
- MACORIS, M. S.; JANZANTTI, N. S.; GARRUTI, D. d. S.; MONTEIRO, M. Volatile compounds from organic and conventional passion fruit (*passiflora edulis* f. *flavicarpa*) pulp. **Food Science and Technology**, v. 31, n. 2, p. 430–435, 2011.
- MAGALHÃES, K. T.; PEREIRA, G. d. M.; DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F. Microbial communities and chemical changes during fermentation of sugary brazilian kefir. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 7, p. 1241–1250, 2010.
- MARTÍNEZ-TORRES, A.; GUTIÉRREZ-AMBROCIO, S.; ORBE, P. Heredia-del; VILLA-TANACA, L.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C. Inferring the role of microorganisms in water kefir fermentations. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 52, n. 2, p. 559–571, 2017.
- MEUSSDOERFFER, F.; ZARNKOW, M. Starchy raw materials. In: ESSLINGER, H. M. (Ed.). **Handbook of Brewing: processes, technology, markets**. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2009. cap. 2, p. 43–83.
- MEUSSDOERFFER, F. G. A comprehensive history of beer brewing. In: ESSLINGER, H. M. (Ed.). **Handbook of Brewing: processes, technology, markets**. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2009. cap. 1, p. 1–42.
- MIGUEL, M. G. d. C. P.; CARDOSO, P. G.; MAGALHÃES, K. T.; SCHWAN, R. F. 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, 2011.
- MONCHOIS, V.; WILLEMOT, R.-M.; MONSAN, P. Glucansucrases: mechanism of action and structure–function relationships. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 23, n. 2, p. 131–151, 1999.
- MONSAN, P.; BOZONNET, S.; ALBENNE, C.; JOUCLA, G.; WILLEMOT, R.-M.; REMAUD-SIMÉON, M. Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 9, p. 675–685, 2001.
- MULLER, R. A mathematical model of the formation of fermentable sugars from starch hydrolysis during high-temperature mashing. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n. 3-5, p. 337–344, 2000.
- NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como Fazer Experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Porto Alegre: Bookman Editora, 2010.

NUNES, C. d. S. O.; CARVALHO, G. B. M. de; SILVA, M. L. C. da; SILVA, G. P. da; MACHADO, B. A. S.; UETANABARO, A. P. T. Cocoa pulp in beer production: applicability and fermentative process performance. **PLOS ONE**, v. 12, n. 4, p. 1–21, 2017.

OETTERER, M.; ALCARDE, A. R. Tecnologia da fabricação de cerveja. In: **Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos**. São Paulo: Editora Manole Ltda, 2006. cap. 2, p. 51–98.

OSBURN, K.; AMARAL, J.; METCALF, S. R.; NICKENS, D. M.; ROGERS, C. M.; SAUSEN, C.; CAPUTO, R.; MILLER, J.; LI, H.; TENNESSEN, J. M. et al. Primary souring: a novel bacteria-free method for sour beer production. **Food Microbiology**, v. 70, p. 76–84, 2018.

PALMER, J. J. **How to brew**. 3. ed. Boulder, CO: Brewers Publications, 2006.

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

PUERARI, C.; MAGALHÃES, K. T.; SCHWAN, R. F. New cocoa pulp-based kefir beverages: Microbiological, chemical composition and sensory analysis. **Food Research International**, v. 48, n. 2, p. 634–640, 2012.

R Development Core Team. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. Vienna, Austria, 2008. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: 23 jun. 2018.

RANDAZZO, W.; CORONA, O.; GUARCELLO, R.; FRANCESCA, N.; GERMANA, M. A.; ERTEN, H.; MOSCHETTI, G.; SETTANNI, L. Development of new non-dairy beverages from mediterranean fruit juices fermented with water kefir microorganisms. **Food Microbiology**, v. 54, p. 40–51, 2016.

RODRIGUES, K. L.; ARAÚJO, T. H.; SCHNEEDORF, J. M.; FERREIRA, C. de S.; MORAES, G. d. O. I.; COIMBRA, R. S.; RODRIGUES, M. R. A novel beer fermented by kefir enhances anti-inflammatory and anti-ulcerogenic activities found isolated in its constituents. **Journal of Functional Foods**, v. 21, p. 58–69, 2016.

RODRIGUES, K. L.; CAPUTO, L. R. G.; CARVALHO, J. C. T.; EVANGELISTA, J.; SCHNEEDORF, J. M. Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 25, n. 5, p. 404–408, 2005.

ROGERS, C. M.; VEATCH, D.; COVEY, A.; STATON, C.; BOCHMAN, M. L. Terminal acidic shock inhibits sour beer bottle conditioning by *saccharomyces cerevisiae*. **Food Microbiology**, v. 57, p. 151–158, 2016.

ROSA, N. A.; AFONSO, J. C. A química da cerveja. **Química Nova**, v. 37, n. 2, p. 98–105, 2015.

ROSS, R. P.; MORGAN, S.; HILL, C. Preservation and fermentation: past, present and future. **International Journal of Food Microbiology**, v. 79, n. 1-2, p. 3–16, 2002.

RStudio Team. **RStudio: Integrated Development Environment for R**. Boston, MA, 2015. Disponível em: <<http://www.rstudio.com/>>. Acesso em: 23 jun. 2018.

SAKAMOTO, K.; KONINGS, W. N. Beer spoilage bacteria and hop resistance. **International Journal of Food Microbiology**, v. 89, n. 2-3, p. 105–124, 2003.

SANTOS, C. D. de O. **Avaliação do emprego de arroz preto (*Oryza sativa* L.) submetido a hidrólise enzimática como adjunto na fabricação de cerveja**. 2011. 75 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena, 2011.

SCHNEEDORF, J. M. Kefir d'aqua and its probiotic properties. In: RIGOBELLO, E. (Ed.). **Probiotic in Animals**. London: Intech, 2012. cap. 3, p. 53–76.

SHUKLA, R.; SHUKLA, S.; BIVOLARSKI, V.; ILIEV, I.; IVANOVA, I.; GOYAL, A. Structural characterization of insoluble dextran produced by *Leuconostoc mesenteroides* nrrl b-1149 in the presence of maltose. **Food Technology and Biotechnology**, v. 49, n. 3, p. 291–296, 2011.

SPITAELS, F.; WIEME, A. D.; JANSSENS, M.; AERTS, M.; DANIEL, H.-M.; LANDSCHOOT, A. V.; VUYST, L. D.; VANDAMME, P. The microbial diversity of traditional spontaneously fermented lambic beer. **PLOS ONE**, v. 9, n. 4, p. 1–13, 2014.

STADIE, J. **Metabolic activity and symbiotic interaction of bacteria and yeasts in water kefir**. 2013. 125 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Ciências do Centro Weihenstephan para Nutrição, Uso do Solo e Ambiente, Universidade Técnica de Munique, Munique, 2013.

STADIE, J.; GULITZ, A.; EHRMANN, M. A.; VOGEL, R. F. Metabolic activity and symbiotic interactions of lactic acid bacteria and yeasts isolated from water kefir. **Food Microbiology**, v. 35, n. 2, p. 92–98, 2013.

STRONG, G.; ENGLAND, K. (Ed.). **Beer Style Guidelines**. St Louis Park, MN: Beer Judge Certification Program, 2015.

SUZUKI, K. 125th anniversary review: microbiological instability of beer caused by spoilage bacteria. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 117, n. 2, p. 131–155, 2011.

SUZUKI, K.; IIJIMA, K.; SAKAMOTO, K.; SAMI, M.; YAMASHITA, H. A review of hop resistance in beer spoilage lactic acid bacteria. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 112, n. 2, p. 173–191, 2006.

TAYLOR, B.; ORGAN, G. Sensory evaluation. In: ESSLINGER, H. M. (Ed.). **Handbook of Brewing: processes, technology, markets**. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA, 2009. cap. 29, p. 670–702.

TEIXEIRA, L. V. Análise sensorial na indústria de alimentos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 64, n. 366, p. 12–21, 2009.

TONSMEIRE, M. **American sour beer**: innovative techniques for mixed fermentations. Boulder, CO: Brewers Publications, 2014.

VENTURINI, V. G. F.; CEREDA, M. P. Cerveja. In: AQUARONE, E.; BORZANI, W.; NETTO, W. S.; LIMA, U. de A. (Ed.). **Biotecnologia industrial**: biotecnologia na produção de alimentos. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. p. 91–144.

VERBELEN, P.; DEKONINCK, T.; SAERENS, S.; MULDER, S. V.; THEVELEIN, J.; DELVAUX, F. Impact of pitching rate on yeast fermentation performance and beer flavour. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, n. 1, p. 155–167, 2009.

VERSTREPEN, K. J.; DERDELINCKX, G.; DUFOUR, J.-P.; WINDERICKX, J.; THEVELEIN, J. M.; PRETORIUS, I. S.; DELVAUX, F. R. Flavor-active esters: adding fruitiness to beer. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 96, n. 2, p. 110–118, 2003.

VRIESEKOP, F.; KRAHL, M.; HUCKER, B.; MENZ, G. 125th anniversary review: Bacteria in brewing: The good, the bad and the ugly. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 118, n. 4, p. 335–345, 2012.

WALDHERR, F. W.; DOLL, V. M.; MEISSNER, D.; VOGEL, R. F. 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, 2010.

YEO, H. Q.; LIU, S.-Q. An overview of selected specialty beers: Developments, challenges and prospects. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 49, n. 7, p. 1607–1618, 2014.

ZENEBON, O.; PASCUET, N.; TIGLEA, P. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**: métodos químicos e físicos para a análise de alimentos. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.