

Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

**Aspectos da fermentação do mosto cervejeiro por leveduras
não-*Saccharomyces***

Rafael Felipe Basso

Trabalho de conclusão de curso apresentado como parte
dos requisitos para obtenção do título de Engenheiro
Agrônomo

Piracicaba
2015

Rafael Felipe Basso

Aspectos da fermentação do mosto cervejeiro por leveduras não-*Saccharomyces*

Orientador:
Prof. Dr. **ANDRÉ RICARDO ALCARDE**
Coorientador:
Dr. **CAURÉ PORTUGAL**

Trabalho de conclusão de curso apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de Engenheiro Agrônomo

**Piracicaba
2015**

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, meu maior amor, base de toda a minha educação, personalidade e caráter, que diversas vezes mantiveram interesses e desejos no campo das ideias, utilizando os recursos financeiros para me prover com ensino de qualidade desde muito pequeno, um dos motivos que me possibilitou concluir um curso de graduação em uma das melhores universidades do Mundo. Mais que isso, dedicaram tempo, conhecimento, experiências, paciência e muito amor para que eu me tornasse o homem capaz, dedicado e íntegro que sou hoje. Especialmente ao meu pai, amigo, conselheiro e exemplo de determinação e caráter, sempre me mostrando o caminho da honestidade e perseverança; à minha mãe, amiga, que sempre me ensinou a importância, o valor, as consequências e resultados das minhas ações; à minha irmã, amiga, a qual eu sempre tive como espelho para refletir em minha vida toda sua dedicação, brilhantismo e coragem.

Dedico este trabalho à minha namorada, companheira de todas as situações dos últimos três anos e dos próximos que virão, sempre me apoiando e auxiliando nas minhas decisões.

Dedico este trabalho, também, aos meus amigos, especialmente ao Guilherme, Heder, Leonardo, Lucas, Luiz e Vitor, que, na universidade, se tornaram parte da minha vida. Cada um com suas características contribuíram diretamente para o meu crescimento e amadurecimento pessoal.

Enfim, dedico este trabalho a todos os professores e profissionais que, de alguma forma, contribuíram para minha formação intelectual e profissional, possibilitando minha chegada até aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que me deu a vida e junto dela um pacote de presentes: minha integridade física e mental; PAIS que podem ser chamados dessa forma, com todas as letras e grandes significados que essa pequena palavra representa; uma família linda; e uma realidade que muitos desejam, mas, infelizmente, nem todos têm.

Agradeço aos meus pais por todo o esforço e dedicação que investiram para me criar quem sou, me permitindo sempre ir além. À minha irmã e seu marido por me servirem como apoio e exemplo. À minha namorada por me suprir com atenção, carinho e amor, além de vontade para sempre buscar ser uma pessoa melhor.

Agradeço ao Prof. Dr. André Ricardo Alcarde, por ter me aberto as portas de entrada para um universo que hoje sou apaixonado, o da tecnologia de bebidas. Também por ter aceitado me orientar no desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço ao Dr. Cauré Portugal, que investiu experiência, tempo e paciência para me auxiliar, como co-orientador, na pesquisa e desenvolvimento deste trabalho. E, também, por me mostrar o quão importante é difundir nossos conhecimentos.

A todos mencionados nesta seção, meu muito obrigado!

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	13
2 FERMENTAÇÃO DO MOSTO CERVEJEIRO	15
2.1 Avanços	15
2.2 A levedura.....	15
2.3 O processo fermentativo.....	16
3 ESTILOS DE CERVEJA	19
3.1 Estilos	19
3.2 Estilos adequados à fermentação por leveduras não- <i>Saccharomyces</i>	19
3.3 Mercado e tendências	20
4 LEVEDURAS NÃO- <i>Saccharomyces</i>	23
4.1 Potencial das leveduras não convencionais na cervejaria	23
4.2 Atributos desejáveis.....	24
4.2.1 Álcool.....	24
4.2.2 <i>Bioflavouring</i>	26
4.2.2.1 Ésteres e álcoois superiores	27
4.2.2.2 Glicosídeos.....	28
5 CONCLUSÃO	31
REFERÊNCIAS	33

RESUMO

Produto da fermentação do mosto cervejeiro por leveduras não-*Saccharomyces*

Os produtos fermentados fazem parte da história da humanidade há milhares de anos, porém, a bioquímica desse processo passou a ser estudada a partir do século XIX. Com os avanços tecnológicos, hoje é possível entender e controlar melhor o processo fermentativo e relacionar seus resultados aos microrganismos atuantes. Devido às novas tendências do mercado de cervejas, citadas neste trabalho, essa revisão concentra-se na utilização de leveduras não convencionais, como *Candida*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces* e *Brettanomyces*, na fermentação do mosto cervejeiro. A exploração desses microrganismos pode ser adequada para diversas finalidades, como a de realçar e melhorar as qualidades sensoriais da cerveja, produzir cervejas com baixo teor alcoólico e fermentar mosto com alta densidade específica original.

Palavras-chave: Fermentação alcoólica; Fermentação espontânea; Fermentação *high gravity*; Levedura não convencional; Leveduras selvagens; Baixo teor alcoólico; Diferencial sensorial; Glicosídeo

ABSTRACT

The product of brewers' wort fermentation by non-*Saccharomyces* yeasts

Fermented products have been part of human history for thousands of years. However, it was not until the nineteenth century that the biochemistry surrounding this process began to be studied. Technological breakthroughs have been making possible to better understand and control the fermentation process in addition to correlate its results to the active microbiota. Due to new trends in the beer market, which are addressed in this work, this review focuses on the use of non-conventional yeasts such as *Candida*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces* and *Brettanomyces*, in brewers wort fermentation. The exploitation of these yeasts may be suitable for several purposes as enhancing and improving the organoleptic quality of the beer, low alcohol beer production and high-gravity wort fermentations.

Keywords: Alcoholic fermentation; Spontaneous fermentation; High-gravity wort fermentation; Non-conventional yeasts; Wild yeasts; Low alcohol beer; Organoleptic improvement; Glycosides

1 INTRODUÇÃO

Acredita-se que por volta de 6000 a.C. a fabricação de cerveja já era uma atividade bem estabelecida e aparentemente organizada. Documentos como o monumento Blau e o código de Hamurabi encontravam-se repletos de símbolos que faziam referência à cerveja como mercadoria e moeda de troca (MORADO, 2009) e constituem algumas das evidências mais antigas a corroborarem tal fato. Mas muito além dessas utilidades, essa bebida já desempenhou funções diferentes e, talvez, mais importantes em uma história mais recente, como a de purificar água contaminada para o consumo e de fornecer nutrientes para as famílias, dado que era considerada e consumida como alimento (HOMAN, 2004).

Apesar de indícios sugerirem que sua origem se deu na Ásia ocidental ou Egito (MORADO, 2009), foi a cultura europeia que proporcionou a grandiosidade que essa bebida apresenta atualmente, sendo pioneira nos registros de produção e nos estudos sobre a ciência envolvida e na inovação.

Importantes descobertas permitiram maior conhecimento das etapas de produção e permitiram controlar cada etapa do processo. Inicialmente, a fermentação ocorria espontaneamente e dependia da microbiota natural, principalmente leveduras e bactérias presentes na matéria-prima, nas superfícies dos equipamentos ou introduzidas por insetos (STEENSELS; VERSTREPEN, 2014). Porém, no século XIX Louis Pasteur documentou a existência de pequenos organismos vivos, as leveduras, como os responsáveis diretos pela conversão de açúcares em álcool. Essa foi uma das descobertas mais importantes, não apenas para a produção de cerveja, mas também para outros avanços na pesquisa científica que levou à criação de um novo campo de estudos, a Bioquímica, que nos permitiu entender como as células trabalham (WHITE; ZAINASHEFF, 2010).

Atualmente as cervejarias, sejam elas pequenas ou grandes, buscam inovar e aprimorar as características sensoriais dos seus produtos. Uma etapa chave para encontrarem o que procuram, certamente, é a fermentação. Enquanto metabolizam o extrato, as células de levedura produzem centenas de compostos que contribuem consideravelmente para o sabor, aroma e para o que pode ser considerado como a “alma” da bebida. Tendo em vista a relevância do processo fermentativo para a produção de cervejas e para a qualidade do produto final, a demanda crescente por cervejas com perfil sensorial diferenciado e a utilização de leveduras não convencionais (LNC) como ferramenta de inovação, este trabalho de revisão bibliográfica reúne dados atualizados e pretende apresentar informações sobre o produto da fermentação de mosto cervejeiro por leveduras não-*Saccharomyces*.

2 FERMENTAÇÃO DO MOSTO CERVEJEIRO

2.1 Avanços

Alimentos e bebidas fermentadas fazem parte da dieta humana há milhares de anos, mas apesar de sua antiga raiz, os princípios biológicos subjacentes ao processo fermentativo foram revelados mais recentemente (STEENSELS; VERSTREPEN, 2014). Apenas na segunda metade do século XIX, após os estudos de Louis Pasteur revelarem que a fermentação é um processo biológico desenvolvido pelas leveduras, assim como dos trabalhos de Emil Hansen na cervejaria Carlsberg, iniciou-se o processo de isolamento de culturas com a intenção de conhecer a microbiota e aumentar o controle sobre o processo. Desse modo, foi possível obter resultados mais consistentes entre uma produção e outra, além de aumentar a qualidade sensorial da cerveja e possibilitar a estocagem por mais tempo pelo fato de diminuir a incidência de microrganismos deteriorantes na bebida.

Com os avanços tecnológicos nessa área, hoje sabemos que a fermentação ocorre essencialmente em função da atividade metabólica de fungos unicelulares, anaeróbicos facultativos. Atualmente, encontram-se documentadas mais de 500 espécies de leveduras e, dentro de cada espécie podem ser contabilizadas milhares de linhagens diferentes (WHITE; ZAINASHEFF, 2010). Cada um desses organismos pode apresentar mecanismos metabólicos distintos e produzir compostos secundários diversos, o que confere certa particularidade a cada um deles no que diz respeito às características sensoriais do produto final.

Com a demanda crescente de produtos com características diferenciadas, a indústria de cervejas tem demonstrado grande interesse na utilização de leveduras não-*Saccharomyces* em processos controlados de fermentação, principalmente com a intenção de incrementar a diversidade de sabores, mas também de controlar microrganismos que possam contaminar a bebida e alterar suas características sensoriais (STEENSELS; VERSTREPEN, 2014).

2.2 A levedura

As leveduras são microrganismos pertencentes ao reino Fungi, são unicelulares, com formato esferoidal a ovoide. A maioria desses organismos apresenta metabolismo aeróbico obrigatório, mas as leveduras fermentadoras por excelência são anaeróbicas facultativas. Devido à abundância e dominância em fermentações, as leveduras do gênero *Saccharomyces*

foram naturalmente selecionadas ao longo da história para a maioria dos processos controlados, incluindo a produção de pão, vinho e cerveja (DEQUIN; CASAREGOLA, 2011).

Na prática, os organismos mais empregados na produção de cerveja são divididos em duas categorias: leveduras *ale* ou de alta fermentação, e *lager* ou de baixa fermentação. As *ale* em geral são cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, que apresentam maior diversidade genética e já foram isoladas em diversas localidades ao redor do mundo. As cepas tipo *lager*, por outro lado, normalmente pertencem à espécie *S. pastorianus*, cuja nomenclatura já passou por *S. uvarum* e *S. carlsbergensis*. Vaughan, Martini e Kurtzman (1985), citados por Bokulich e Bamforth (2013), propõem que as linhagens tipo *lager* surgiram a partir da rara hibridação de linhagens de *S. cerevisiae* com *S. bayanus*. A maior diversidade entre as cepas *ale* é sugerida devido ao isolamento em múltiplos locais, ao passo que cepas de leveduras *lager* surgiram de localidades muito pontuais (CASEY, 1996).

Atualmente, a indústria cervejeira experimenta uma revolução nos processos produtivos e com a grande demanda por produtos diferenciados passou a resgatar antigas tradições com o objetivo de adicionar maior riqueza sensorial à bebida. Diversos estudos argumentam que, ao restringir a diversidade microbiana que participa da fermentação, o espectro de características agregadas também fica limitado (STEENSELS; VERSTREPEN, 2014). Logo, a fermentação controlada, utilizando leveduras não-*Saccharomyces*, assim como as fermentações espontâneas, têm sido um importante fator para se alcançar tais objetivos.

2.3 O processo fermentativo

A levedura pode obter energia e nutrientes para o crescimento através de diversos meios, apesar de alguns fornecerem melhores condições às células que outros (WHITE; ZAINASHEFF, 2010). Em um meio com disponibilidade ilimitada de oxigênio, as leveduras consomem os açúcares presentes através do metabolismo respiratório, sendo que esta é a via energeticamente mais eficiente e menos estressante para as células. Porém, é muito comum que as leveduras regulem seu metabolismo e passem a apresentar o que se conhece por efeito Crabtree ou Pasteur-negativo, onde a fermentação ocorre mesmo em presença de oxigênio em meios suficientemente concentrados em glicose devido às altas concentrações de enzimas glicolíticas que tornam a produção de ATP pela glicólise mais rápida que pela respiração. Segundo White e Zainasheff (2010) a concentração de glicose no mosto cervejeiro é sempre

superior a 0,4%, requerida para que ocorra esse efeito. Logo, a presença de oxigênio durante a fermentação não é prejudicial à produção de etanol, mas sim na ativação de rotas metabólicas que produzem aromas alterantes (*off-flavours*), o que requer que o processo fermentativo de grande parte das cervejas ocorra em meios anaeróbicos.

Assim que entram em contato com o mosto, as células usam suas reservas energéticas – essencialmente o glicogênio – assim como o oxigênio disponível para adaptar sua estrutura celular. A captação desse oxigênio ocorre rapidamente, sendo que as células chegam a esgotá-lo em um prazo de aproximadamente trinta minutos após a inoculação (WHITE; ZAINASHEFF, 2010). Após a fase de aclimação (fase lag), começa o consumo dos nutrientes e açúcares, sendo que aqueles mais simples são consumidos primariamente, segundo a ordem de afinidade com que a levedura os utiliza: glicose, frutose, sacarose, maltose e maltotriose. Bokulich e Bamforth (2013) afirmam que durante a fermentação as leveduras excretam uma variedade de compostos que afetam direta e indiretamente o aroma e o sabor da bebida (Figura 1). Os compostos aromáticos ativos são formados ao longo de cada etapa da produção, porém a maioria é produzida na fase fermentativa e consiste de intermediários metabólicos ou subprodutos do metabolismo (PIRES et al., 2014).

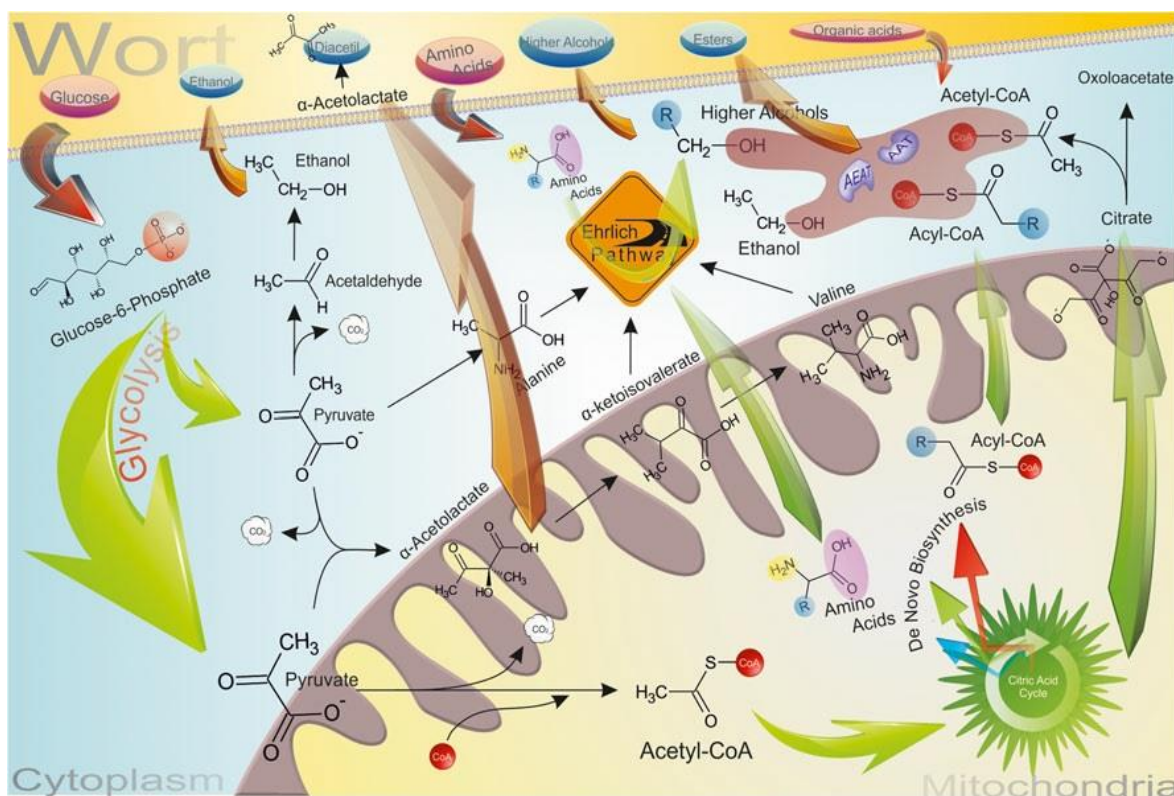


Figura 1 - Esquema simplificado das principais rotas metabólicas em uma célula de levedura comumente utilizada para a fermentação do mosto cervejeiro

3 ESTILOS DE CERVEJA

3.1 Estilos

A cerveja pode apresentar grande diversidade de categorias e, dentro de cada categoria, diversas variações, os estilos. O estilo da cerveja está fundamentado na arte de combinar diversos fatores para criar uma harmonia consistente das características organolépticas, que ainda irão variar com a sazonalidade, as práticas utilizadas e a disponibilidade e qualidade das matérias-primas (PRIEST; STEWART, 2006). Os estilos consistem no agrupamento de diferentes tipos de cerveja a partir da identificação das suas principais características sensoriais. A separação em estilos tem por objetivo servir como referência em competições, auxiliar cervejeiros caseiros e cervejarias na formulação das receitas, no planejamento e gestão, bem como na exploração comercial.

As variáveis envolvidas na produção de cerveja são muitas, tornando possível diversas combinações que resultarão em produtos diferentes. As variações podem ocorrer na escolha e proporção dos ingredientes e nas etapas do processo de produção, da moagem do malte até a filtração. As possibilidades que o processo fermentativo proporciona para a obtenção de diferentes resultados podem ser diversas, de modo que a escolha das leveduras utilizadas, assim como a taxa de inoculação, temperatura de fermentação e emprego de práticas como a refermentação, devem ser consideradas fator primordial no processo.

Existem alguns guias que descrevem estes estilos e auxiliam os avaliadores e cervejeiros, sejam eles profissionais ou não. Não existe nenhum universalmente aceito e os mais comuns e utilizados são os elaborados pelo *Beer Judge Certification Program* (BJCP), que conta com 80 estilos específicos, pela *Brewers Association*, que agrega mais de 130 estilos específicos e pela *Campaign for Real Ale* (CAMRA).

3.2 Estilos adequados à fermentação por leveduras não-*Saccharomyces*

Segundo Bokulich e Bamforth (2013), para a maioria das cervejas, os únicos microrganismos que compõem a fermentação pertencem ao gênero *Saccharomyces*. Porém, a inoculação de um segundo cultivo de leveduras não-*Saccharomyces* após a primeira fermentação vem ganhando popularidade entre produtores a fim de se obter um produto diferenciado.

Em alguns estilos de cerveja, como as tradicionais *Lambic*, *East Flanders Brown Ale* e *West Flanders Red Ale*, são produzidas através de fermentações espontâneas, com a participação de diversos grupos e espécies de microrganismos. As *Lambic* são tradicionalmente produzidas no vale do Rio Senne, na região de Bruxelas, e as duas últimas em Flanders, Bélgica. Outro exemplo também pouco conhecido é o das *Coolship Ales*, as “irmãs” americanas das *Lambic*. Neste tipo de elaboração, ocorre uma sucessão microbiológica ao longo dos processos fermentativo e de maturação, indicando que o ambiente de produção exerce um tipo de seleção sobre esses microrganismos. Nestes casos, constatou-se que bactérias da família *Enterobacteriaceae* e leveduras não-*Saccharomyces* costumam dominar o início do processo, sendo sucedidas por outras leveduras do gênero *Saccharomyces*, bactérias lácticas do gênero *Pediococcus* e, finalmente, por leveduras do gênero *Dekkera/Brettanomyces*, que costumam dominar durante a maturação (BOKULICH; BAMFORTH; MILLS, 2012; BOKULICH; BAMFORTH, 2013; SPITAEELS et al., 2014, 2015). Esse tipo de fermentação, em que a microbiota atuante não é controlada, é conhecida como fermentação espontânea e conta com leveduras e bactérias autóctones para a condução do processo fermentativo resultando na obtenção de um produto com características sensoriais marcantes, especialmente marcados por acidez e aromas singulares.

Entretanto, Jeff Sparrow (2005) lembra a importância de não se prender sempre aos estilos, já que se nenhum cervejeiro tivesse tentado algo diferente, não teríamos muitas das cervejas clássicas que hoje conhecemos. Atualmente, um crescente número de cervejeiros entusiastas produzem os mais variados tipos de cervejas artesanais e não costumam apresentar maiores cuidados em enquadrar suas cervejas dentro da definição de um estilo, produzindo receitas que acreditam proporcionar um resultado sensorialmente interessante. Dessa forma, o uso de culturas puras de leveduras não convencionais e bactérias para a fermentação de cervejas tem aumentado consideravelmente, com o objetivo principal de se explorar sabores e aromas atípicos para a conquista de novos nichos de mercado.

3.3 Mercado e tendências

Desde a revogação da lei americana que proibia a produção, transporte e comércio de bebidas alcoólicas nos Estados Unidos em 1933, as grandes indústrias multinacionais dominaram a produção e distribuição de cerveja, provavelmente por uma suposta falha nessa revogação que manteve a produção caseira ilegal, sendo corrigida anos mais tarde, em 1976, pelo então presidente Jimmy Carter (MURRAY; O'NEILL, 2012). A partir daí, o movimento

das cervejarias artesanais ganhou força, motivado pela paixão de alguns entusiastas, que mesmo antes da produção caseira ser liberada, já produziam suas próprias cervejas, buscando alternativas às tradicionais *lager* sem personalidade que eram impostas aos consumidores pelas grandes indústrias. Com a introdução dessas cervejas no mercado norte-americano a população passou a conhecer e apreciar estilos diversificados, incentivando a abertura de inúmeras micro-cervejarias e a formação de consumidores com mais conhecimento na arte e ciência que envolve o universo cervejeiro.

Devido à grande influência que os Estados Unidos exercem sobre o mundo, diversos setores do mercado mantêm seus produtos como referência, e não foi diferente com o da cerveja. Com os avanços das exportações, as cervejarias artesanais norte americanas têm aumentado o volume de distribuição de seus produtos pelo globo (Figura 2), orientando o mercado e abastecendo-o com novas ideias. Assim, junto com cervejarias de tradicionais escolas, como a alemã, belga e inglesa, ajudam a reestabelecer o prestígio e a atenção que as cervejas de qualidade merecem.

Crescimento da Exportação de Cervejas Artesanais Norte Americanas 2013-2014

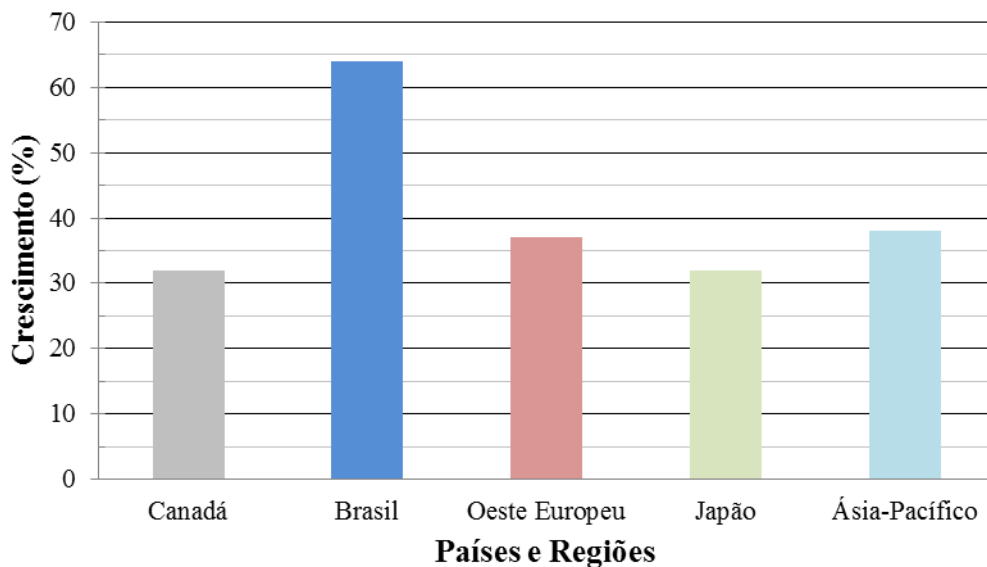


Figura 2 - Crescimento, em volume, da exportação de cervejas artesanais norte americanas para alguns países e regiões do mundo no período de 2013 a 2014 (adaptado de BREWERS ASSOCIATION)

A produção de cervejas artesanais é consideravelmente inferior à produção industrial, e representa apenas 0,15% do total produzido no Brasil, por exemplo. Neste caso, a produção nacional total de cerveja em 2014 foi de aproximadamente 14,1 bilhões de litros (SISTEMA

DE CONTROLE DE PRODUÇÃO DE BEBIDAS – SICOBE, 2015), da qual 99,85% representa o volume produzido pelas grandes empresas. A previsão da ABRABE (Associação Brasileira de Bebidas), no entanto, é de que as microcervejarias cheguem a atingir 2% do mercado de cervejas nos próximos oito anos, o que prova o potencial que esse setor apresenta para a economia nacional.

Nesse sentido, observa-se que a produção de cervejas especiais¹ representa um grande potencial para o mercado e, com o aumento do número e diversidade desses produtos, passa a haver certa pressão sobre os produtores para que busquem alternativas, com o objetivo de agregar algum diferencial às suas bebidas, sendo que o processo fermentativo constitui um dos pontos-chave nesse sentido.

¹ Cervejas especiais: entendam-se aquelas produzidas com uma ou mais características que às diferenciam das cervejas comerciais mais populares, como a utilização matérias primas de qualidade superior, baixo teor alcoólico, sem glúten etc.

4 LEVEDURAS NÃO-*Saccharomyces*

As leveduras não convencionais apresentam diversas propriedades interessantes para a indústria cervejeira, como a produção e liberação de compostos aromáticos secundários, propriedades antimicrobianas, utilização incomum da fonte de carbono e maior tolerância ao álcool (VANDERHAEGEN et al., 2003; DAENEN et al., 2008; BOKULICH; BAMFORTH, 2013; STEENSELS; VERSTREPEN, 2014).

4.1 Potencial das leveduras não convencionais na cervejaria

O interesse existente na condução da fermentação do mosto cervejeiro por leveduras não convencionais deve-se especialmente à diversidade de padrões de assimilação de substratos que estes organismos podem apresentar (DIJKEN, 2002), resultando em cervejas com diferentes aspectos em açúcares residuais, acidez, aromas, sabores e teor alcoólico. Tal variedade de perfis sensoriais está direta ou indiretamente relacionada às características da linhagem de microrganismo utilizado, bem como do controle das variáveis ambientais envolvidas na fermentação. Por serem organismos vivos, a diversidade passível de ser explorada na etapa fermentativa excede aquela da seleção dos maltes, lúpulos e tipo de água empregados na elaboração da receita, pois rotas metabólicas distintas ocorrem para os diferentes organismos, bem como para os mesmos organismos submetidos a condições diferentes. Por essa razão, as leveduras não convencionais se diferem daquelas empregadas na produção da grande maioria das cervejas, aumentando ainda mais o potencial do processo fermentativo e possibilitando que o cervejeiro explore fermentações com resultados inusitados, entre outros motivos, por adicionarem perfis de sabor e aromas naturais, processo comumente conhecido como *bioflavouring* (STEENSELS; VERSTREPEN, 2014).

Alguns exemplos comerciais de cervejas que exploram leveduras *Dekkera/Brettanomyces* no processo fermentativo podem ser encontrados no Brasil, como é o caso da dinamarquesa “Mikkeller Brett APA²” e da “Lost in Translation IPA³ Brett”, produzida pela cervejaria brasileira Tupiniquim em colaboração com a dinamarquesa Evil Twin. A trapista Orval, por outro lado, emprega a prática de refermentação na garrafa por leveduras desse mesmo gênero.

Nem todas as rotas metabólicas das diferentes leveduras são conhecidas e muitas daquelas conhecidas ainda não são completamente entendidas, o que nos dá indícios de que

² APA: *American Pale Ale*

³ IPA: *India Pale Ale*

novas descobertas ainda permitirão a criação de diferentes possibilidades a serem exploradas pelos produtores e contribuir com a diversificação de produtos das fermentações. Apesar de o uso de leveduras não convencionais apresentar um grande potencial na elaboração de cervejas com diferencial sensorial, certas precauções devem ser tomadas quanto à seleção desses organismos, devido ao fato de que alguns podem produzir compostos prejudiciais à saúde humana. Portanto, recomenda-se que antes de se empregar uma nova levedura no processo fermentativo, o produtor pesquise a biossegurança da aplicação desse organismo no processo fermentativo (STEENSELS; VERSTREPEN, 2014). Essa pesquisa pode ser feita através de informações fiáveis e atualizadas e que são disponibilizadas, por exemplo, pela *US Food and Drug Administration* (UFDA) ou *European Food Safety Authority* (EFSA).

4.2 Atributos desejáveis

Como anteriormente exposto, cada microrganismo apresenta particularidades e os resultados obtidos a partir da sua expressão na produção de cerveja dependem também das condições do ambiente às quais esses microrganismos são expostos durante o processo fermentativo. Logo, essa seção busca associar as características mais relevantes resultantes da fermentação, almejadas pelos cervejeiros, quando da utilização de microrganismos não convencionais capazes de imprimir essas características no produto final, a cerveja.

4.2.1 Álcool

A concentração alcoólica é uma questão muito importante em dois aspectos que se contrapõem na produção de cervejas. Por um lado, existe certa preocupação relacionada à saúde e integridade dos consumidores, com uma tendência atual em se produzir bebidas com menor teor alcoólico. Por outro lado, não se pode deixar de considerar o etanol como uma substância tóxica para as células de levedura, especialmente na fermentação de mosto de alta densidade (mostos primários com alta densidade específica original), em que os altos teores de álcool alcançados podem chegar a inibir prematuramente a atividade da maioria das espécies utilizadas na fermentação do mosto.

Sabe-se que o álcool pode causar danos à saúde, relacionado esporadicamente a inúmeros problemas clínicos quando consumido em excesso ou com muita frequência (ROOM; BABOR; REHM, 2005; LI, 2008). Devido às preocupações de saúde pública,

observa-se atualmente uma tendência na produção de bebidas alcoólicas com menor concentração de álcool (SARENS; SWIEGERS, 2012), reduzindo o risco de problemas relacionados à ingestão excessiva dessa substância. Dessa forma, novos métodos de produção vêm sendo cada vez mais estudados, com o objetivo de produzir cervejas com a mesma qualidade sensorial, mas com reduzido teor alcoólico.

Basicamente, existem duas estratégias principais para se reduzir o teor alcoólico da cerveja: técnicas físicas e técnicas biológicas (ESSLINGER, 2009; BRANYIK et al., 2012). Um aspecto preocupante na produção de cervejas com esse atributo, porém, são os resultados com notável redução da qualidade sensorial, com níveis reduzidos de ésteres e intensificação de possíveis aromas alterantes (PEDDIE, 1990; PERPÈTE; COLLIN, 2000; ZUFALL; WACKERBAUER, 2000; ESSLINGER, 2009; SARENS; SWIEGERS, 2012). Leveduras não convencionais representam uma opção bastante interessante para a produção de cervejas com menor concentração alcoólica, dado que essa técnica não implica em custos extras de processamento nem na extração involuntária de compostos de aroma e sabor presentes na cerveja, ao contrário da extração do etanol após a fermentação, que demanda processos como destilação, osmose reversa ou diálise (ERTEN; CAMPBELL, 2001). A utilização de *Saccharomyces ludwigii*, por exemplo, pode ser empregada para tal finalidade (STEENSELS; VERSTREPEN, 2014), dada sua incapacidade na utilização de maltose e maltotriose. Neste sentido, o uso de leveduras mutantes, que apresentam alterações no ciclo do citrato, conduzindo para a produção de grandes quantidades de ácidos orgânicos também é uma opção para este propósito (ESSLINGER, 2009; STREJC et al., 2013). Erten e Campbell (2001) também citam três espécies do gênero *Pichia* e uma do gênero *Williopsis* que apresentaram bons resultados na produção de vinho com baixo teor alcoólico e boa produção de compostos aromáticos, porém agitando e aerando o mosto durante o processo fermentativo, o que abre espaço para experimentos futuros na fermentação do mosto cervejeiro, ainda que em inoculações mistas ou sequenciais com leveduras *Saccharomyces*.

A produção de cerveja a partir da fermentação de mostos com alta densidade é uma abordagem que vem ganhando espaço nas cervejarias, especialmente para a produção de bebidas com mais corpo e maior teor alcoólico. O produto fermentado pode ser posteriormente diluído para se obter a graduação alcoólica desejada e assim reduzir custos e tempo de produção. Outro objetivo desta técnica é o de aumentar a capacidade de operação da planta, uma vez que aumentando a densidade original do mosto de 12°P para 18°P, por exemplo, há um incremento de 50% da capacidade da cervejaria, sem necessidade de investimentos adicionais, bem como o de aumentar a estabilidade do produto final e a

produção de etanol por unidade de açúcar fermentescível (CASEY; MAGNUS; INGLEDEW, 1984). Porém, há algumas dificuldades na utilização deste método. As mais notáveis são a alta pressão osmótica que o meio impõe sobre as células de levedura no início da fermentação (PULIGUNDLA et al., 2011) e a alta concentração de álcool que será produzida, o que muitas vezes é o fator limitante da máxima produção de etanol que pode ser atingida na fermentação (BLIECK et al., 2007; HU et al., 2007). Apesar de sabermos que algumas cepas de *S. cerevisiae* podem apresentar maior tolerância a essas condições extremas (CASEY; INGLEDEW, 1986), as leveduras não convencionais também podem representar um importante papel na fermentação de mostos com alta densidade. Ainda que não haja estudos expressivos relacionados à utilização de LNC como forma de beneficiar o processo fermentativo de mosto com alta densidade, alguns autores citam a utilização de *Brettanomyces bruxellensis* nesses tipos de processos (ANDREWS; GILLILAND, 1952), assim como a grande capacidade de atenuação e tolerância ao etanol que algumas destas cepas podem apresentar (KUMARA; DE CORT; VERACHTERT, 1993; YAKOBSON, 2010; STEENSELS; VERSTREPEN, 2014).

4.2.2 *Bioflavouring*

Um aperfeiçoamento da qualidade sensorial, bem como o desenvolvimento de novas bebidas, pode ser alcançado através do que se conhece por *bioflavouring*, que consiste na produção e transformação de compostos ou precursores de sabor e aroma por métodos biológicos, por exemplo, empregando leveduras não convencionais (VANDERHAEGEN et al., 2003; DAENEN et al., 2007).

A fermentação é uma das etapas mais importantes na produção de cerveja, momento em que ocorrem as principais transformações na bebida, chegando a haver um incremento de mais de quinhentos compostos secundários diferentes (MUSSCHE; MUSSCHE, 2008, citado por WHITE; ZAINASHEFF, 2010). Enquanto metaboliza o substrato, a levedura produz e excreta diversos subprodutos e intermediários metabólicos que têm um impacto sobre o sabor e o aroma, principalmente os ésteres, álcoois superiores, compostos de enxofre, aldeídos e ácidos orgânicos.

Em alguns casos, de fato, deseja-se que ocorra a produção ou modificação de compostos específicos para se alcançar o resultado esperado. Para tanto, a aplicação de métodos diferentes dos usuais são necessários, como a introdução de organismos geneticamente modificados, a utilização de outras espécies ou linhagens de leveduras, ou a

adição de precursores específicos de sabor. Nos casos em que as condições de produção desses compostos por essa via não são adequadas à produção da cerveja, o uso de uma cadeia de processamento separada da linha de produção principal pode ser uma abordagem viável (VANDERHAEGEN et al., 2003).

4.2.2.1 Ésteres e álcoois superiores

Um dos fatores mais importantes que influenciam a qualidade da cerveja é a presença e balanço de ésteres e álcoois superiores (PIRES et al., 2014). Os ésteres são compostos voláteis, formados a partir da condensação enzimática de um ácido orgânico e um álcool (PIRES et al., 2014) e desempenham um papel muito importante na personalidade da cerveja (WHITE; ZAINASHEFF, 2010). São apenas elementos traço, porém, são os constituintes aromáticos mais importantes produzidos pelas leveduras, com um baixo limiar de percepção e que contribuem para grande parte do *bouquet* da bebida (PIRES et al., 2014). Acetato de etila, acetato de isoamila, acetato de feniletila, hexanoato de etila (caproato de etila) e octanoato de etila (caprilato de etila) são os ésteres mais importantes que compõem a cerveja (VERSTREPEN et al., 2003).

A produção de compostos de aroma é extremamente dependente da cepa de levedura a ser utilizada (PIRES et al., 2014), uma vez que o genoma de cada uma é único e sua expressão define qualitativa e quantitativamente o perfil aromático do produto final (ROSSOUW; NÆS; BAUER, 2008). O trabalho de Rojas et al. (2001), por exemplo, avaliou a produção de ésteres por diferentes cepas de leveduras, com ênfase nas não-*Saccharomyces*, evidenciando o potencial de *Hanseniaspora guilliermondii* e *Pichia anomala* para a produção desses compostos na fabricação de vinho. Os mesmos autores também demonstraram a relação entre o oxigênio dissolvido no mosto e a produção de ésteres por esses microrganismos que, ao contrário de *Saccharomyces*, podem elevar a taxa de produção em condições de alta concentração de oxigênio.

Sarens e Swiegers (2012) analisaram os efeitos na produção de diferentes ésteres e álcoois superiores através da inoculação sucessiva de *Pichia kluyveri* e *S. cerevisiae* em mosto cervejeiro com diferentes variedades de lúpulos, comparado a uma fermentação controle conduzida exclusivamente por *S. cerevisiae*. Os resultados desse estudo apontaram que as maiores diferenças ocorreram para a produção de ésteres e que as concentrações de álcoois superiores não se alteraram significativamente. As concentrações de acetato de isoamila e acetato de isobutila aumentaram significativamente com a inoculação sequencial, o que é

desejável aromaticamente, ao passo que o incremento em de acetato de etila foi apenas discreto, fator importante uma vez que altas concentrações desse composto atribuem caráter de solvente à cerveja (MEILGAARD, 1982; WHITE; ZAINASHEFF, 2010). Por outro lado, a produção de hexanoato e octanoato de etila só aumentou nas fermentações sequenciais com a adição do lúpulo Cascade. Os autores chegaram à conclusão que a fermentação sequencial utilizando leveduras *P. kluyveri* e *S. cerevisiae* é uma abordagem viável para aumentar o perfil aromático da cerveja.

A fermentação por leveduras do gênero *Dekkera/Brettanomyces* tende a produzir uma cerveja com baixa concentração de ésteres como acetato de isoamila e acetato de feniletila e altas concentrações de acetato de etila e lactato de etila. Isto ocorre porque as esterases produzidas por estas leveduras são responsáveis pela degradação dos ésteres de acetato e síntese de ésteres de etila (SPAEPEN; OEVELEN; VERACHTERT, 1978; SPAEPEN; VERACHTERT, 1982).

A engenharia genética, apesar de não ser aceita em muitas instâncias na prática, também mostra-se uma alternativa interessante para maior controle sobre a produção de ésteres, através da sobre ou sub-expressão de um ou mais genes responsáveis pela síntese desses compostos. Adicionalmente, o uso misto de culturas de leveduras convencionais a esses mutantes pode tornar possível a modificação da concentração de ésteres na cerveja (VANDERHAEGEN et al., 2003).

4.2.2.2 Glicosídeos

O perfil aromático das bebidas fermentadas é um dos fatores determinantes na distinção entre produtos, bem como para influenciar a preferência do consumidor (GAMERO et al., 2014). Portanto, a produção de cervejas com perfil aromático complexo e realçado atribui uma vantagem sensorial e comercial. Logo, a exploração de compostos aromáticos por métodos ainda pouco empregados na indústria cervejeira também se apresenta como uma forma interessante de agregar qualidade e valor à bebida.

Muitas plantas são capazes de produzir glicosídeos, que são compostos formados por moléculas aromáticas (agliconas) e uma molécula de β -D-glicose, podendo ou não apresentar unidades adicionais de açúcares unidos a ela. Esses compostos são encontrados na parte aérea, raízes, flores, frutos ou sementes de muitos vegetais, que podem ser utilizados na produção de cerveja, como é o caso do lúpulo (WINTERHALTER; SKOUROUMOUNIS, 1997;

DAENEN et al., 2008; BOKULICH; BAMFORTH, 2013). Apesar de não se saber ao certo a função desses compostos nos vegetais, acredita-se que são importantes no acúmulo, armazenamento e transporte de substâncias hidrofóbicas, bem como por serem intermediários do metabolismo de produtos secundários (WINTERHALTER; SKOUROUMOUNIS, 1997).

Os glicosídeos não são voláteis e, portanto, não fazem parte do *bouquet* da cerveja, porém representam um grande potencial, ainda pouco explorado pelos produtores, capaz de alterar, intensificar e melhorar o perfil aromático da bebida. Isso se deve à possibilidade de sofrerem hidrólise durante o processo fermentativo, resultando em uma molécula de açúcar e uma aglicona livre, que apresenta atividade aromática (WINTERHALTER; SKOUROUMOUNIS, 1997; DAENEN et al., 2007). Alguns microrganismos apresentam elevada produção de glicosidases, em que a β -glicosidase é a enzima mais apropriada para a hidrólise da ligação glicosídica, ainda que outras enzimas sejam necessárias caso o glicosídeo seja composto por um dissacarídeo (GUNATA et al., 1988; SARRY; GÜNATA, 2004; DAENEN, 2008). A taxa de atividade enzimática é afetada por fatores do meio em que estão atuando, portanto, três propriedades importantes da enzima devem ser avaliadas quando aplicada para hidrolisar ligações glicosídicas, a fim de liberar compostos aromáticos: sua especificidade de substrato, pH ótimo e tolerância à glicose e etanol (WINTERHALTER; SKOUROUMOUNIS, 1997).

Em um estudo conduzido com 317 cepas de levedura de vinte espécies enológicas diferentes, Rosi, Vinella e Domizio (1994) identificaram que algumas espécies de *Candida*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* e *Zygosaccharomyces* possuem, em alguma extensão, atividade de β -glicosidase. Porém espécies de *Saccharomyces* apresentam baixa atividade dessas enzimas (ARÉVALO VILLENA et al., 2005; DAENEN et al., 2008). Saha e Bothast (1996) estudaram 48 cepas dos gêneros *Candida*, *Kluyveromyces*, *Debaryomyces* e *Pichia* e concluíram que todas as cepas apresentam atividade β -glicosidase, porém as enzimas de apenas quinze cepas eram altamente tolerantes à glicose.

Swangkeaw et al. (2009) também investigaram a produção e atividade de exo- β -glicosidase por *Pichia anomala* na produção de vinho. Os resultados obtidos mostram que a cepa utilizada pode apresentar produção expressiva de β -glicosidase extracelular quando cultivada em meios contendo celobiose. Os autores observaram também que a atividade dessas enzimas pode ser estimulada em concentrações de etanol entre 4% e 20% e inibida por

glicose, indicando que a inoculação dessa levedura é mais vantajosa nos estágios finais da fermentação.

Daenen et al. (2008) examinaram a atividade hidrolítica das glicosidases em 41 cepas de *Saccharomyces* e 18 cepas do gênero *Bretanomyces* encontradas na fermentação de mosto cervejeiro, utilizando meios de culturas com diferentes fontes de carbono e avaliando a especificidade de substrato dessas enzimas. Os resultados sugerem que apenas poucas cepas de *Saccharomyces* são capazes de produzir β -glicosidases. Por outro lado, a capacidade que cepas desse gênero apresentam de hidrolisar glicosídeos relaciona-se à produção da enzima $\text{exo-}\beta$ -glucanase, que apresenta como característica relevante a não especificidade de substrato (NEBREDA et al., 1986). O resultado mais interessante desse trabalho ocorreu para a enzima produzida por *Bretanomyces custersii*, a qual apresenta atividade em ampla gama de substratos. Os autores também conduziram um ensaio de fermentação co-inoculada com *B. custersii* e *S. cerevisiae*, que se apresentou eficiente na hidrólise de glicosídeos provenientes dos lúpulos.

Visto a ampla gama de cepas capazes de promover a hidrólise de glicosídeos e, assim, liberar aromas antes inexpressivos, a aplicação de leveduras não convencionais em co-inoculação com cepas de *Saccharomyces* para a fermentação do mosto cervejeiro se mostra como uma abordagem interessante quando um perfil aromático mais intenso e complexo é desejado (STEENSELS; VERSTREPEN, 2014).

5 CONCLUSÃO

Dado a tendência do mercado cervejeiro da crescente busca por produtos naturais, menos processados e com diferencial sensorial, que ocorre principalmente no segmento das cervejas artesanais, e as diversas características interessantes que as leveduras não convencionais apresentam para tal finalidade, conclui-se que a fermentação conduzida por esses microrganismos na indústria cervejeira se apresenta como boa alternativa para o aprimoramento e diversificação sensorial das cervejas, redução do teor alcoólico do produto final e produção de cerveja a partir de mosto com alta densidade específica original.

Porém, a aplicação de leveduras não-*Saccharomyces* no processo fermentativo pode apresentar algumas características negativas, como a menor eficiência da fermentação e a produção de compostos de aroma e de sabor além dos pretendidos. Portanto abordagens como a fermentação mista ou sucessiva de LNC com cepas de *Saccharomyces*, engenharia genética e até mesmo o uso de uma cadeia de processamento de compostos específicos separada da linha de produção principal, são caminhos alternativos para se explorar o potencial das leveduras não convencionais conciliando-o às características interessantes do gênero *Saccharomyces*.

Por fim, observou-se que a maior parte dos trabalhos científicos disponíveis que abordam o uso de leveduras não convencionais concentra-se na produção de vinho ou cervejas belgas produzidas por fermentação espontânea. Logo, conclui-se também que há uma demanda de estudos específicos sobre o metabolismo desses microrganismos na fermentação do mosto cervejeiro, bem como suas implicações no produto final, para viabilizar a exploração do potencial dessas leveduras na cervejaria com maior controle e domínio sobre os resultados obtidos.

REFERÊNCIAS

- ANDREWS, B.J.; GILLILAND, R.B. Super-attenuation of beer: a study of three organisms capable of causing abnormal attenuations. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 58, n. 3, p. 189-196, 1952. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/j.2050-0416.1952.tb02675.x>>. Acesso em: 26 jun. 2015.
- ARÉVALO VILLENA, M. et al. Optimization of a rapid method for studying the cellular location of β -glucosidase activity in wine yeasts. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, n. 3, p. 558-564, 2005.
- BLIECK, L. et al. Isolation and characterization of brewer's yeast variants with improved fermentation performance under high-gravity conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 3, p. 815-824, 2007.
- BOKULICH, N.A.; BAMFORTH, C.W. The microbiology of malting and brewing. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 77, n. 2, p. 157-172, June 2013.
- BOKULICH, N.A.; BAMFORTH, C. W.; MILLS, D.A. Brewhouse-resident microbiota are responsible for multi-stage fermentation of American coolship ale. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. e35507, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0035507>>. Acesso em: 26 jun. 2015.
- BRANYIK, T. et al. A review of methods of low alcohol and alcohol-free beer production. **Journal of Food Engineering**, v. 108, n. 4, p. 493-506, Feb. 2012.
- CASEY, G. Practical applications of pulsed field electrophoresis and yeast chromosome fingerprinting in brewing QA and R&D. **Technical Quarterly - Master Brewers Association of the Americas**, v. 33, n. 1, p. 1-10, 1996.
- CASEY, G.P.; INGLEDEW, W.M. Ethanol tolerance in yeasts. **CRC Critical Reviews in Microbiology**, v. 13, n. 3, p. 219-280, 1986.
- CASEY, G.P.; MAGNUS, C.A.; INGLEDEW, W. High-gravity brewing: effects of nutrition on yeast composition, fermentative ability, and alcohol production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 639-646, 1984.
- DAENEN, L. **Exploitation of the flavour potential of hop and sour cherry glycosides by *Saccharomyces* and *Brettanomyces* glycoside hydrolase activities**. 2008. Disponível em: <<http://www.kuleuven.be/doctorsaatsverdediging/fiches/3E04/3E040253.htm>>. Acesso em: 26 jun. 2015.
- DAENEN, L. et al. Flavour enhancement in beer: hydrolysis of hop glycosides by yeast beta-glucosidase. **Cerevisia: Belgian Journal of Brewing and Biotechnology**, v. 32, n. 1, p. 24-36, 2007.
- _____. Screening and evaluation of the glucoside hydrolase activity in *Saccharomyces* and *Brettanomyces* brewing yeasts. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, n. 2, p. 478-488, 2008.

- DEQUIN, S.; CASAREGOLA, S. The genomes of fermentative *Saccharomyces*. **Comptes Rendus Biologies**, v. 334, n. 8/9, p. 687-693, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1631069111001521>>. Acesso em: 26 jun. 2015.
- DIJKEN, H. The 21st International Specialized Symposium on Yeasts (ISSY 2001) "Biochemistry, Genetics, Biotechnology and Ecology of Non-conventional Yeasts (NCY)". **FEMS Yeast Research**, v. 1, n. 4, p. 337-338, 2002.
- ERTEN, H.; CAMPBELL, L. The production of low-alcohol wines by aerobic yeasts. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 107, n. 4, p. 207-215, July/Aug. 2001.
- ESSLINGER, H.M. **Handbook of brewing: processes, technology, markets**. New York: John Wiley, 2009.
- GAMERO, A. et al. Wine, beer and cider: unravelling the aroma profile. In: PIŠKUR, J.; COMPAGNO, C. (Ed.). **Molecular mechanisms in yeast carbon metabolism**. Berlin; Heidelberg: Springer, 2014. chap. 10, p. 261-297.
- GUNATA, Z. et al. Sequential enzymic hydrolysis of potentially aromatic glycosides from grape. **Carbohydrate Research**, v. 184, p. 139-149, 1988.
- HOMAN, M.M. Beer and its drinkers: an ancient near Eastern love story. **Near Eastern Archaeology**, v. 67, n. 2, p. 84-95, 2004.
- HU, X. et al. Genetic dissection of ethanol tolerance in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 175, n. 3, p. 1479-1487, 2007.
- KUMARA, H.S.; DE CORT, S.; VERACHTERT, H. Localization and characterization of α -glucosidase activity in *Brettanomyces lambicus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 8, p. 2352-2358, 1993.
- LI, T. K. Quantifying the risk for alcohol-use and alcohol-attributable health disorders: Present findings and future research needs. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 23, n. s1, p. S2-S8, 2008.
- MEILGAARD, M. C. Prediction of flavor differences between beers from their chemical composition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 30, n. 6, p. 1009-1017, 1982.
- MORADO, R. Larousse da cerveja. In: BRASIL, L.D. (Ed.). **Larousse da cerveja**. São Paulo: Janice Florido, 2009. cap. 1, p.20-61.
- MURRAY, D.W.; O'NEILL, M.A. Craft beer: penetrating a niche market. **British Food Journal**, v. 114, n. 7, p. 899-909, 2012.
- NEBREDA, A.R. et al. Cloning of genes related to exo- β -glucanase production in *Saccharomyces cerevisiae*: characterization of an exo- β -glucanase structural gene. **Gene**, v. 47, n. 2, p. 245-259, 1986.

PEDDIE, H.A. Ester formation in brewery fermentations. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 96, n. 5, p. 327-331, 1990.

PERPÈTE, P.; COLLIN, S. Influence of beer ethanol content on the wort flavour perception. **Food Chemistry**, v. 71, n. 3, p. 379-385, 2000. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814600001795>>. Acesso em: 26 jun. 2015.

PIRES, E. et al. Yeast: the soul of beer's aroma: a review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 5, p. 1937-1949, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00253-013-5470-0>>. Acesso em: 26 jun. 2015.

PRIEST, F.G.; STEWART, G.G. **Handbook of brewing**. Boca Raton: CRC Press, 2006.

PULIGUNDLA, P. et al. Very high gravity (VHG) ethanolic brewing and fermentation: a research update. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 38, n. 9, p. 1133-1144, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10295-011-0999-3>>. Acesso em: 26 jun. 2015.

ROJAS, V. et al. Studies on acetate ester production by non-Saccharomyces wine yeasts. **International Journal of Food Microbiology**, v. 70, n. 3, p. 283-289, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160501005529>>. Acesso em: 26 jun. 2015.

ROOM, R.; BABOR, T.; REHM, J. Alcohol and public health. **The Lancet**, v. 365, n. 9458, p. 519-530, 2005.

ROSI, I.; VINELLA, M.; DOMIZIO, P. Characterization of β -glucosidase activity in yeasts of oenological origin. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 77, n. 5, p. 519-527, 1994.

ROSSOUW, D.; NÆS, T.; BAUER, F.F. Linking gene regulation and the exo-metabolome: a comparative transcriptomics approach to identify genes that impact on the production of volatile aroma compounds in yeast. **BMC Genomics**, v. 9, n. 1, p. 530, 2008.

SAHA, B.C.; BOTHAST, R.J. Glucose tolerant and thermophilic β -glucosidases from yeasts. **Biotechnology Letters**, v. 18, n. 2, p. 155-158, 1996.

SARENS, S.; SWIEGERS, J.H. **Enhancement of beer flavor by a combination of Pichia yeast and different hop varieties**. Google Patents 2012. Disponível em: <<http://www.google.com/patents/WO2013030398A1?cl=en>>. Acesso em: 26 jun. 2015.

SARRY, J.-E.; GÜNATA, Z. Plant and microbial glycoside hydrolases: volatile release from glycosidic aroma precursors. **Food Chemistry**, v. 87, n. 4, p. 509-521, 2004.

SPAEPEN, M.; OEVELEN, D.; VERACHTERT, H. Fatty acids and esters produced during the spontaneous fermentation of lambic and gueuze. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 84, n. 5, p. 278-282, 1978.

SPAEPEN, M.; VERACHTERT, H. Esterase activity in the genus *Brettanomyces*. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 88, n. 1, p. 11-17, 1982.

SPARROW, J. **Wild brews: beer beyond the influence of brewer's yeast**. Boulder: Brewers Publ., 2005. 256 p.

SPITAEELS, F. et al. The microbial diversity of traditional spontaneously fermented lambic beer. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. e95384, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0095384>>. Acesso em: 26 jun. 2015.

_____. The microbial diversity of an industrially produced lambic beer shares members of a traditionally produced one and reveals a core microbiota for lambic beer fermentation. **Food Microbiology**, v. 49, p. 23-32, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S074000201500012X>>. Acesso em: 26 jun. 2015.

STEENSELS, J.; VERSTREPEN, K.J. Taming wild yeast: potential of conventional and nonconventional yeasts in industrial fermentations. **Annual Review of Microbiology**, v. 68, p. 61-80, 2014.

STREJC, J. et al. Production of alcohol-free beer with elevated amounts of flavouring compounds using lager yeast mutants. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 119, n. 3, p. 149-155, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/jib.72>>. Acesso em: 26 jun. 2015.

SWANGKEAW, J. et al. The characterisation of a novel *Pichia anomala* β -glucosidase with potentially aroma-enhancing capabilities in wine. **Annals of Microbiology**, v. 59, n. 2, p. 335-343, 2009.

VANDERHAEGEN, B. et al. Bioflavoring and beer refermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 62, n. 2/3, p. 140-150, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00253-003-1340-5>>. Acesso em: 26 jun. 2015.

VERSTREPEN, K.J. et al. Flavor-active esters: adding fruitiness to beer. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 96, n. 2, p. 110-118, 2003.

WHITE, C.; ZAINASHEFF, J. **Yeast: the practical guide to beer fermentation**. Boulder: Brewers Publ., 2010. 304 p.

WINTERHALTER, P.; SKOUROUMOUNIS, G.K. Glycoconjugated aroma compounds: occurrence, role and biotechnological transformation. In: _____. (Ed.). **Biotechnology of aroma compounds**. Berlin: Springer, 1997. p. 73-105.

YAKOBSON, C. **Pure culture fermentation characteristics of *Brettanomyces* yeast species and their use in the brewing industry**. Thesis (Master's) - Heriot-Watt University, 2010. Disponível em: <<http://www.brettanomycesproject.com/dissertation/>>. Acesso em: 26 jun. 2015.

ZUFALL, C.; WACKERBAUER, K. Process engineering parameters for the dealcoholisation of beer by means of falling film evaporation and its influence on beer quality. **Monatsschrift für Brauwissenschaft**, v. 53, n. 7/8, p. 124-137, 2000.