



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Rafael Amadeu Barreto

Avaliação do uso de grãos de kefir para a realização do *kettle sour* em
mosto cervejeiro

São José do Rio Preto – SP

2022

Rafael Amadeu Barreto

Avaliação do uso de grãos de kefir para a realização do *kettle sour* em
mosto cervejeiro

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como parte dos requisitos para
obtenção do título de Bacharel, junto ao
Conselho de Curso de Bacharelado em
Ciências Biológicas, do Instituto de
Biociências, Letras e Ciências Exatas da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Campus de São José do
Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Vanildo Luiz Del
Bianchi

Co-orientadores: Me. Igor Silva de Sá; Ma.
Mariana Dâmaris de Oliveira

São José do Rio Preto – SP

2022

Barreto, Rafael Amadeu
Avaliação do uso de grãos de kefir para a realização do *kettle*
B273a *sour* em mosto cervejeiro / Rafael Amadeu Barreto. – São José do Rio
Preto, 2022.
f. : 35 il. 17, tabs. 6.

Orientador: Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi.
Coorientadores: Me. Igor Silva de Sá, Ma. Mariana Dâmaris
de Oliveira.

Trabalho de conclusão (Bacharelado – Ciências Biológicas) –
Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências,
Letras e Ciências Exatas.

1. Microbiologia. 2. Microbiologia Aplicações Industriais.
I. Título.

Rafael Amadeu Barreto

Avaliação do uso de grãos de kefir para a realização do *kettle sour* em
mosto cervejeiro

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Bacharel, junto ao Curso de Graduação
em Ciências Biológicas, do Instituto de
Biociências, Letras e Ciências Exatas da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio
Preto.

Banca examinadora

Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi
UNESP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Guilherme Lorencini Schuina
Universidade Estadual de Maringá

Ma. Jéssica Carolina Gomes da Silva
AQIA Química Inovativa

São José do Rio Preto – SP

14/janeiro/2022

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por ter me dado forças durante esta graduação.

Agradeço ao Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi pela orientação, pela oportunidade de realizar este trabalho e por todo o incentivo, desde que enviei o primeiro e-mail. Em especial, pelas inúmeras ideias, questionamentos e soluções que me fizeram perceber que pesquisar não se trata apenas da busca por respostas, mas sim por novas perguntas e, conseqüentemente, aprendizado e conhecimento. Sou grato pelos momentos em que pudemos reunirmo-nos, com muita alegria, com mais integrantes do Laboratório de Bioprocessos.

Aos meus coorientadores, Igor e Mariana, por fazerem me sentir parte do laboratório logo na minha primeira visita. Agradeço pelo conhecimento compartilhado e pela paciência e disponibilidade de me auxiliarem, mesmo à distância, nos momentos em que precisei. Lembro com carinho de todo o incentivo nos momentos mais difíceis tanto quanto ao trabalho como nos pessoais. Expresso também a minha gratidão a todos os integrantes do Laboratório de Bioprocessos.

Aos meus amados pais e irmã, Alessandro, Josiane e Camila, agradeço imensamente por sempre terem acreditado no meu potencial, me apoiarem e aconselharem em minhas decisões. Sou muito grato pela oportunidade que me deram de focar totalmente em meus estudos. Um muito obrigado especial para meus avós, Sidnei e Laura, que sempre me incentivaram nos estudos e proporcionaram condições melhores para isso.

À minha tia-avó Marilei que, mesmo antes de ingressar na universidade, conversava durante horas comigo em cada visita à sua casa, auxiliando muito em minhas escolhas e sendo uma grande inspiração para tentar ingressar e me formar em uma universidade. Hoje, me encontro quase formado pela UNESP – São José do Rio Preto, campus onde ela realizou sua graduação.

RESUMO

Este trabalho promove o uso de grãos de kefir para a acidificação do mosto cervejeiro pelo método *kettle sour*. Os grãos são um consórcio de microrganismos, entre leveduras, bactérias ácido-láticas (BALs) e acéticas, no qual as BALs, de espécies e gêneros distintos, se apresentam como principais constituintes. O *kettle sour* consiste no inóculo de BALs no mosto pré-fervura para que realizem a acidificação desse, mas após esse período, que dura entre 24 e 72 horas sob uma temperatura próxima a 37°C, o mosto é fervido e esses microrganismos são “perdidos”. O uso dos grãos de kefir permite a acidificação e sua retirada do mosto antes da fervura por conta da sua conformação aglutinada de microrganismos, possivelmente permitindo o seu reuso para futuras aplicações.

Palavras-chave: bactérias ácido-láticas; acidificação; cerveja; cerveja *sour*

ABSTRACT

This study promotes the kefir grains use to acidificate the brewing wort by the kettle sour method. These grains are a microorganisms consortium, among yeasts, latic-acid and acetic bacterias, whereupon the latic-acid bacterias, of different species and genders, present themselves as the main constituents. The kettle sour method consists of the latic-acid bacterias inoculum in the pre-boil wort so they carry on the acidification of this, but after this period, that lasts between 24 and 72 hours, at 37°C, the wort is boiled and these microorganisms are lost. The kefir grains use allows the wort acidification and your removal before the boiling due to its agglutinated microorganism conformation, possibly allowing its reuse for future applications.

Keywords: latic acid bacteria; acidification; beer; sour beer

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Esquema dos ensaios realizados para a avaliação do kettle sour por grãos de kefir em mosto cervejeiro.....	17
Figura 2	Ensaio contendo 30g de kefir sem controle de temperatura (Erlenmeyer à esquerda) e a 37°C (Erlenmeyer à direita). As figuras 2.1, 2.2 e 2.3 mostram os ensaios em seu momento inicial, após 24h e após 72h, respectivamente.	17
Figura 3	Gráfico comparativo de °Brix entre os ensaios, sob diferentes temperaturas, contendo 10 g de grãos de kefir.	26
Figura 4	Gráfico comparativo de °Brix entre os ensaios, sob diferentes temperaturas, contendo 20 g de grãos de kefir.	26
Figura 5	Gráfico comparativo de °Brix entre os ensaios, sob diferentes temperaturas, contendo 30 g de grãos de kefir.	27
Figura 6	Gráfico comparativo de pH entre os ensaios, sob diferentes temperaturas, contendo 10 g de grãos de kefir.	27
Figura 7	Gráfico comparativo de pH entre os ensaios, sob diferentes temperaturas, contendo 20 g de grãos de kefir.	28
Figura 8	Gráfico comparativo de pH entre os ensaios, sob diferentes temperaturas, contendo 30 g de grãos de kefir.	28
Figura 9	Gráfico comparativo de acidez total titulável entre os ensaios, sob diferentes temperaturas, contendo 10 g de grãos de kefir.	29
Figura 10	Gráfico comparativo de acidez total titulável entre os ensaios, sob diferentes temperaturas, contendo 20 g de grãos de kefir.	29
Figura 11	Gráfico comparativo de acidez total titulável entre os ensaios, sob diferentes temperaturas, contendo 30 g de grãos de kefir.	30
Figura 12	Gráfico comparativo de °Brix entre os ensaios sem controle de temperatura e com diferentes concentrações de grãos de kefir.	30
Figura 13	Gráfico comparativo de pH entre os ensaios sem controle de temperatura e com diferentes concentrações de grãos de kefir.	31

Figura 14	Gráfico comparativo de acidez total titulável entre os ensaios sem controle de temperatura e com diferentes concentrações de grãos de kefir.....	31
Figura 15	Gráfico comparativo de °Brix entre os ensaios a 37°C e com diferentes concentrações de grãos de kefir.....	32
Figura 16	Gráfico comparativo de pH entre os ensaios a 37°C e com diferentes concentrações de grãos de kefir.....	32
Figura 17	Gráfico comparativo de acidez total titulável entre os ensaios a 37°C e com diferentes concentrações de grãos de kefir.	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	°Brix do mosto cervejeiro após o inóculo de diferentes massas de grãos de kefir, em ensaios diferentes, durante o período de 72 horas sem controle de temperatura.....	18
Tabela 2	°Brix do mosto cervejeiro após o inóculo de diferentes massas de grãos de kefir, em ensaios diferentes, durante o período de 72 horas a 37°C.	19
Tabela 3	pH do mosto cervejeiro após o inóculo de diferentes massas de grãos de kefir, em ensaios diferentes, durante o período de 72 horas sem controle de temperatura.....	20
Tabela 4	pH do mosto cervejeiro após o inóculo de diferentes massas de grãos de kefir, em ensaios diferentes, durante o período de 72 horas a 37°C.	20
Tabela 5	Acidez titulável (g/L de ácido láctico) do mosto cervejeiro após o inóculo de diferentes massas de grãos de kefir, em ensaios diferentes, durante o período de 72 horas sem controle de temperatura.	21
Tabela 6	Acidez titulável (g/L de ácido láctico) do mosto cervejeiro após o inóculo de diferentes massas de grãos de kefir, em ensaios diferentes, durante o período de 72 horas a 37°C.	21

SUMÁRIO

1. Introdução	10
2. Revisão bibliográfica.....	11
2.1. Cervejas <i>Sour</i>	11
2.2. Grãos de kefir.....	13
2.3. Bactérias ácido-láticas	13
3. Material e métodos	15
3.1. Grãos de kefir.....	15
3.2. Avaliação do <i>kettle sour</i> em mosto cervejeiro	15
3.3. Análise dos resultados	17
4. Resultados e discussão	18
4.1. Sólidos solúveis (°Brix).....	18
4.2. pH.....	19
4.3. Acidez total titulável	20
5. Conclusão	21
REFERÊNCIAS.....	23
APÊNDICES	26
APÊNDICE A: GRÁFICOS DOS RESULTADOS OBTIDOS COM AS ANÁLISES DE <i>KETTLE SOUR</i> DE MOSTO CERVEJEIRO POR GRÃOS DE KEFIR.	26

1. Introdução

De acordo com a legislação brasileira (BRASIL, 2009), a cerveja é uma bebida que resulta da fermentação do mosto de malte de cevada ou extrato de malte, submetido a um processo de cocção com a adição de lúpulo ou extrato de lúpulo, a partir de levedura cervejeira. A lei ainda infere que parte do malte de cevada ou extrato de malte pode ser substituída por adjuntos cervejeiros, desde que seu emprego não ultrapasse 45% do peso em relação ao extrato primitivo da bebida.

A cerveja é uma bebida milenar e seu consumo perdura até os dias atuais. Muito se discute sobre o início da prática da produção da bebida, mas não se sabe ao certo onde ela se tornou popular. Há indícios de que a produção e o consumo da bebida tornou-se comum por volta de 3500 A.C., na região da Mesopotâmia, e também ganhou popularidade nas regiões do Oriente Médio e Antigo Egito.

Inicialmente a cerveja era apenas um fermentado de água e cereais, mas, com o passar dos séculos, descobriu-se que a adição de lúpulos e especiarias melhoravam as características da bebida. Após a descoberta, o lúpulo passou a ser difundido como um dos ingredientes essenciais e, em 1516, a Lei da Pureza Alemã decretou que a cerveja é uma bebida composta por água, malte de cevada, lúpulo e levedura.

Atualmente existem grandes cervejarias que têm importante influência no comércio internacional de bebidas, atuando principalmente na produção das cervejas chamadas de “comerciais”. No entanto, nos últimos anos, microcervejarias estão se consolidando no mercado ao redor do mundo e, com isso, existe o aumento do consumo das cervejas artesanais, muito distintas das comerciais, que são produzidas com ingredientes diversificados e apresentam inúmeros estilos que diferem em suas características organolépticas.

Entre tantos estilos, existe o das chamadas cervejas *Sour*. Esse estilo é composto por cervejas que apresentam acidez, que pode ir de leve a intensa, e geralmente baixo amargor no paladar.

Para conferir acidez às bebidas, diferentes técnicas podem ser utilizadas na produção dessas cervejas, das quais o *kettle sour* ganha destaque em função da maior facilidade do manejo e da velocidade para se obter resultado. Nessa técnica, são inoculadas bactérias ácido-láticas (BAL) - comumente do gênero *Lactobaccillus* - no mosto pré-fervura, ou seja, ainda sem a adição de lúpulos, durante um período entre 24 e 72 horas, para que os microrganismos consumam parte dos açúcares presentes no mosto

e produzam ácido-lático, produto metabólico que resultará na acidez da cerveja. No entanto, as bactérias inoculadas não podem ser reaproveitadas, uma vez que esses microrganismos são indesejados nas seguintes fases da produção da bebida e são inativados sob as altas temperaturas da fervura.

Pensando nisso, foi estudada a possibilidade do uso de grãos de kefir para a realização do *kettle sour*, tendo em vista que sua massa é composta por leveduras e, principalmente, bactérias ácido-láticas do gênero *Lactobaccillus*. Os grãos, diferentemente das culturas puras de bactérias ácido-láticas que podem ser inoculadas no mosto, são retirados facilmente do meio antes da fervura, possibilitando a reutilização em uma próxima brassagem.

Portanto, o trabalho visou avaliar a viabilidade do uso de grãos de kefir para a realização do *kettle sour* em mosto cervejeiro.

2. Revisão bibliográfica

2.1. Cervejas Sour

As cervejas ácidas não são restritas a apenas um estilo, apesar de apresentarem características comuns entre as bebidas deste tipo, das quais destaca-se o sabor ácido, comumente de ácido lático, resultado de uma bebida com pH mais baixo que o das tradicionais, em que a produção é normalmente realizada com o uso de culturas mistas de microrganismos (bactérias e leveduras) (BOSSAERT et al., 2019; DYSSVIK et al., 2019).

Na indústria cervejeira, existe uma grande preocupação com a higienização correta do ambiente e dos utensílios para evitar que microrganismos, além dos desejados, contaminem qualquer etapa da produção da cerveja. Esses contaminantes interferem muitas vezes acidificando o mosto e/ou provocando uma turbidez indesejada na bebida sendo, por exemplo, as bactérias ácido láticas, acéticas e leveduras do gênero *Brettanomyces* os microrganismos mais comuns atuantes no processo de deterioração da cerveja. No entanto, para as cervejas *sour*, esses microrganismos são utilizados na produção pelo fato de seus metabolismos resultarem em compostos que irão prover algumas das características desejadas para o produto final (BOSSAERT et al., 2019).

O conhecimento e a caracterização de diferentes microrganismos importantes da indústria de alimentos impulsionaram a compreensão das possíveis contribuições e

aplicações deles. No caso das cervejas ácidas, processos diferentes podem ser utilizados para alcançar o resultado esperado (DYSVIK et al., 2019).

As cervejas ácidas mais tradicionais pertencem a família cervejeira Lambic. Estas bebidas são tipicamente produzidas em uma região próxima a Bruxelas, na Bélgica, e demandam muito tempo até serem comercializadas, pois sua produção leva de um a três anos para ser finalizada. Estas cervejas são produtos da fermentação espontânea do mosto que fica exposto ao ambiente para que os microrganismos ali presentes realizem a fermentação, sem adição prévia de qualquer outra cultura (SPITAEELS et al., 2014). Ao longo do período da fermentação do mosto, ocorre um processo de sucessão microbiológica e o caráter ácido é proveniente de diferentes leveduras, bactérias ácido-láticas e ácido-acéticas (SPITAEELS et al., 2014; DE ROOS; DE VUYST, 2019).

Outra técnica utilizada para a produção das cervejas ácidas é a fermentação por culturas mistas, que consiste no inóculo de uma cultura de leveduras, convencionais ou não, e outra de bactérias ácido-láticas, normalmente *Lactobacillus* spp. ou *Pediococcus* spp., em um mosto pós-fervura com baixa carga de lúpulo (BOSSAERT et al., 2019). A produção de cervejas pelo uso dessa técnica leva em torno de 7 a 8 semanas, porém a bebida pode ser levada a barris de madeira contendo leveduras que residem na parede do recipiente para que a cerveja seja maturada e refermentada durante o tempo desejado.

Existe, ainda, uma outra forma de produzir cervejas ácidas que é, normalmente, mais atrativa para as cervejarias artesanais, uma vez que a produção leva menos tempo e o controle de microrganismos é feito com mais facilidade. Essa técnica é chamada *kettle sour* e é caracterizada pela acidificação do mosto pré-fervura pelo inóculo de bactérias ácido-láticas, comumente do gênero *Lactobacillus*. Para realizar o inóculo, o mosto é fervido por poucos minutos para ser esterilizado e, em seguida, resfriado a uma temperatura entre 30 e 40°C, considerada a faixa ótima para os *lactobacilli*, por um período de 24 a 48 horas, ou até a acidez desejada ser alcançada. Após a acidificação, o mosto é submetido à fervura, desta vez com a adição de lúpulos, para cessar a atividade bacteriana e é resfriado para o inóculo de levedura para realizar a fermentação alcoólica. O *kettle sour* é a técnica mais utilizada principalmente por viabilizar a produção de uma cerveja ácida em poucos dias (MACEDO et al., 2008; BOSSAERT et al., 2019; DYSVIK et al., 2019).

As cervejas *sour* são caracterizadas por terem um pH entre 3,0 e 3,9, porém não há um padrão de referência para a acidez total dessas bebidas (DYSVIK et al., 2020). Um estudo de DOMIZIO et al. (2016) avalia a produção de cervejas com leveduras não

convencionais do gênero *Lachancea*, resultando em uma bebida de pH 3,77 e acidez total entre 0,1 e 0,3 g/L de ácido láctico. Já o de ALCINE CHAN et al. (2019) avalia a produção de uma cerveja *sour* com o uso de *L. paracasei* L26 na co-fermentação com a levedura US-05, resultando em uma cerveja com pH 3,62 e 5,25 g/L de ácido láctico.

2.2. Grãos de kefir

O grão de kefir é formado por um consórcio de bactérias ácido-láticas, leveduras e bactérias ácido-acéticas que se relacionam de forma simbiótica e encontram-se envolvidas em uma matriz complexa constituída por componentes proteicos e exopolissacarídeos. As espécies de microrganismos que formam o grão podem variar dependendo de sua origem, forma de cultivo e produção (WITTHUHN; SCHOEMAN; BRITZ, 2004; DIAS; MARTINS; JÚNIOR, 2020).

O kefir tradicional é uma bebida produzida a partir da fermentação do leite pelos microrganismos presentes nos grãos inoculados, porém existe também o kefir de água, bebida na qual o substrato fermentado é composto por uma mistura de água, frutas secas e/ou açúcar. Após o inóculo dos grãos, a fermentação ocorre na temperatura do local em que se encontra durante aproximadamente 3 dias, sem agitação, e o resultado é uma bebida ácida, carbonatada e levemente alcoólica (PLESSAS et al., 2017; LAUREYS et al., 2018). O kefir, para o organismo, apresenta propriedades antimicrobianas, antitumorais, anti-inflamatória, imunomoduladora e antialérgica, além de conter nutrientes que colaboram para a manutenção da homeostase (MAGALHÃES et al., 2011; DIAS; MARTINS; JÚNIOR, 2020).

Para kefir de água, utilizado neste trabalho, o estudo de SOUZA; SILVA (2017) obteve resultados de pH da bebida em açúcar mascavo próximos a 3,5 em um tempo de fermentação entre 18 e 24 horas. A acidez titulável nesse período em solução de açúcar mascavo 5% e a 30°C, dada no estudo em g/L de ácido láctico, foi próxima a 1,9.

2.3. Bactérias ácido-láticas

As BALs, descritas em formas de bacilos ou cocos, podem ser encontradas em conformações diferentes como células simples, dupla, tétrades ou formando cadeias de diferentes comprimentos. Elas compõem um grupo de microrganismos gram-positivos, ácido-tolerantes, não patogênicos, mesófilos ou termófilos, ou seja, com temperatura

ótima de crescimento entre 30 e 37°C ou entre 42 e 50°C, respectivamente. O pH ideal para o metabolismo das BALs é em torno de 5,5 e 5,8. Mas apesar do metabolismo das BALs ser melhor em pH entre 5,5 e 5,8, esses microrganismos também são capazes de crescer em ambientes mais ácidos, com pH próximo a 3,8. Essas bactérias, quanto a sua capacidade de assimilar o oxigênio, podem ser caracterizadas como anaeróbias, anaeróbias facultativas, aeróbias e microaerófilas (LOPES, 2008; FREIRE et al., 2021).

Para a obtenção de energia, as BALs utilizam hexoses e pentoses como matéria-prima para a realização da fermentação (LOPES, 2008; SILVESTRINI; NETO; SANTANA, 2017). Entre gêneros e espécies desses microrganismos, existem diferenças no metabolismo fermentativo pelo qual é produzido o ácido lático. Essas diferenças permitem a caracterização dessas bactérias em homo ou heterofermentativas, fermentadoras exclusivamente de hexoses ou pentoses e hexoses, respectivamente. No metabolismo homofermentativo, a metabolização da glicose pela via glicolítica resulta exclusivamente na produção de ácido lático, ao passo em que na heterofermentativa, pela via oxidativa da pentose, outros produtos além do ácido lático são formados, como o dióxido de carbono, o etanol e/ou o acetato (LOPES, 2008; GIAZZI et al., 2020).

As BALs são amplamente utilizadas na indústria alimentícia por proverem características sensoriais desejáveis a muitos alimentos. Elas produzem diversas enzimas, com ações glicolíticas, lipolíticas e proteolíticas, que colaboram para a modificação de nutrientes em componentes de interesse para alimentos (FREIRE et al., 2021). Além disso, essas bactérias produzem alguns fatores antimicrobianos além do ácido lático e que também irão compor as características organolépticas dos alimentos, como o diacetil, o acetaldeído, alguns ácidos orgânicos e bacteriocinas (PEREIRA; DE SANTANA; DOS SANTOS, 2020; FREIRE et al., 2021). O diacetil em níveis elevados é um problema para a indústria cervejeira, sendo considerado um *off-flavor* quando presente em grandes quantidades e dependendo do estilo da cerveja.

Os grãos de kefir apresentam uma grande diversidade de microrganismos entre leveduras e bactérias, porém as BALs são os microrganismos que são encontrados em maior quantidade neles, correspondendo entre 65 a 80% da massa dos grãos. Dentre essas bactérias, os gêneros mais presentes são os *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Leuconostoc* (DIAS; MARTINS; JÚNIOR, 2020).

3. Material e métodos

3.1. Grãos de kefir

Os grãos de kefir utilizados no experimento foram obtidos por meio de doação local, na região de São José do Rio Preto-SP. Esses grãos foram cultivados, multiplicados e mantidos em solução de açúcar mascavo 10% (p/v) em ambiente sem temperatura controlada.

A cada 72h, a solução de açúcar mascavo era trocada a fim de evitar condições estressantes com relação a disponibilidade de nutrientes para os microrganismos constituintes dos grãos.

Para o preparo da solução, foi adicionado açúcar mascavo na proporção 10% (p/v) em água e essa solução foi levada a uma chapa aquecedora até que levantasse fervura, sendo mantida por 5 minutos nessa condição para a esterilização do meio. Em seguida, ele foi resfriado até uma temperatura próxima a 25°C para o inóculo dos grãos de kefir. Dois litros da solução de açúcar mascavo contendo os grãos foi mantida em um Erlenmeyer de três litros fechado por um tampão de algodão.

3.2. Avaliação do *kettle sour* em mosto cervejeiro

Para realizar a avaliação do *kettle sour* com o inóculo de grãos de kefir, foram realizados seis ensaios em triplicata nos quais foram medidos pH, graus Brix e acidez total titulável (em g/L de ácido láctico) a cada 24 horas durante 72 horas.

O mosto cervejeiro foi preparado com extrato de malte seco adquirido no comércio local na região de São José do Rio Preto-SP. O extrato foi pesado e adicionado à água até que se atingisse 12 °Brix na solução e, em seguida, ela foi levada a uma chapa aquecedora onde, após levantar fervura, permaneceu por 5 minutos para a esterilização do meio e resfriada, até uma temperatura próxima a 25°C, para o posterior inóculo dos grãos de kefir. Uma pequena amostra desse mosto foi retirada para que os valores de pH, acidez total titulável e graus Brix fossem observados. O mosto cervejeiro, então, foi distribuído entre seis Erlenmeyers de modo que todos contivessem 400mL. Vale lembrar que rampas de temperatura, comumente existentes no processo de mosturação da produção de cerveja, não foram necessárias por conta da presença de açúcares fermentáveis no extrato de malte.

Foram pesados 10, 20 e 30 gramas dos grãos de kefir cultivados em açúcar mascavo para inoculá-los no mosto em cada Erlenmeyer tampados com airlock como mostra as figuras “1” e “2”. Destes ensaios, três permaneceram em um ambiente sem controle de temperatura e os outros três a uma temperatura de 37°C, dentro da faixa ótima para o metabolismo das BALs.

A cada 24 horas, pequenas amostras foram retiradas de cada ensaio para a medição e análise do pH, com o uso de um pHmetro, do grau Brix, com o uso de um refratômetro manual, e da acidez total titulável, por meio da titulação de solução padronizada de NaOH 0,1M e sua reação com a fenolftaleína.

Após 72 horas, os grãos de kefir foram retirados dos ensaios com auxílio de uma peneira e foram transferidos para uma solução 10% (p/v) de açúcar mascavo para uma possível reutilização.

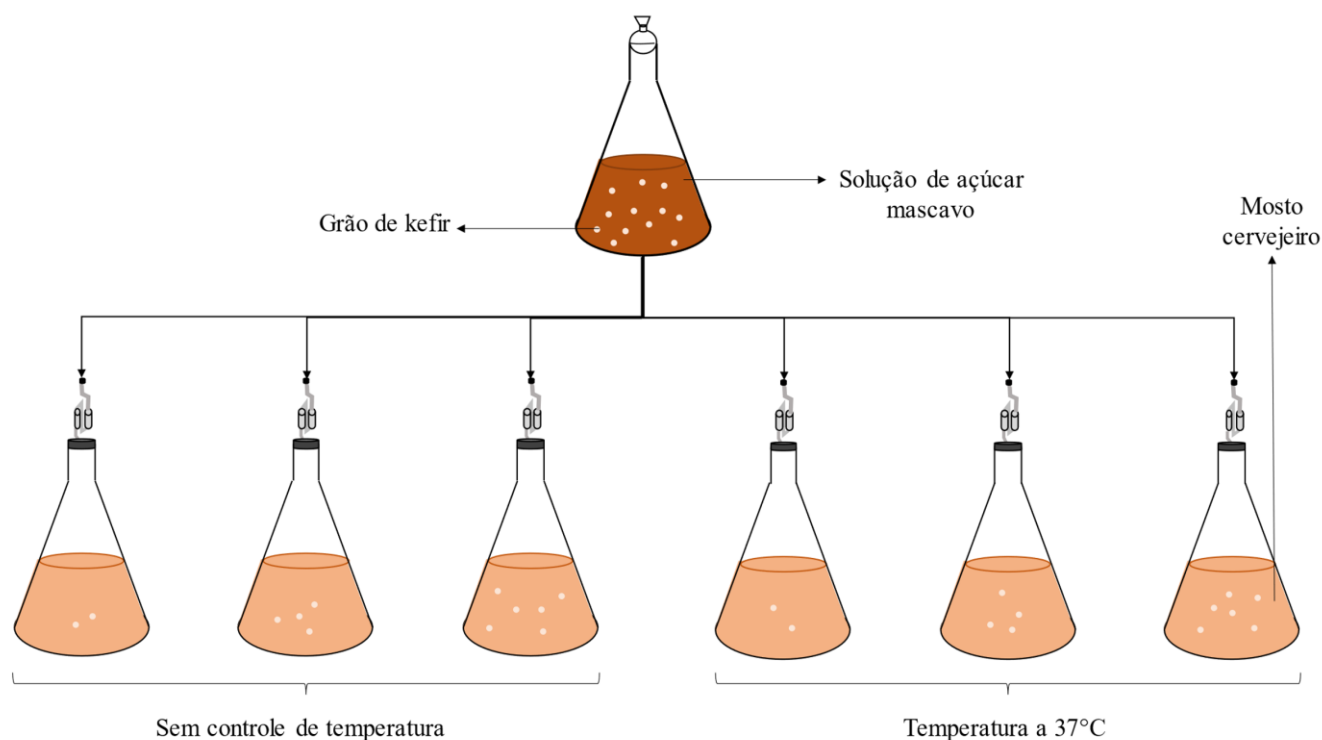


Figura 2 - Esquema dos ensaios realizados para a avaliação do *kettle sour* por grãos de kefir em mosto cervejeiro (Fonte: Próprio autor, 2021).

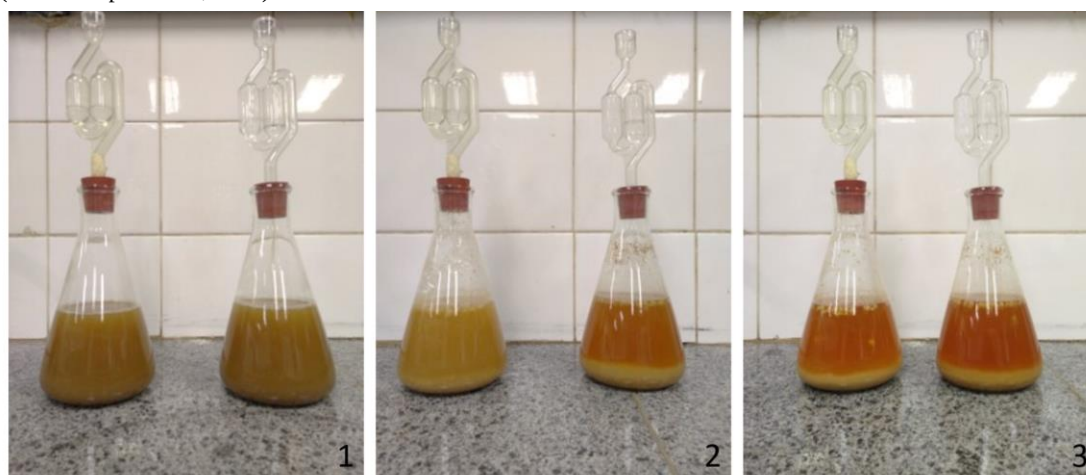


Figura 1 - Ensaios contendo 30g de kefir sem controle de temperatura (Erlenmeyer à esquerda) e a 37°C (Erlenmeyer à direita). As figuras 2.1, 2.2 e 2.3 mostram os ensaios em seu momento inicial, após 24h e após 72h, respectivamente (Fonte: Próprio autor, 2021).

3.3. Análise dos resultados

Para melhor compreensão dos resultados obtidos nos ensaios, foi calculado o desvio-padrão para cada variável de interesse.

No caso do cálculo de acidez total titulável (ATT), a fórmula utilizada foi $ATT = (n \times m \times F \times MM) \div 10 \times V$, onde n = volume de NaOH gasto na titulação (mL); m = mol da solução de NaOH; F = fator de correção da solução de NaOH; MM = massa do

ácido láctico (g); e V = volume utilizado de amostra. O resultado é dado em g/100mL, porém, multiplicou-se por dez para a obtenção do resultado em g/L.

4. Resultados e discussão

4.1. Sólidos solúveis (°Brix)

O monitoramento dos sólidos solúveis no mosto cervejeiro, dados em graus Brix, tornou possível afirmar que os grãos de kefir apresentam microrganismos que foram capazes de assimilar as fontes de carbono presentes no meio. O Brix do mosto apresentou redução mais acentuada quanto maior a massa de kefir inoculada no meio, evidenciando um maior o consumo do açúcar nos ensaios com 30 gramas de grãos de kefir quando comparados aos ensaios com 20 e 10 gramas, ou seja, quanto maior a quantidade de kefir inoculada, mais rápido se deu o consumo de açúcar e isso, provavelmente, se deve ao fato de que há um maior número de microrganismos presentes no meio.

Nos ensaios sem controle de temperatura (Tabela 1), a quantidade de sólidos solúveis diminuiu consideravelmente entre no período entre 24 e 48 horas, provavelmente devido à fase log dos microrganismos. No período entre 48 e 72 horas, observa-se uma maior estabilidade da quantidade de sólidos solúveis do mosto, evidenciando uma queda da atividade fermentativa dos microrganismos.

Já nos ensaios a 37°C (Tabela 2), a atividade fermentativa foi intensa nas primeiras 24 horas e se manteve estável até o tempo de 48 horas, quando a atividade fermentativa parece cessar.

Tabela 1 - °Brix do mosto cervejeiro após o inóculo de diferentes massas de grãos de kefir, em ensaios diferentes, durante o período de 72 horas sem controle de temperatura (Fonte: Próprio autor, 2021).

°Brix (s/ controle de temperatura)		Massa dos grãos de kefir		
		10g	20g	30g
Tempo	0h	12.00	12.00	12.00
	24h	11.25 ± 0.25	11.00 ± 0.50	10.25 ± 0.25
	48h	8.42 ± 0.38	7.92 ± 0.38	7.75 ± 0.25
	72h	7.5 ± 0.25	7.17 ± 0.14	7.08 ± 0.14

Tabela 2 - °Brix do mosto cervejeiro após o inóculo de diferentes massas de grãos de kefir, em ensaios diferentes, durante o período de 72 horas a 37°C (Fonte: Próprio autor, 2021).

°Brix (37°C)		Massa dos grãos de kefir		
		10g	20g	30g
Tempo	0h	12.00	12.00	12.00
	24h	9.83 ± 0.29	9.33 ± 0.58	9.17 ± 0.29
	48h	7.58 ± 0.14	7.25 ± 0.25	7.33 ± 0.14
	72h	7.42 ± 0.14	7.33 ± 0.14	7.17 ± 0.14

4.2. pH

O pH dos ensaios seguiu um padrão semelhante do consumo de sólidos solúveis, tendo sua queda mais acentuada quanto maior a massa de grãos de kefir inoculados. Nos ensaios sem temperatura controlada (Tabela 3), a queda de pH mostrou-se mais acentuada nas primeiras 24 horas do ensaio, mas ela continua, apesar de menor, até o período de 72 horas.

Nos ensaios a 37°C, o pH também apresenta maior queda nas primeiras 24 horas da fermentação, porém ele alcança estabilidade no período de 48 horas, quando a quantidade de sólidos solúveis também se estabiliza. Esse tempo menor para a estabilização dos parâmetros se deve, possivelmente, ao fato de que as BALs atuam melhor nesta faixa de temperatura.

De acordo com LAUREYS et al. (2018), a fermentação por grãos de kefir pode ter início aeróbio e, com o metabolismo das bactérias ácido-acéticas e das leveduras, seguir anaerobicamente por conta do consumo de oxigênio e/ou pela liberação de CO₂ em função do metabolismo fermentativo das leveduras, limitando a atividade das . Portanto, a queda inicial de pH dos ensaios sem controle de temperatura pode ser principalmente pela produção de ácido acético. As bactérias ácido-acéticas são microrganismos mesofílicos, dos quais a temperatura ótima é em torno de 30°C, e normalmente não crescem em temperaturas acima de 34°C (SAICHANA et al., 2015). Sendo assim, nos ensaios a 37°C, o esperado é que não haja produção de ácido acético durante o período de fermentação. A acidificação em diferentes temperaturas por grãos de kefir pode, portanto, promover diferentes características organolépticas para o mosto.

O trabalho de PEYER et al. (2017) avalia o *kettle sour* pelo inóculo de cultura pura de *Lactobacillus amylovorus* FST2.11 em um mosto pré-fervura, a 40°C e durante 18 horas. O pH final da cerveja obtida desse mosto foi de 3,44, próximo ao pH alcançado pelo *kettle sour* por grãos de kefir nos ensaios realizados.

Tabela 3 - pH do mosto cervejeiro após o inóculo de diferentes massas de grãos de kefir, em ensaios diferentes, durante o período de 72 horas sem controle de temperatura (Fonte: Próprio autor, 2021).

pH (s/ controle de temperatura)		Massa dos grãos de kefir		
		10g	20g	30g
Tempo	0h	5.55 ± 0.01	5.55 ± 0.01	5.55 ± 0.01
	24h	4.31 ± 0.15	3.98 ± 0.15	3.80 ± 0.08
	48h	3.61 ± 0.04	3.51 ± 0.03	3.44 ± 0.02
	72h	3.46 ± 0.03	3.40 ± 0.03	3.38 ± 0.04

Tabela 4 - pH do mosto cervejeiro após o inóculo de diferentes massas de grãos de kefir, em ensaios diferentes, durante o período de 72 horas a 37°C (Fonte: Próprio autor, 2021).

pH (37°C)		Massa dos grãos de kefir		
		10g	20g	30g
Tempo	0h	5.55 ± 0.01	5.55 ± 0.01	5.55 ± 0.01
	24h	3.45 ± 0.03	3.40 ± 0.04	3.36 ± 0.04
	48h	3.26 ± 0.04	3.23 ± 0.04	3.19 ± 0.03
	72h	3.27 ± 0.04	3.23 ± 0.25	3.20 ± 0.05

4.3. Acidez total titulável

A acidez titulável do mosto, dada em g/L de ácido láctico, aumentou com a fermentação dos grãos de kefir inoculados e quanto maior a massa inoculada nos ensaios. Sem controle de temperatura, a acidez teve um aumento considerável entre o tempo inicial (0 horas) e 48 horas, mas continuou aumentando até 72 horas.

Nos ensaios a 37°C, a acidez teve seu aumento mais acentuado nas primeiras 24 horas, mas continuou com uma boa geração de ácidos até o tempo de 48 horas. No

entanto, diferentemente dos valores de sólidos solúveis e pH, a acidez não alcançou estabilidade no tempo de 48 horas e continuou aumentando até as 72 horas.

Existem poucos estudos que avaliam a acidez titulável do mosto cervejeiro acidificado pela metodologia *kettle sour*, porém, o trabalho de PEYER et al. (2017) avalia a acidificação pré-fervura do mosto pela BAL *Lactobacillus amylovorus* FST2.11. Após este período, a acidez em g/L de ácido láctico do mosto atingiu o valor de $5,4 \pm 0,2$, valor menor ao atingido por esse estudo, que alcançou valores acima de 7,0 g/L.

Tabela 5 - Acidez titulável (g/L de ácido láctico) do mosto cervejeiro após o inóculo de diferentes massas de grãos de kefir, em ensaios diferentes, durante o período de 72 horas sem controle de temperatura (Fonte: Próprio autor, 2021).

Acidez titulável (s/ controle de temperatura)		Massa dos grãos de kefir		
		10g	20g	30g
Tempo	0h	-	-	-
	24h	$1,47 \pm 0,21$	$1,85 \pm 0,32$	$2,28 \pm 0,28$
	48h	$3,36 \pm 0,42$	$4,04 \pm 0,35$	$4,56 \pm 0,21$
	72h	$4,69 \pm 0,39$	$5,18 \pm 0,32$	$5,64 \pm 0,48$

Tabela 6 - Acidez titulável (g/L de ácido láctico) do mosto cervejeiro após o inóculo de diferentes massas de grãos de kefir, em ensaios diferentes, durante o período de 72 horas a 37°C (Fonte: Próprio autor, 2021).

Acidez titulável (37°C)		Massa dos grãos de kefir		
		10g	20g	30g
Tempo	0h	-	-	-
	24h	$3,76 \pm 0,30$	$4,25 \pm 0,19$	$4,68 \pm 0,11$
	48h	$5,88 \pm 0,19$	$6,35 \pm 0,33$	$6,78 \pm 0,35$
	72h	$6,22 \pm 0,11$	$6,75 \pm 0,28$	$7,33 \pm 0,47$

5. Conclusão

Os testes realizados e a análise dos parâmetros de pH, °Brix e acidez titulável do mosto, permitem afirmar que o uso de grãos de kefir para realização do *kettle sour* em mosto cervejeiro é possível. A temperatura e a massa de grãos inoculada nos ensaios se

mostraram como importantes variáveis para avaliar os resultados do mosto acidificado com a técnica *kettle sour*. Os ensaios mostraram que quanto maior a massa de grãos de kefir inoculados, maior será a quantidade de açúcar consumida em determinado intervalo de tempo, maior a queda do pH e maior acidez titulável. Além disso, os ensaios deixaram evidentes que a temperatura de 37°C, a faixa ótima das BALs, influenciou nos parâmetros analisados tornando a quantidade de açúcar consumida, a queda do pH do meio e a acidez titulável gerada ainda maiores em determinado intervalo de tempo.

Futuros testes para a continuidade desse estudo ainda são necessários, como a quantificação de diacetil produzido pelas BALs por conta de sua possível interferência negativa nas características organolépticas de uma cerveja elaborada com este mosto acidificado. Essa quantificação permitirá uma escolha melhor da levedura para realizar a fermentação primária do mosto, visando uma com menor floculação para que fique por mais tempo em suspensão no mosto e permita um maior consumo do diacetil.

A elaboração de uma cerveja com o mosto acidificado por grãos de kefir se faz necessária, para a avaliação da concentração ideal dos grãos para a produção de uma cerveja *Sour*, assim como a avaliação sensorial do produto para avaliar a percepção de diacetil como *off-flavor* e o sabor dos ácidos láctico e acético.

REFERÊNCIAS

- BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Decreto 6.871 de 4 de julho de 2009. Acesso em: 12 de novembro de 2021.
- ALCINE CHAN, M. Z. et al. Survival of probiotic strain *Lactobacillus paracasei* L26 during co-fermentation with *S. cerevisiae* for the development of a novel beer beverage. **Food Microbiology**, v. 82, n. March, p. 541–550, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.04.001>>.
- BOSSAERT, S. et al. The power of sour - A review: Old traditions, new opportunities. **BrewingScience**, v. 72, n. 3–4, p. 78–88, 2019.
- DE ROOS, J.; DE VUYST, L. Microbial acidification, alcoholization, and aroma production during spontaneous lambic beer production. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, n. 1, p. 25–38, 2019.
- DIAS, W. C.; MARTINS, A. D. de O. M.; JÚNIOR, S. M. Kefir: características e benefícios. **Alimentos: Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente**, v. 1, n. 7, p. p.22-49, 2020.
- DOMIZIO, P. et al. *Lachancea thermotolerans* as an alternative yeast for the production of beer. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 122, n. 4, p. 599–604, 2016.
- DYSVIK, A. et al. Pre-fermentation with lactic acid bacteria in sour beer production. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 125, n. 3, p. 342–356, 2019.
- DYSVIK, A. et al. Microbial Dynamics in Traditional and Modern Sour Beer. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 86, n. 14, p. 1–14, 2020. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/epub/10.1128/AEM.00566-20>>.
- FREIRE, T. T. et al. Bactérias ácido lácticas suas características e importância : revisão Lactic acid bacteria its characteristics and importance : review Bacterias ácido lácticas sus características e importancia : revisión. v. 2021, p. 1–19, 2021.
- GIAZZI, A. et al. Propriedades tecnológicas das bactérias ácido lácticas isoladas na região norte do Paraná. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 4, p. 18861–18877, 2020.
- LAUREYS, D. et al. Oxygen and diverse nutrients influence the water kefir fermentation

process. **Food Microbiology**, v. 73, p. 351–361, 2018.

LOPES, A. R. Produção de ácido láctico em diferentes meios de cultivo. p. 67, 2008.

MACEDO, L. N. et al. Efeito prebiótico do mel sobre o crescimento e viabilidade de *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp. em leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 4, p. 935–942, 2008.

MAGALHÃES, K. T. et al. Brazilian kefir: Structure, microbial communities and chemical composition. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 693–702, 2011.

PEREIRA, M. T.; DE SANTANA, E. H. W.; DOS SANTOS, J. S. Importância das Bactérias Ácido Lácticas e não Starter (NSLAB) na Tecnologia de Produção dos Derivados Lácteos Importance of Lactic Acid and Nonstarter Bacteria (NSLAB) in Dairy Derivatives Production Technology. p. 348–352, 2020.

PEYER, L. C. et al. Sour brewing: Impact of *Lactobacillus amylovorus* FST2.11 on technological and quality attributes of acid beers. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 75, n. 3, p. 207–216, 2017.

PLESSAS, S. et al. Microbiological exploration of different types of Kefir grains. **Fermentation**, v. 3, n. 1, p. 1–10, 2017.

SAICHANA, N. et al. Acetic acid bacteria: A group of bacteria with versatile biotechnological applications. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, p. 1260–1271, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.12.001>>.

SILVESTRINI, R.; NETO, E. S. B.; SANTANA, R. M. C. Influence of temperature on microbiological production of lactic acid from whey. In: Anais do 14º Congresso Brasileiro de Polímeros, Outubro de 2017, Águas de Lindóia, SP.

SOUZA, U. S.; SILVA, M. R. Avaliação de pH, acidez titulável e crescimento de massa colônica de grãos de kefir de água inoculados em extrato hidrossolúvel de arroz (*Oryza sativa*). **Higiene Alimentar**, v. 31, n. 264–265, p. 143–148, 2017.

SPITAELS, F. et al. The microbial diversity of traditional spontaneously fermented lambic beer. **PLOS ONE**, v. 9, n. 4, 2014.

WITTHUHN, R. C.; SCHOEMAN, T.; BRITZ, T. J. Isolation and characterization of the microbial population of different South African kefir grains. **International Journal of**

Dairy Technology, v. 57, n. 1, p. 33–37, 2004.

APÊNDICES

Apêndice A: Gráficos dos resultados obtidos com as análises de *kettle sour* de mosto cervejeiro por grãos de kefir.

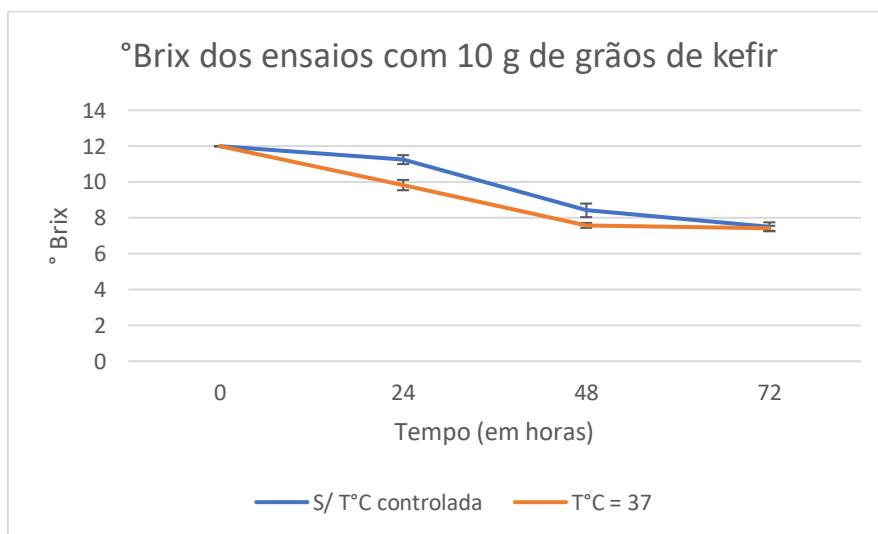


Figura 3 - Gráfico comparativo de °Brix entre os ensaios, sob diferentes temperaturas, contendo 10 g de grãos de kefir (Fonte: Próprio autor, 2022).

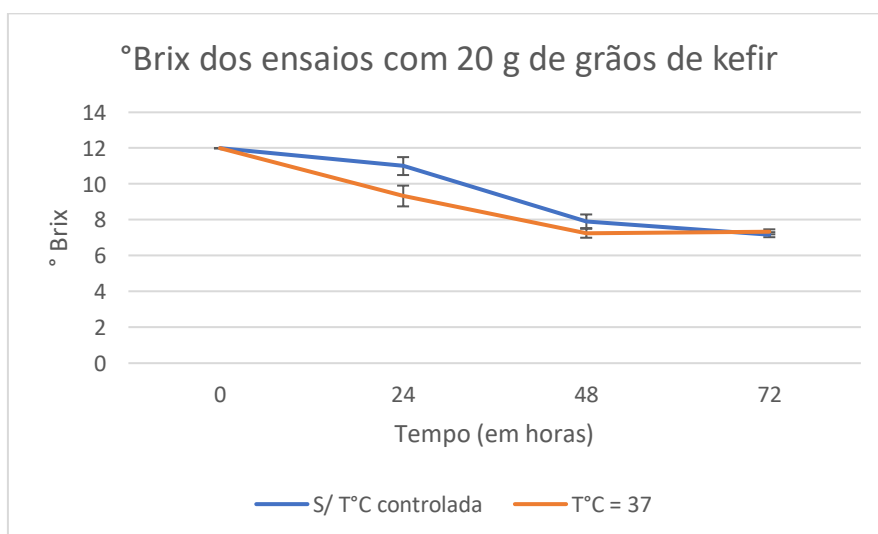


Figura 4 - Gráfico comparativo de °Brix entre os ensaios, sob diferentes temperaturas, contendo 20 g de grãos de kefir (Fonte: Próprio autor, 2022).

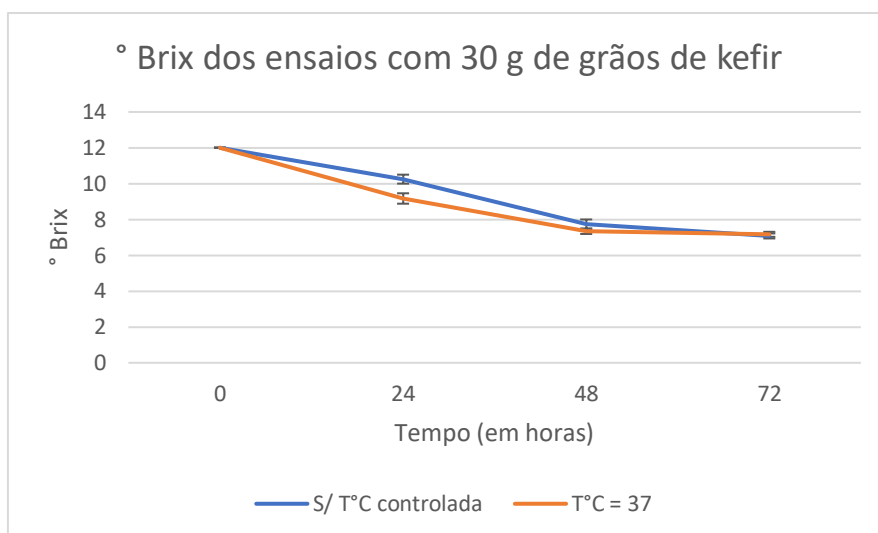


Figura 5 - Gráfico comparativo de °Brix entre os ensaios, sob diferentes temperaturas, contendo 30 g de grãos de kefir (Fonte: Próprio autor, 2022).

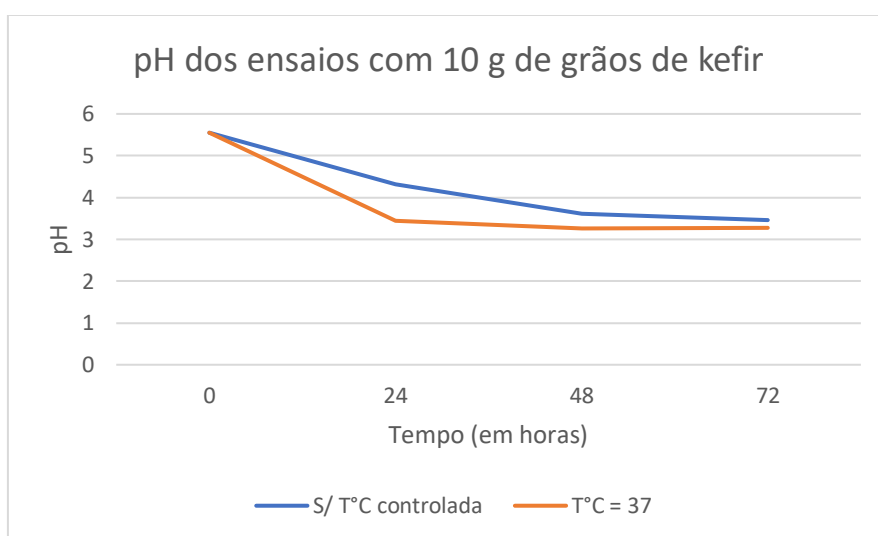


Figura 6 - Gráfico comparativo de pH entre os ensaios, sob diferentes temperaturas, contendo 10 g de grãos de kefir (Fonte: Próprio autor, 2022).

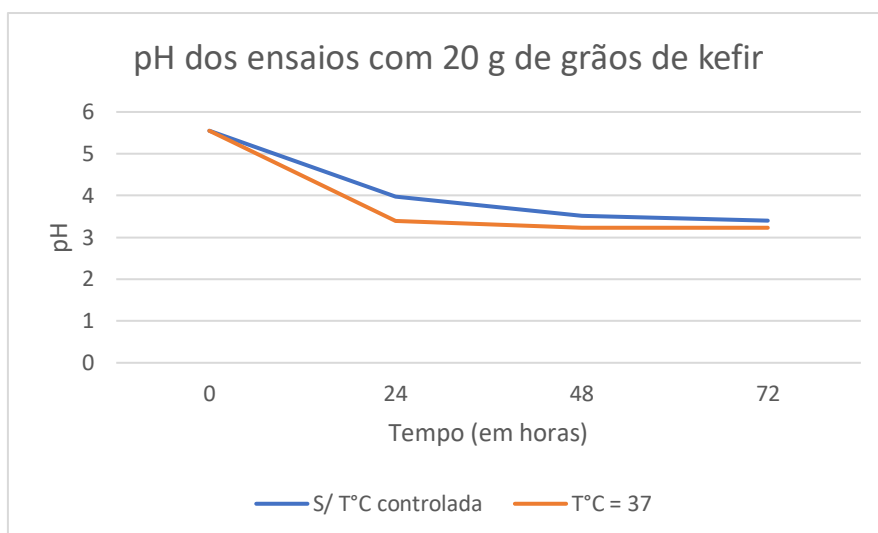


Figura 7 - Gráfico comparativo de pH entre os ensaios, sob diferentes temperaturas, contendo 20 g de grãos de kefir (Fonte: Próprio autor, 2022).

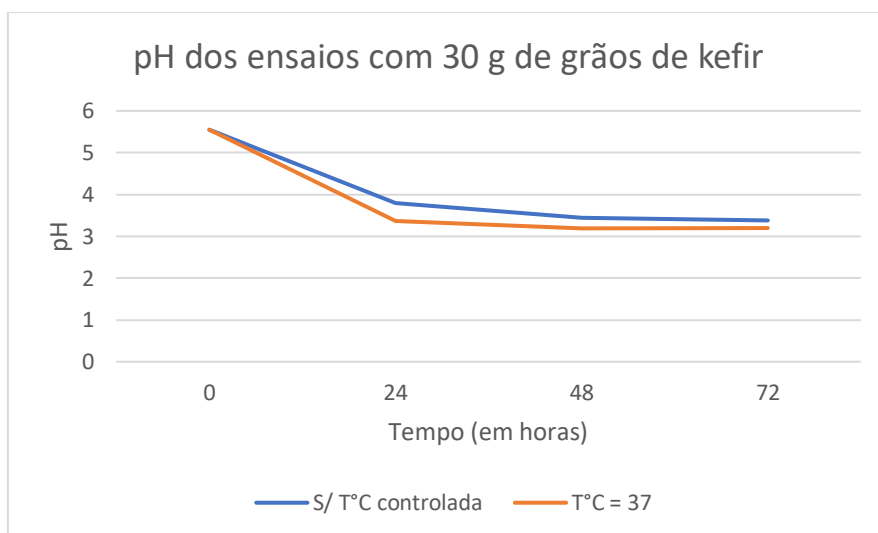


Figura 8 - Gráfico comparativo de pH entre os ensaios, sob diferentes temperaturas, contendo 30 g de grãos de kefir (Fonte: Próprio autor, 2022).

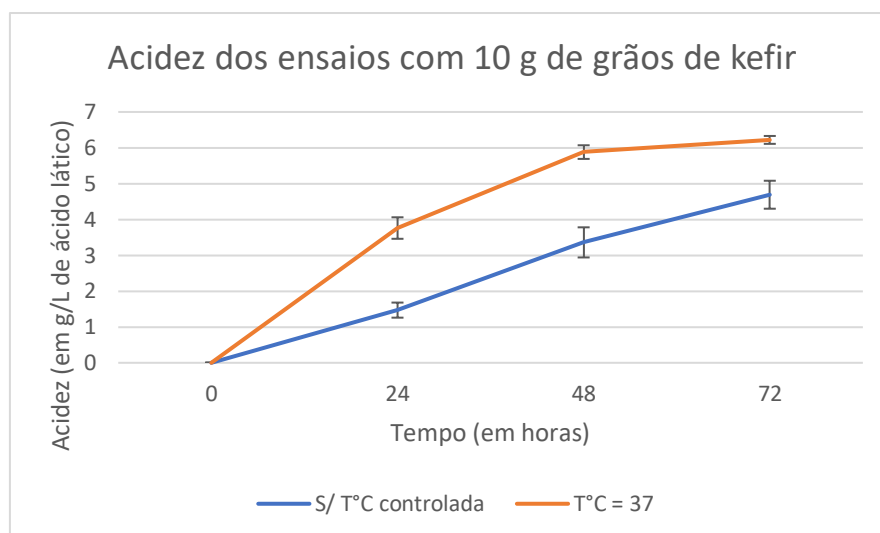


Figura 9 - Gráfico comparativo de acidez total titulável entre os ensaios, sob diferentes temperaturas, contendo 10 g de grãos de kefir (Fonte: Próprio autor, 2022).

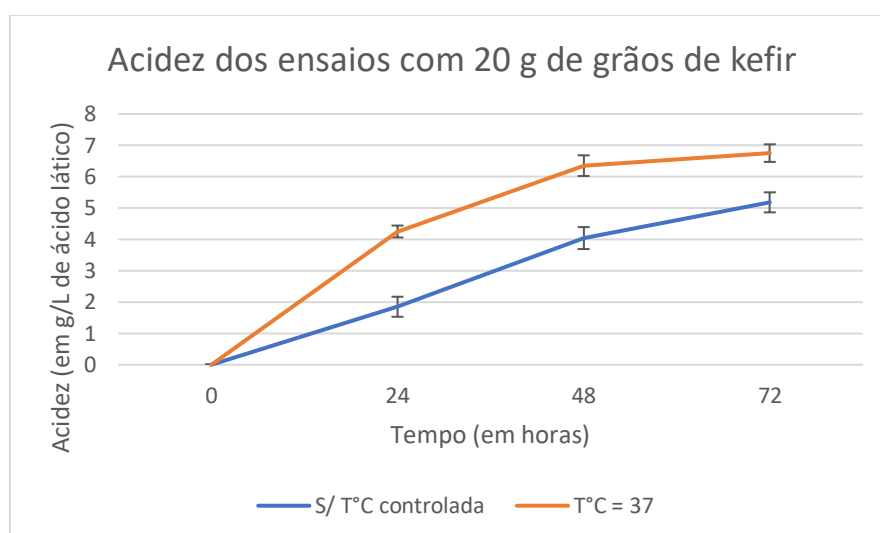


Figura 10 - Gráfico comparativo de acidez total titulável entre os ensaios, sob diferentes temperaturas, contendo 20 g de grãos de kefir (Fonte: Próprio autor, 2022).

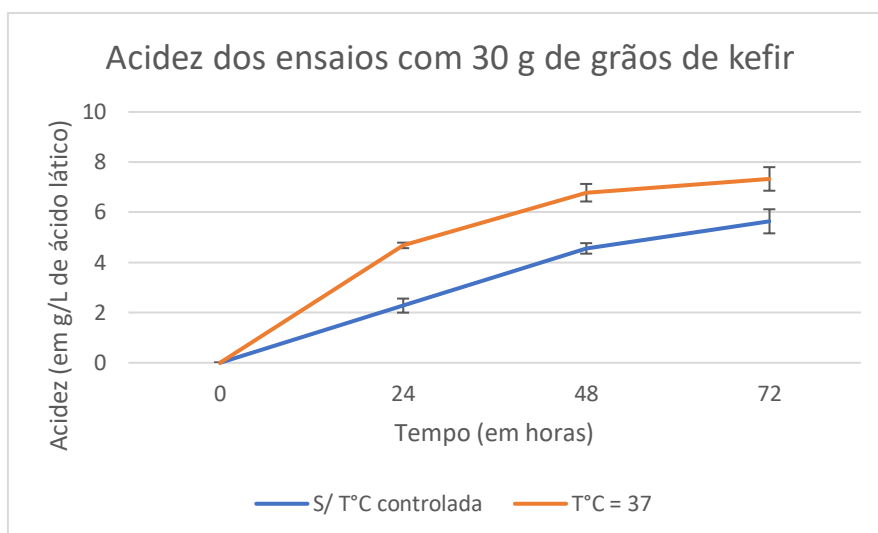


Figura 11 - Gráfico comparativo de acidez total titulável entre os ensaios, sob diferentes temperaturas, contendo 30 g de grãos de kefir (Fonte: Próprio autor, 2022).

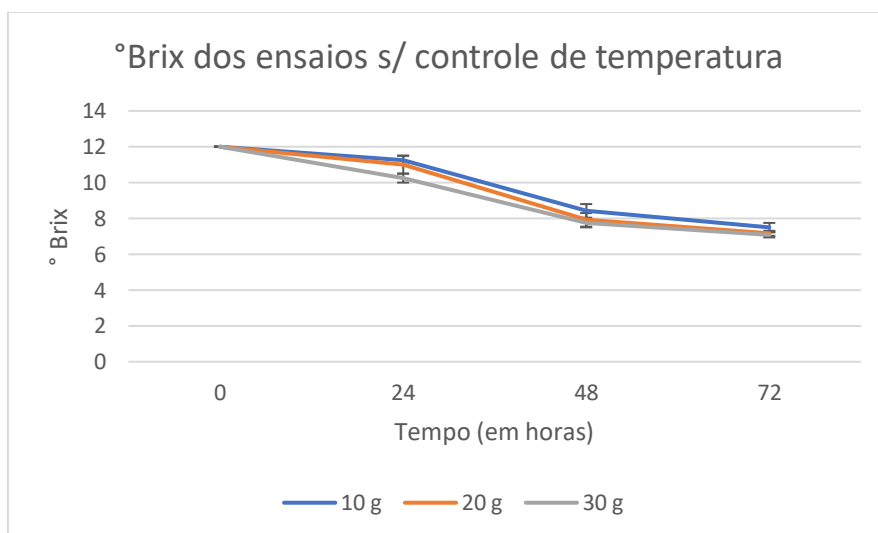


Figura 12 - Gráfico comparativo de °Brix entre os ensaios sem controle de temperatura e com diferentes concentrações de grãos de kefir (Fonte: Próprio autor, 2022).

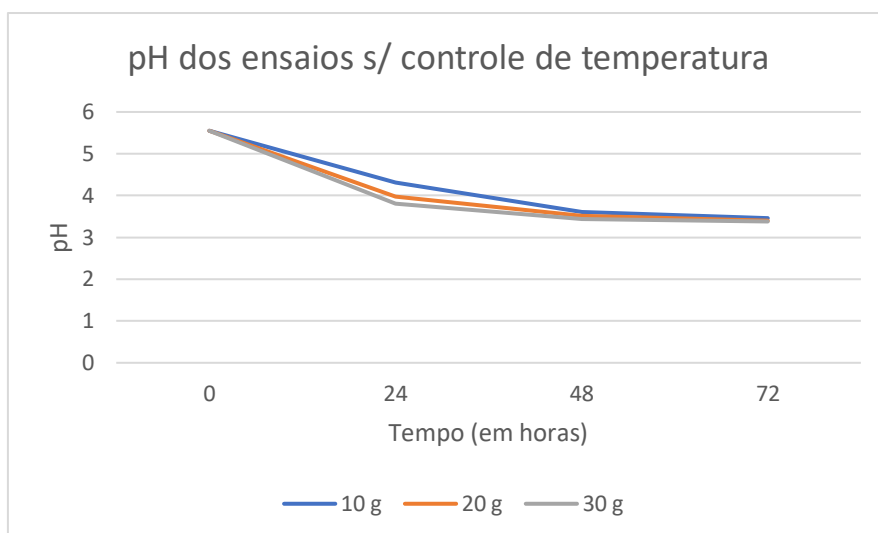


Figura 13 - Gráfico comparativo de pH entre os ensaios sem controle de temperatura e com diferentes concentrações de grãos de kefir (Fonte: Próprio autor, 2022).

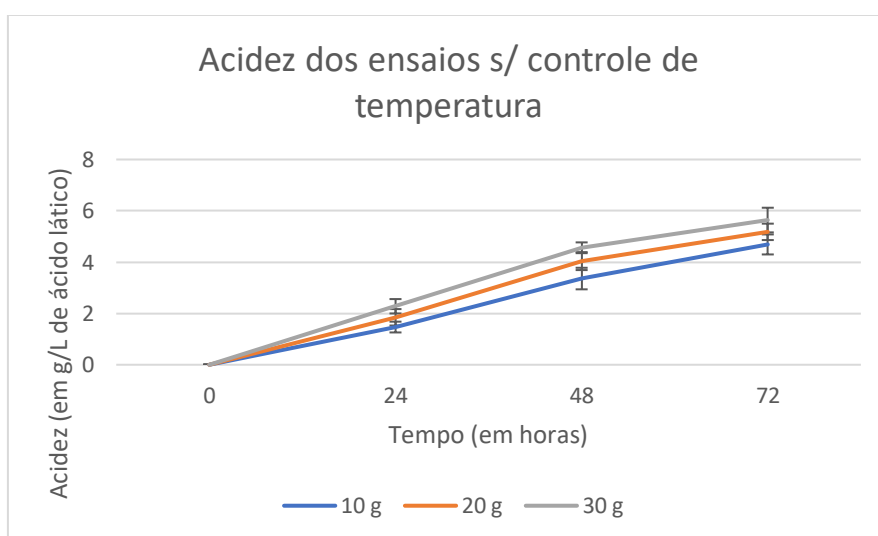


Figura 14 - Gráfico comparativo de acidez total titulável entre os ensaios sem controle de temperatura e com diferentes concentrações de grãos de kefir (Fonte: Próprio autor, 2022).

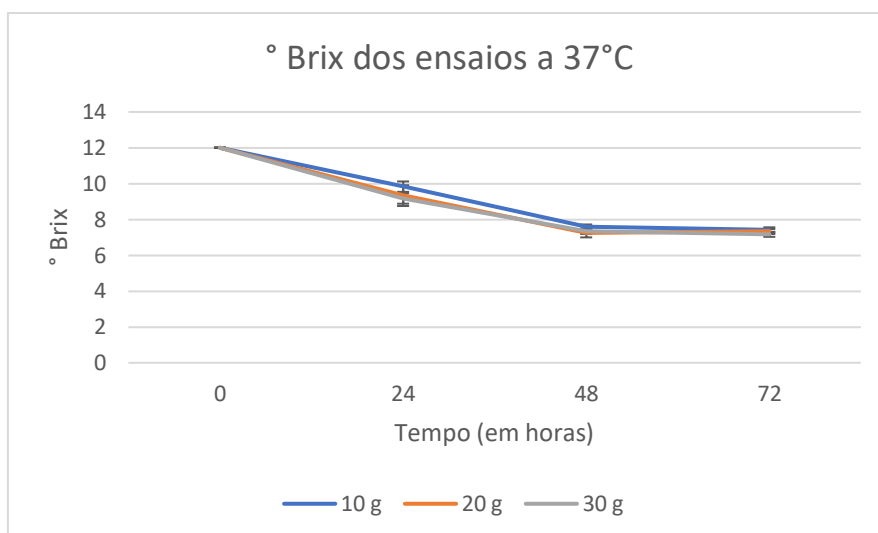


Figura 15 - Gráfico comparativo de °Brix entre os ensaios a 37°C e com diferentes concentrações de grãos de kefir (Fonte: Próprio autor, 2022).

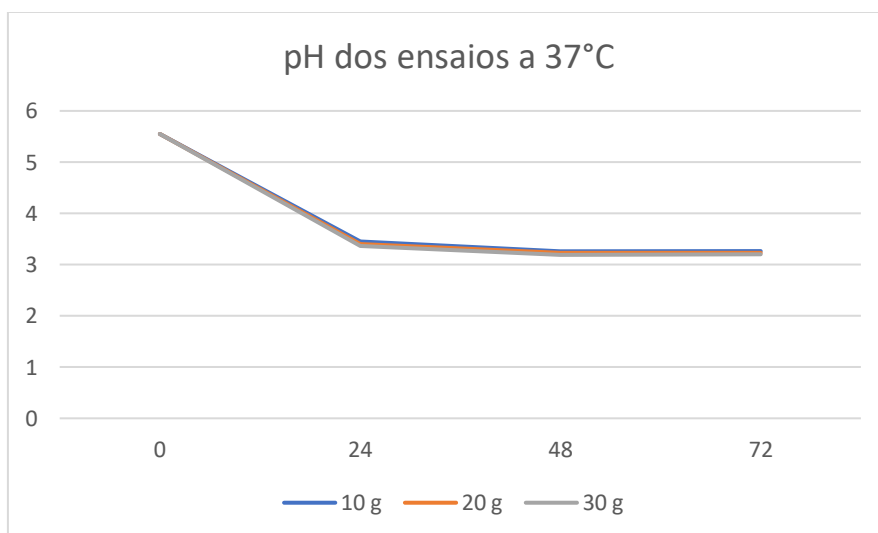


Figura 16 - Gráfico comparativo de pH entre os ensaios a 37°C e com diferentes concentrações de grãos de kefir (Fonte: Próprio autor, 2022).

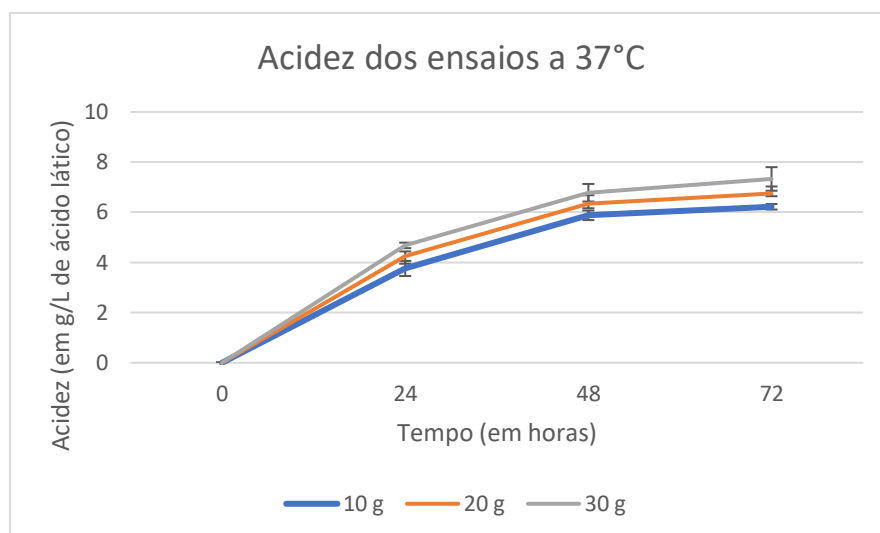


Figura 17 - Gráfico comparativo de acidez total titulável entre os ensaios a 37°C e com diferentes concentrações de grãos de kefir (Fonte: Próprio autor, 2022).