Capítulo 24

Leveduras não convencionais como opção para produção de cervejas: uma revisão sistemática

Unconventional yeasts as a brewing option: a systematic review

https://doi.org/10.56238/cienciasaudeestuepesv1-024

Letícia Perin Cunha
Curso de Engenharia Química, Universidade Vila Velha - UVV.
ORCID: 0000-0001-6542-3117

Danuza Barros Gomes
Programa de pós-graduação em Assistência Farmacêutica, Universidade Vila Velha – UVV
ORCID: 0000-0002-9489-795X

Fernanda Domingues Gomes Martins
Programa de pós-graduação em Assistência Farmacêutica, Universidade Vila Velha – UVV
ORCID: 0000-0003-4549-2814

Elton Carvalho Costa
Programa de pós-graduação em Assistência Farmacêutica, Universidade Vila Velha – UVV

Nazaré Souza Bissoli
Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo – UFES
ORCID: 0000-0002-3456-2437

Girlandia Alexandre Brasil
Programa de pós-graduação em Assistência Farmacêutica, Universidade Vila Velha – UVV
ORCID: 0000-0002-5455-7141

RESUMO
O crescimento do mercado cervejeiro tem incitado buscas por inovação na forma de produzir cerveja para proporcionar produtos diferenciados. A produção de cervejas com leveduras não convencionais tem sido uma alternativa interessante para a geração de sabores e aromas diferenciados. A literatura demonstra a utilização de algumas novas espécies de leveduras para produção de cervejas com características únicas, entretanto, carece uma revisão sistemática que apresente as principais leveduras com potencial cervejeiro. O objetivo desta revisão sistemática é reunir artigos que investigaram a utilização de leveduras com o propósito de produzir cervejas e destacar as principais características observadas. Para isso, foram pesquisados das principais bases de dados (Science Direct e PubMed) e selecionados 17 artigos que descreviam a utilização de 19 espécies de leveduras e 2 bactérias na fermentação de cervejas. As informações de cada espécie foram reunidas e descritas separadamente, evidenciando os potenciais individuais de cada uma. O estudo revelou características específicas e únicas produzidas pelas leveduras não convencionais que impactam de maneira interessante na cerveja. Deste modo, foi possível concluir que as leveduras não convencionais proporcionam cervejas com perfil de sabor e aroma aprimorados e distintos das tradicionais Saccharomyces cerevisiae.

Palavras-chave: Leveduras, Cerveja, Bebida fermentada.

ABSTRACT
The growth of the beer market has stimulated the search for innovation in the way of producing beer to provide differentiated products. The production of beers with non-conventional yeasts has been an interesting alternative for the generation of differentiated flavors and aromas. The literature demonstrates the use of some new yeast species to produce beers with unique characteristics, however, a systematic review presenting the main yeasts with brewing potential is lacking. The objective of this systematic review is to gather articles that investigated the use of yeasts for the purpose of producing beers and highlight the main characteristics observed. For this, the main databases (Science Direct and PubMed) were searched and 17 articles were selected that described the use of 19 yeast species and 2 bacteria in beer fermentation. The information for each species was gathered and described separately, highlighting the individual potentials of each. The study revealed specific and unique characteristics produced by the

unconventional yeasts that have an interesting impact on the beer. Thus, it was possible to conclude that the non-conventional yeasts provide beers with enhanced flavor and aroma profiles distinct from the traditional Saccharomyces cerevisiae.

Keywords: Yeast, Beer, Fermented beverage.

1 INTRODUÇÃO

A cerveja é uma bebida alcoólica fermentada conhecida e apreciada em todo mundo. Atualmente, cervejas produzidas artesanalmente, especialmente em micro cervejarias, têm ganhado visibilidade graças à ampla variedade de cervejas produzidas e com estilos originais. Analogamente, ocorre uma busca crescente por inovação na produção dessa bebida, de forma a conseguir destaque no mercado (MAPA, 2020).

O processo produtivo da cerveja permite inúmeras possibilidades de inovação, com a adição de ingredientes na mistura a ser fermentada, o uso de técnicas diferenciadas e, ainda, na mudança das leveduras fermentadoras empregadas. Na fermentação alcoólica, as leveduras produzem diversos subprodutos e metabólitos intermediários que contribuem diretamente para o desenvolvimento sensorial da cerveja, sendo, portanto, um importante ponto a ser avaliado quando o desejo é produção de cervejas diferenciadas (Pires et al., 2014).

Tradicionalmente são utilizadas espécies domesticadas de *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) e *Saccharomyces pastorianus* para a fermentação da cerveja (Meier-Dörnberg et al., 2017). O uso destas espécies é benéfico no que diz respeito à constância, eficiência do processo e qualidade esperada da cerveja, mas restringe o potencial das leveduras na produção de aromas e sabores (Steensels et. al, 2015). Em busca de características sensoriais mais complexas, especialistas em cerveja têm buscado por outros tipos de leveduras, não *Saccharomyces*, que possam ser utilizadas na produção dessa bebida. O uso de leveduras não convencionais aplicadas com diferentes estratégias apresenta a possibilidade de reinventar métodos antigos, bem como criar novos métodos para produção de cervejas originais (Basso et al., 2016).

Sabe-se que as leveduras não convencionais têm grande potencial para produção de aromas e sabores, deste modo, o objetivo deste estudo foi compilar os artigos científicos publicados nos últimos dez anos sobre a utilização de leveduras não convencionais na fermentação de cervejas e os impactos positivos vinculados ao seu uso.

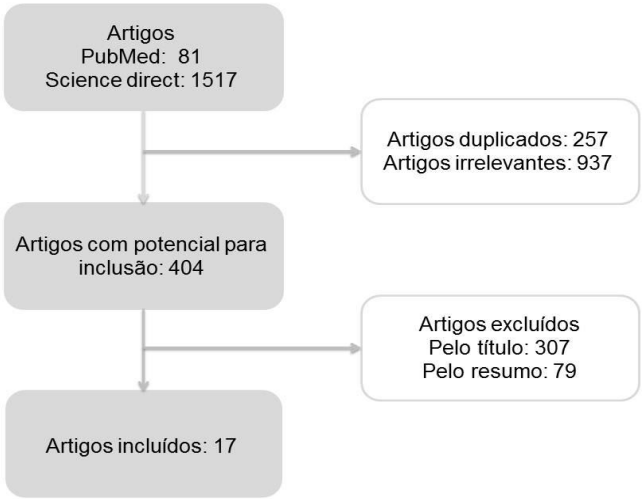
2 METODOLOGIA

2.1 SELEÇÃO DOS ARTIGOS

Os artigos foram selecionados utilizando as principais bases de dados (Science Direct e Pubmed). Foram usados os seguintes indexadores: '*beer non conventional yeasts*' e '*beer non Saccharomyces*' e a pesquisa foi direcionada aos artigos publicados entre 2010 e 2021. Foram incluídos na revisão artigos

originais onde houve a produção de cerveja com leveduras diferentes de *Saccharomyces cerevisiae*, foram excluídos capítulos de livros, artigos duplicados e considerados irrelevantes, ou seja, que não traziam informações a respeito de leveduras não convencionais para a produção de cerveja, ou que falavam exclusivamente de metodologia para a produção sem levar em consideração o impacto das leveduras no processo.

Figura 1: Fluxograma para a seleção dos artigos



3 ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

As leveduras não convencionais têm muito potencial para a produção de cervejas, existindo uma imensidão de sabores que podem ser alcançados a partir da sua utilização. A presente revisão sistemática mostra que a utilização de leveduras não tradicionais pode conferir características organolépticas atraentes para as bebidas, ressaltando que o processo deve ser adequado à cepa utilizada, pois a sensibilidade à alguns parâmetros pode comprometer a qualidade do produto final (Michel et al., 2016; Bellut, Krogerus, Arendt, 2020; Johansson et al., 2021).

As cervejas inoculadas com novas espécies obtiveram sabores e aromas únicos, decorrentes principalmente da quantidade e qualidade de ésteres formados na bebida (Canonico et al., 2016; Michel et al., 2016; Osborn et al., 2018; Bellut, Krogerus, Arendt, 2020). Os ésteres são compostos formados durante a fermentação e impactam diretamente nas características sensoriais da cerveja, para isso esses compostos devem estar presentes em uma concentração propícia para a percepção do sabor. A **Tabela 1** indica os limites de concentração dos principais ésteres e compostos presentes na cerveja para exibir características de sabor. A combinação entre ésteres pode provocar sabores diferentes do esperado ou ainda exibir sabores em concentrações abaixo do limite de percepção (Saison et al., 2009).

Tabela 1: Limites de sabor de compostos da cerveja

Composto	Limite (mg/L)	Sabor
Éster acetato		
Acetato de etila	25 - 30	Frutado, solvente
Acetato de isoamila	1,2 - 2,0	Banana
Acetato de fenil-etil	0,2 - 3,8	Rosas, mel
Etil éster		
Hexanoato de etila	0,2 - 0.23	Maçã, frutado
Octanoato de etila	0.9 - 1,0	Maçã, anis
Álcoois Superiores		
Álcool amílico	50 - 70	Alcoólico, solvente
Álcool isoamílico	50 - 65	Alcoólico, banana
Isobutanol	100	Solvente
Propanol	600	Álcool, doce
2-fenil-etanol	40	Roses
Compostos fenólicos		
4-vinil guaiacol	0,25	Cravo, fenólico, amargo
4-etil guaiacol	0,13	Cravo, fenólico, doce
4-metil guaiacol	0,2	Medicinal, queimado
Off flavor		
Acetaldeído	10-20	Maçã imatura
Diacetil	0,07 - 0,15	Amanteigado

Fonte: [1]Saison et al. (2009); [2]Callemien, Collin (2009); [3]Krogerus, Gibson (2013); [4]Pires et al. (2014).

Outro produto da fermentação produzido pelas leveduras são os álcoois superiores. Eles são compostos que orientam o aroma das cervejas, no entanto, cervejas produzidas com leveduras não convencionais frequentemente exibem menor quantidade de álcoois que a tradicional *S. cerevisiae*, o que é associado à capacidade fermentativa das leveduras (Holt et al., 2018; Osborn et al., 2018). A fabricação de cervejas co-inoculadas com *S. cerevisiae* é uma forma promissora de mesclar as características de sabor das leveduras não convencionais associadas ao potencial fermentativo de *S. cerevisiae*. Além disso, muitos estudos indicam sinergia entre as diferentes leveduras, proporcionando quantidade de compostos desejáveis aumentadas nas fermentações mistas (Canonico, Comitini, Ciani, 2017; Kiat Toh, Chua, Liu, 2018; Capece et al., 2018; Holt et al., 2018; Coelho et al., 2020).

A maioria das leveduras não convencionais estudadas possuem capacidade fermentativa reduzida acarretando baixos teores alcoólicos. Este aspecto é interessante, pois possibilita a obtenção natural de cervejas de baixo teor alcoólico, sem utilização de processos físicos, sendo uma alternativa interessante para a indústria que produzem esse estilo de cerveja, tendo em vista que essa mudança no processo acarreta

redução de custos (De Francesco et al., 2018; Bellut, Krogerus, Arendt, 2020; Johansson et al., 2021). A graduação alcoólica das cervejas foi apresentada em % ABV (alcohol by volume). Além disso, a diversidade de sabores produzidos por essas leveduras abre inúmeras possibilidades de produção de diferentes cervejas para a indústria.

Esse estudo sistemático abrange a utilização de 19 espécies de leveduras não convencionais, além da utilização de duas cepas bacterianas para produção de cervejas. A **Tabela 2** traz os achados principais de cada artigo, ressaltando o melhor da utilização das leveduras. Algumas espécies relatadas foram abordadas apenas uma vez na literatura para a produção de cervejas, sugerindo que ainda há muito para ser estudado e conhecido sobre essas leveduras para cervejas.

Tabela 02: Principais espécies não convencionais estudadas e os achados mais importantes encontrados nos artigos.

Gênero	Espécie	Descobertas	Referência
Pichia	*kluyverii*	A espécie promoveu aumento na produção de acetato de isoamila, composto com sabor de banana. Contudo, em fermentações sequenciais apresentou baixo rendimento.	Holt et al. (2018)
Brettanomyces	*anomalus*	As diferentes espécies apresentaram aumento de compostos etilfenólicos que dão notas de especiarias.	
	bruxellensis		
Torulaspora	*delbrueckii*	A espécie realçou o composto 4-vinil guaiacol que possui aroma semelhante ao cravo.	
Lachancea	*thermotolerans*	Em co-cultura com *S. cerevisiae* a espécie reduziu o conteúdo de acetaldeído e aumentou a quantidade de álcoois superiores. Em cultura isolada a espécie produziu grande quantidade de ácido lático. Em ambas as fermentações a espécie mostrou aumento de butirato de etila e acetato de etila.	Canonico et al. (2019)
Zygotorulaspora	*florentina*	A espécie reduziu o conteúdo de acetaldeído e aumentou a quantidade de álcoois superiores em co-cultura com *S. cerevisiae*. Adicionalmente, a espécie se destaca pelo aumento no conteúdo de acetato de isoamila e α-terpineol.	
Wickerhamomyces	*anomalus*	A espécie reduziu o conteúdo de acetaldeído em co-cultura com *S. cerevisiae* e aumentou a quantidade de álcoois superiores em culturas isoladas. Houve redução dos principais compostos de aroma, mas mostrou aumento de butirato de etila e acetato de etila.	
Torulaspora	*delbrueckii*	A espécie em co-cultura com *S. cerevisiae* em diferentes proporções evidenciou interações metabólicas dependentes. As cervejas produzidas em co-cultura apresentaram grau de atenuação de açúcares no mosto e produção de etanol comparáveis à referência *S. cerevisiae*, maior assimilação de aminoácidos que as culturas isoladas e maior quantidade de voláteis.	Kiat Toh; Chua; Liu (2018)
Lachancea	*fermentati*	As cepas isoladas da kombucha produziram cervejas com baixo teor alcoólico, baixa sensibilidade ao álcool e condições ácidas e maior sensibilidade ao estresse osmótico. A interrupção da fermentação refletiu em altos níveis de diacetil, acima do limite de sabor.	Bellut; Krogerus; Arendt (2020)
Mrakia	*gelida*	Em comparação a *Saccharomyces ludwigii*, que e uma levedura comercial utilizada na produção de cervejas com baixo teor de alcóolico, a *M. gelida* obteve baixo teor alcoólico e baixa produção de diacetil. A cerveja produzida apresentou aspecto visual límpido, perfil de aroma intenso e baixo valor de doçura.	De Francesco et al. (2018)
Cyberlindnera	*fabianii*	Tanto *C. fabianii* quanto *P. kudriavzervii* produziram, isoladamente, maior quantidade de ésteres que a referência *S. cerevisiae* e em co-cultura (*S. cerevisiae*) houve a produção de cervejas com menor teor alcoólico e mais ésteres.	Van Rijswijck et al. (2017)
Pichia	*kudriavzevii*		

Torulaspora	*delbrueckii*	Em co-cultura com diferentes cepas *S. cerevisiae* produziu níveis mais elevados de álcoois superiores e aumentou o conteúdo de acetato de etila (sabor frutado) e acetato de isoamila (sabor de banana). De modo contrário, hexanoato de etila e octanoato de etila foram reduzidos. As cervejas produzidas também foram afetadas pelas cepas *S. cerevisiae* produzindo sabores distintos entre elas.	Canonico; Comitini; Ciani (2017)
Torulaspora	*delbrueckii*	A co-cultura com *S. cerevisiae* proporcionou níveis aumentados de hexanoato de etila, octanoato de etila e acetato de fenil etila. Já os níveis de álcool fenetílico e acetato de isoamila (aromas florais e frutados) foram reduzidos na presença de *T. delbrueckii*, a cerveja final possuía perfil analítico e aromático diferenciado. A cerveja produzida pela cultura isolada continha baixo teor alcoólico e sabor agradável e aromático.	Canonico et al. (2016)
Saccharomyces	*cerevisiae var. boulardii*	É uma levedura probiótica e a sua presença em co-cultura com *S. cerevisiae* determinou um aumento na atividade antioxidante e no teor de polifenóis. O teor dos principais compostos voláteis nas cervejas indica que o aroma da cerveja não foi afetado negativamente por *S. boulardii*.	Capece et al. (2018)
Dekkera	*bruxellenis*	A co-inoculação com *S. cerevisiae* reduziu o conteúdo de ácido acético e ácidos graxos voláteis. Acetato de isobutila foi produzido em maior quantidade o que contribuiu no realce do aroma frutado nas cervejas com envelhecimento acelerado. Embora em concentrações menores que a cultura isolada, as co-culturas também produziram linalol e geraniol, monoterpenos que conferem à cerveja um aroma floral agradável.	Coelho et al. (2020)
Lactobacillus	*paracasei*	A bactéria é considerado um probiótico. Ela é incapaz de sobreviver em mosto com lúpulo, tendo crescimento quando co-fermentado com *S. cerevisae* sem lúpulo. A fermentação leva a produção significativa de ácido lático. Observa-se melhora da viabilidade probiótica durante armazenamento com a adição de iso-α-ácidos em baixas temperaturas	Alcine Chan et al. (2019)
Hanseniaspora	*vineae*	A cerveja produzida pela cepa isolada tem como característica ser ligeiramente azeda com notas de cidra de maça e com produção de ácido láctico durante a fermentação.	Osborn et al. (2018)
	fermentati	As cervejas produzidas com essa cepa possuem sabor azedo acentuado com sabores leves de abacaxi e manga. Há produção de ácido láctico durante a fermentação.	
	thermotolerans	As cepas de *L. thermotolerans* exibiram diferenças entre as espécies na produção de ácido láctico e durante a análise sensorial das cervejas.	Osborn et al. (2018)
Schizosaccharomyces	*japonicus*	Cervejas com perfil de aroma e sabor azedo, frutado e de frutas de caroço com produção de ácido láctico durante a fermentação.	
Wickerhamomyces	*anomalus*	A cerveja produzida tem acidez menos intensa e característica limpa, aromática e frutada com notas de pera, maçã e damasco com produção de ácido láctico durante a fermentação.	
Pediococcus	*acidilactici*	A bactéria é incapaz de crescer na cerveja de modo a não causar deterioração. Por outro lado, produz bacteriocina que é termicamente estável e eficaz na inibição de bactérias do ácido láctico, prevenindo a contaminação do mosto.	Ahn; Kim; Kim (2017)
Torulaspora	*delbrueckii*	As cepas de *T. delbrueckii* foram capazes de fermentar parcialmente os açúcares do mosto e mostraram alta tolerância a compostos de lúpulo e etanol. As cervejas produzidas exibiram aromas florais e frutados distintos entre as cepas.	Michel et al. (2016)
Lachancea	*thermotolerans*	A espécie demonstrou alta adaptabilidade às condições de fermentação produzindo teor alcoólico e teor de extrato real acima da média para leveduras não *Saccharomyces*. A cepa exibiu baixa produção de ácido láctico e baixa influência na redução do pH, diferentemente de cepas *L. thermotolerans* de referência.	Zdaniewicz et al. (2020)
Cyberlindnera	*fabianii*	*C. fabianii* exibiu tolerância a altas temperaturas e produziu cervejas com baixo teor alcoólico. A cerveja continha concentrações de acetato de etila acima do limite de sabor,	Johansson et al. (2021)

		prejudicial à cerveja pois transmite aroma semelhante à solvente.	
Kluyveromyces	*marxianus*	*K. marxianus* exibiu tolerância a altas temperaturas e produziu cervejas com baixo teor alcoólico. Acetaldeído (sabor estranho) e acetato de 2-fenil etil (sabor adocicado de rosa, maça e mel) estavam presentes em concentrações acima dos limites de sabor. Além disso, notou-se um aumento inesperado nas concentrações de aldeídos de cadeia ramificada.	
Hanseniaspora	*uvarum*	Produção de cervejas com baixo teor alcoólico e aroma característico de cravo-da-índia de 4-vinilguaiacol.	Johansson et al. (2021)
Pichia	*kudriavzevii*	*P. kudriavzevii* exibiu tolerância a altas temperaturas e produziu cervejas com baixo teor alcoólico. Assim como *C. fabianii*, a cerveja continha concentrações de acetato de etila acima do limite de sabor. A espécie ainda demonstrou capacidade limitada de redução de aldeídos de cadeia ramificada.	
	fermentans	Produção de cervejas com baixo teor alcoólico e aroma característico de cravo-da-índia de 4-vinilguaiacol. A análise sensorial revelou sabor fenólico agradável e aroma com notas de banana e melão inesperados e difíceis de correlacionar com os compostos voláteis identificados na cerveja.	
Kazachstania	servazzii	*K. servazzii* exibiu sensibilidade ao etanol e produziu cervejas com baixo teor alcoólico. A análise sensorial revelou sabor doce típico em cervejas de baixo teor alcoólico e aroma com notas de pera e maçã associados ao éster acetato de 3-metilbutila, presente em níveis residuais em todas as cervejas.	
Saccharomyces	*cerevisiae var. boulardii*	A espécie foi capaz de crescer nos açúcares do mosto (glicose, maltose e maltotriose) e o efeito dos ácidos iso-α-amargos no crescimento da levedura foram insignificantes para o nível de amargor. A temperatura de fermentação e a taxa de inóculo impactaram significativamente a formação de ésteres totais e álcoois superiores da cerveja. O aroma e sabor das cervejas sem álcool foram descritos como frutado, cravo e ácido.	Senkarcinova et al. (2018)

Fonte: O autor (2020).

3.1 TORULASPORA

Torulaspora delbrueckii (*T. delbrueckii)* é uma levedura *não Saccharomyces* de grande interesse na produção de vinhos, devido à redução da acidez volátil e composição de aroma e sabores, proporcionando vinhos com alta complexidade aromática (Jolly, Varela, Pretorius, 2014). Analogamente, *T. delbrueckii* para produção de cervejas, em fermentação com inóculo puro ou adicionado à *S. cerevisiae*, apresenta características de sabor aprimoradas à bebida.

Johansson et al. (2021) avaliaram a *T. delbrueckii* na fabricação de cerveja e identificou sensibilidade da levedura ao etanol e ao estresse osmótico, fatores determinantes para atuação da espécie como contaminante do mosto ou da cerveja. A sensibilidade ao etanol condiz com a tolerância indicada por Michel et al. (2016). Outro aspecto interessante é que a *T. delbrueckii* foi capaz de crescer em mosto lupulado, ainda que concentrações mais altas de iso-α-ácidos do lúpulo tivessem impactado negativamente no crescimento da levedura (Michel et al., 2016).

Michel et al. (2016) observaram altos níveis de aminoácidos no mosto de cerveja pouco fermentado por *T. delbrueckii* e propôs a utilização de *S. cerevisiae* em fermentação sequencial para propagação dos aminoácidos no mosto até a atenuação final da cerveja. Em estudos posteriores, Kiat Toh, Chua e Liu (2018) encontraram assimilação de aminoácidos significativamente maior em cervejas co-inoculadas com *T.*

delbrueckii e *S. cerevisiae* do que em suas culturas isoladas, indicando interações metabólicas interessantes entre as espécies.

A cinética de fermentação dessa espécie é lenta, relacionada à baixa atenuação do mosto. Em co-fermentações com *S. cerevisiae* ocorre redução na velocidade de fermentação do mosto, quando comparado à cinética de *S. cerevisiae* isolada, sendo essa redução proporcional à razão do inóculo utilizada (Canonico et al., 2016; Canonico, Comitini, Ciani 2017). A contagem de células viáveis também indica que ocorre competição entre as espécies, com redução do crescimento ou até mesmo morte celular precoce de *T. delbrueckii* (Canonico et al., 2016; Canonico, Comitini, Ciani, 2017; Kiat Toh, Chua, Liu, 2018).

Um aspecto relevante para a escolha de uma levedura não convencional é o teor alcoólico. Cervejas produzidas por culturas puras de *T. delbrueckii* apresentaram baixo teor alcoólico (0,8-2,7% ABV). Sendo esse valor aumentado quando em co-fermentação com *S. cerevisiae* (4,5-4,9% ABV) (Canonico et al., 2016; Michel et al., 2016; Canonico, Comitini, Ciani, 2017; Holt et al. 2018; Kiat Toh, Chua, Liu, 2018; Johansson et al., 2021).

Ao investigar diferentes cepas de *T. delbrueckii* Michel et al. (2016) observaram que a cepa isolada do sorgo de conhaque foi capaz de produzir cerveja com teor alcóolico de 4,0% ABV. Valor esse justificado pelo consumo de maltose, por parte da levedura, entretanto, outros autores não observaram essa capacidade (Canonico et al., 2016; Canonico, Comitini, Ciani, 2017; Kiat Toh, Chua, Liu, 2018).

A levedura produziu baixas concentrações de álcoois superiores, havendo aumento com co-fermentação com *S. cerevisiae* (Canonico et al., 2016; Michel et al., 2016; Canonico, Comitini, Ciani, 2017;). Contudo, enquanto Canonico et al. (2016) observaram concentrações intermediárias de álcoois superiores quando houve co-inoculação com *S. cerevisiae*, Canonico, Comitini e Ciani (2017) encontraram níveis maiores de álcoois superiores quando co-inoculados do que as fermentações de cultura isolada de *S. cerevisiae*. Kiat Toh, Chua e Liu (2018) observaram valores de álcool isoamílico, que produz uma bebida com sabor alcoólico e de banana característico (Pires et al., 2014), maiores na cultura *T. delbrueckii* que em co-culturas e isolados de *S. cerevisiae*.

Além disso, a levedura produziu níveis reduzidos de 2-fenil-etanol. Fermentações puras corresponderam a valores entre 5,03 e 23,70 mg/L enquanto co-fermentações com *S. cerevisiae* continham entre 15,48 e 30,69 mg/L (Canonico et al., 2016; Michel et al., 2016). Esse achado demonstra que *T. delbrueckii* é capaz de produzir quantidades interessantes deste composto, que confere aroma de rosas a bebida (Pires, 2014).

Johansson et al. (2021) identificaram *T. delbrueckii* como eficiente redutor de aldeídos de cadeia ramificada. No entanto, foi observado produção de acetaldeído (nome popular dado ao composto etanal) opular dado ao composto na presença de *T. delbrueckii* em maiores quantidades, principalmente nas cervejas co-inoculadas com *S. cerevisiae* (Canonico et al., 2016; Canonico, Comitini, Ciani, 2017; Kiat Toh, Chua, Liu, 2018). O acetaldeído é considerado um *off flavor* com sabor de maçã imatura, indesejável nas cervejas (Saison et al., 2009).

Em culturas isoladas de *T. delbrueckii*, Michel et al. (2016) observaram que a levedura obtida do sorgo de conhaque foi a única que produziu quantidade significativa de acetato de etila (23,40 mg/L), responsável por aroma frutado (Pires et al., 2014). Holt et al. (2018) encontraram produção de 71,5 mg/L de acetato de etila, quantidade muito além do limite de sabor. Outros ésteres (acetato de fenil-etil, hexanoato de etila e octanoato de etila) apresentaram concentração variada de acordo com a cepa. Entretanto, foi observado aumento nesses níveis em co-cultura com *S. cerevisiae* (Canonico et al., 2016; Canonico, Comitini, Ciani, 2017; Kiat Toh, Chua, Liu, 2018;).

Estudos demonstraram resultados divergentes sobre o conteúdo de ácido acético em cervejas produzidas com *T. delbrueckii* em monocultura ou em co-cultura. Canonico et al. (2016) obtiveram concentrações de ácido acético maiores em culturas mistas (230 e 290 mg/L) do que em culturas puras (150 mg/L). Por outro lado, Canonico, Comitini e Ciani (2017) demonstraram concentrações de ácido acético superiores em culturas puras (410 mg/L) do que em culturas mistas (320-380 mg/L), enquanto Kiat Toh, Chua e Liu (2018) não observaram diferença entre mono e co-culturas.

Michel et al. (2016) identificaram níveis significativos de diacetil (nome popular dado ao composto 2,3-butanodiona) (0,10-0,43 mg/L), um composto identificado como *off flavor* de sabor amanteigado e que pode ser percebido ainda que a concentração esteja abaixo do limite de percepção (Krogerus, Gibson, 2013). Holt et al. (2018) apontaram altos níveis de 4-vinil guaiacol produzidos por *T. delbrueckii*. Esse composto confere aroma de cravo, fenólico e amargo (Callemien, Collin, 2009). A cepa produziu 5,77 mg/L de 4-vinil guaiacol em culturas puras e 3,04 mg/L em co-culturas, acima do limite de percepção (Callemien, Collin, 2009).

A análise sensorial realizada por Michel et al. (2016) foi realizada com diferentes cepas de *T. delbrueckii* em cultura pura, identificando perfis de sabor significativamente diferentes para cervejas produzidas por linhagens diferentes de leveduras. Foi identificado sabor de mosto em todas as cervejas relacionado aos resíduos de maltose e maltotriose. Análises descritivas mostraram uma tendência geral das cervas para sabores de pera e mel. Canonico et al. (2016) realizou análise sensorial em cervejas co-inoculadas com *S. cerevisiae*, exibindo diferenças significativas relacionadas às razões de inóculo. Cervejas com proporção 1:1 de *S. cerevisiae* e *T. delbrueckii* apresentaram notas de cereais (*off flavor*), enquanto cervejas na proporção 1:20 continham notas frutadas, de éster e lúpulo melhorados, e cervejas puras de *T. delbrueckii* receberam notas de frutas e cítricos. O sabor das cervejas foi aprimorado de acordo com a maior proporção de *T. delbrueckii*.

3.2 LACHANCEA

Poucos estudos relatam a utilização de *Lachancea fermentati* (*L. fermentati*) na fabricação de bebidas. Ainda que e espécie tenha sido identificada em algumas bebidas fermentadas e não fermentadas como vinhos, cachaças, kefir de água, água de côco e suco de frutas, pouco foi relatado sobre seus efeitos sensoriais (Osborn et al., 2018).

Segundo o estudo de Bellut, Krogerus, Arendt, (2020) iso-α-ácidos não influenciaram o crescimento da levedura e foi observado diferenças intra-espécie com relação a sensibilidade ao etanol com *L. fermentati* apresentando, em geral, maior tolerância ao etanol que *S. cerevisiae*. Em contrapartida, pouca diferença intra-espécie foi exibida para tolerância ao estresse osmótico e a acidez, sendo que *L. fermentati* foi mais sensível ao estresse osmótico que *S. cerevisiae*, por outro lado a levedura não apresentou tolerância a pH ácido.

Osborn et al. (2018) apresentaram o primeiro relato da levedura na fabricação de cervejas. Os resultados revelaram atenuação razoável do mosto para uma levedura selvagem (60%) e uma redução de pH de 5,0 para 3,55-3,68, produzindo cervejas com sabor ácido e notas de abacaxi e manga. Posteriormente, Bellut, Krogerus e Arendt (2020) encontraram maior teor de atenuação do mosto para espécies *L. fermentati* isoladas de kombucha (entre 55 e 70%), embora a redução do pH tenha sido menor, de 4,99 para 3,96-4,31, a levedura foi capaz de consumir maltose exibindo maior atenuação do mosto e, consequentemente, maior teor alcoólico (2,96-3,76% ABV) quando comparada à outras leveduras não convencionais.

Com relação aos produtos da fermentação, observou-se que a produção de lactato de etila foi maior para *S. cerevisiae* em comparação com *L. fermentati*. Por outro lado, o acetato de etila foi produzido em quantidades significativamente maiores nas cervejas de *L. fermentati* (Bellut, Krogerus, Arendt, 2020). Uma das cepas avaliadas por Bellut, Krogerus, Arendt, (2020) se destacou por produzir maior quantidade de álcoois superiores (120 mg/L) enquanto as outras apresentaram valores abaixo da referência de *S. cerevisiae*.

As leveduras da espécie *L. fermentati* exibiram valores finais de ácido láctico entre 1,33 e 3,47 mM, valores significativamente maiores que a referência *S. cerevisiae*, porém, abaixo do limite de sabor. Bellut, Krogerus e Arendt (2020) otimizaram a produção de ácido láctico interrompendo a fermentação no momento em que essa substância estava em equilíbrio com a doçura dos açúcares residuais do mosto. O resultado foi uma cerveja com teor alcoólico de 1,26% ABV, ácido láctico em 13,6 mM e pH final de 3,56. No entanto, as cervejas continham baixa concentração de ésteres (6,5 mg/L) e diacetil muito acima do limite de sabor (0,27 mg/L), produzindo sabor indesejável nas cervejas. Os resultados da avaliação sensorial indicaram relação de equilíbrio entre doçura dos açúcares residuais de maltose e maltotriose e a acidez do ácido láctico (Bellut, Krogerus, Arendt, 2020).

Lachancea thermotolerans (*L. thermotolerans*) é aplicada na fabricação de vinhos em fermentações mistas com *S. cerevisiae* para aprimorar o sabor da bebida pela geração de ácido lático (Jolly, Varela, Pretorius, 2014). Recentemente essa levedura tem sido notada como viável para a fabricação de cervejas ácidas (Domizio et al., 2016; Osborn et al., 2016).

L. thermotolerans em cultura pura produziu cervejas com alto teor alcoólico (3,12-4,25% ABV) que foi relacionada à sua capacidade de fermentação da maltose (Canonico et al., 2019; Zdaniewicz et al., 2020). Culturas mistas com *S. cerevisiae* exibiram teor alcoólico iguais a 4,03 e 4,09% ABV. Proporção igual dos inóculos na co-fermentação acarretaram inibição mútua entre as espécies, entretanto em proporções

favoráveis à *L. thermotolerans* o crescimento da levedura não foi afetado. A presença de *L. thermotolerans* nas fermentações aumentou o conteúdo de ácido láctico de forma significativa comparado a *S. cerevisiae* (Canonico et al., 2019). Além disso, o crescimento de *L. thermotolerans* não foi afetado por iso-α-ácidos do lúpulo (Domizio et al., 2016; Zdaniewicz et al., 2020).

A levedura promoveu aumento significativo no teor de acetato de etila e butirato de etila em fermentações puras e mistas. Em proporções de inóculo favoráveis à *L. thermotolerans* ocorreu aumento significativo no teor de acetato isoamila enquanto a concentração de hexanoato de etila diminuiu, com o aumento das razões de inoculação. Proporções iguais de *L. thermotolerans* e *S. cerevisiae* também proporcionaram redução no teor de acetaldeído comparadas às outras cervejas (Canonico et al., 2019; Zdaniewicz et al., 2020). Osborn et al. (2018), em concordância com Domizio et al. (2016), encontrou produção de ácido láctico pela levedura *L. thermotolerans*, no entanto, cepas da mesma espécie apresentaram características divergentes na produção, originando cervejas com aspectos sensoriais diferentes, variando entre cerveja muito azeda e cerveja pouco ácida. Zdaniewicz et al. (2020) não identificaram produção de ácido láctico, embora anteriormente, Domizio et al. (2016) tenham identificado esse composto advindo do *L. thermotolerans*. O pH final da bebida foi semelhante ao observado pela levedura tradicional *S. cerevisiae* (4,17–4,3) enquanto Osborn et al. (2018) encontraram pH mais ácido (3,21-3,41).

3.3 PICHIA

As espécies do gênero *Pichia* utilizadas na produção de vinhos estão relacionadas a características enológicas interessantes, contribuindo para o sabor e estabilidade da bebida (Del Mónaco et al., 2014). Saerens e Swiegers (2014) patentearam a produção de cerveja incluindo uma etapa de fermentação com espécies do gênero *Pichia* no mosto com lúpulo, realçando o sabor da cerveja.

No geral, as fermentações com espécies de *Pichia* apresentaram baixos teores de etanol. Van Rijswijck et al. (2017) e Johansson et al. (2021) encontraram teor de etanol para *Pichia kudriavzevii (P. kudriavzevii)* e *Pichia fermentans* (*P. fermentans)* entre 0,6 e 1,0% ABV. Holt et al. (2018) destacou baixíssima produção de etanol por *Pichia kluyverii* (*P. kluyverii*) entre 0,2 e 0,4% ABV, enquanto *Pichia anomala* (*P. anomala*) e *P. kudriavzevii* estavam dentro de uma média de 1,4% ABV. Os baixos teores de etanol exibidos estão relacionados a resíduos de açúcares fermentáveis que não foram consumidos pelas leveduras (Van Rijswijck et al., 2017; Johansson et al., 2021). Holt et al. (2018) relataram que as leveduras não produziram ésteres etílicos acima do limite de percepção e propôs que a produção dos ésteres etílicos está relacionada à fermentação alcoólica. A aplicação da levedura em co-fermentação com *S. cerevisiae* propicia cervejas com teor alcoólico pouco mais elevado do que as culturas puras, além de atribuir perfis metabólitos diferenciados (Van Rijswijck et al., 2017; Holt et al., 2018).

A espécie *P. kudriavzevii* foi capaz de produzir maior quantidade de ésteres comparado à levedura tradicional (Van Rijswijck et al., 2017; Holt et al., 2018; Johansson et al., 2021), assim como a produção

de acetato de etila foi muito acima do limite de sabor (Holt et al., 2018; Johansson et al., 2021). Além disso, a levedura foi a única a produzir álcool isoamílico acima do limite de sabor (Holt et al., 2018), e obteve uma complexidade dos compostos orgânicos voláteis, quando a cerveja foi produzida em cultura mista com *S. cerevisiae* (Van Rijswijck et al., 2017).

Johansson et al. (2021) relatou que *P. kudriavzevii* apresentou tolerância à altas temperaturas e crescimento melhorado em temperaturas acima da referência para fermentação. Além disso, a espécie não demonstrou sensibilidade ao etanol e apresentou alta tolerância ao estresse osmótico.

A espécie *P. anomala* produziu níveis de acetato de etila além do limite de sabor (entre 110 e 249 mg/L) em fermentações puras, o que se modificou em fermentações sequenciais (Holt et al., 2018). Adicionalmente, a espécie exibiu potencial fenólico positivo (POF+) e produziu níveis de 4-vinil guaiacol correspondentes à 2,46 e 2,89 mg/L em fermentações puras. No entanto, em fermentações sequenciais os níveis de 4-vinil guaiacol foram ligeiramente reduzidos (Holt et al., 2018). O composto é característico pelo sabor fenólico e de cravos (Saison et al., 2009). Johansson et al. (2021) identificaram aroma característico de cravo em cervejas fermentadas com *P. fermentans*.

P. kluyverii produziu acetato de isoamila o que confere sabor de banana (Pires et al., 2014), sendo essa espécie destacada entre outras do gênero *Picchia* e outros gêneros estudados por Holt et al. (2018). Em fermentações sequenciais, *P. kluyverii* se distinguiu das demais leveduras apresentando mais semelhanças com *S. cerevisiae*, com níveis de acetato de isoamila e acetato de etila comparáveis à referência (Holt et al., 2018).

P. fermentans apresentou potencial redução de aldeídos de cadeia ramificada, contudo não reduziu 2-metilpropanal, composto que impacta na qualidade final da cerveja (Johansson et al., 2018). A análise sensorial de cervejas produzidas com *P. fermentans* proporcionou sabor fenólico agradável positivo para produção de alguns estilos de cerveja, com notas de banana e melão inesperadas e de difícil associação com os compostos voláteis da cerveja (Johansson et al., 2021).

3.4 CYBERLINDNERA

Cyberlindnera fabianii (*C. fabianii*) foi capaz de suportar altas temperaturas, o que poderia implicar em um possível potencial patogênico da cepa, e não demonstrou sensibilidade ao etanol, entretanto, certa sensibilidade ao estresse osmótico foi identificada, o que é semelhante a outras leveduras não convencionais (Johansson et al., 2021).

A levedura consumiu quantidade limitada de maltose e não consumiu maltotriose. Como resultado, o teor alcoólico da cerveja foi muito baixo, (0,6-1,0% ABV) (Van Rijswijck et al., 2017; Johansson et al., 2021). Cervejas co-fermentadas com *S. cerevisiae* apresentaram teor alcoólico mais elevado (3,8% ABV) associado a menos açúcares residuais.

No geral, a fermentação com *C. fabianii* continha mais ésteres e menos álcoois voláteis que S. cerevisiae. Contudo, o único resultado acima do limite de percepção foi acetato de etila (129,5 mg/L) (Van

Rijswijck et al., 2017; Johansson et al., 2021). Ademais, *C. fabianii* foi capaz de reduzir aldeídos de cadeia ramificada, ainda que dependente do composto (Johansson et al., 2021).

Van Rijswijck et al. (2017) estudou a relação dose-resposta nas fermentações mistas com *C. fabianii* e *S. cerevisiae* viabilizando modelar as características finais das cervejas produzidas. Proporções maiores de *C. fabianii* em relação a *S. cerevisiae* levaram a um aumento positivo no total de ésteres voláteis e redução negativa no total de álcoois voláteis, com relação direta nas características organolépticas da cerveja. Além disso, proporções maiores de *C. fabianii* revelaram maior complexidade de aromas, comparado as co-culturas e culturas puras, revelando maior potencial na produção de aromas complexos.

Ocorreu inibição de *S. cerevisiae* nas fermentações mistas, entretanto, a inibição estava estritamente relacionada à rápida depleção de oxigênio por *C. fabianii*, efeito que pode ser anulado pela suplementação do mosto, garantindo o crescimento na ausência de oxigênio molecular (Van Rijswijck et al., 2017).

3.5 BRETTANOMYCES/DEKKERA

Brettanomyces anomalus (*B. anomalus*) e *bruxellensis* (*B. bruxellensis*) produziram teores de etanol baixos (0,2-0,4% ABV) contendo glicose residual. O teor alcoólico da cerveja produzida com *B. naardenensis* estava na média de 1,4% ABV junto à outras leveduras não convencionais. A espécie produziu acetato de etila acima do limite sensorial. Álcoois superiores e ésteres etílicos não foram produzidos pelas espécies de Brettanomyces acima do limite de sabor. As espécies *B. anomalus* e *bruxellensis* produziram 4-etil guaiacol, associado a sabor picante, de cravo e baunilha, além de 4-etil fenol, associado a sabor picante e esfumado, acima do limite de sabor (Callemien e Collin, 2009).

B. bruxellensis provocou a interrupção na fermentação sequencial com *S. cerevisiae*, resultando em resíduos de maltose e menor teor alcoólico. Além disso, 4-etil guaiacol, 4-etil fenol, etil octanoato (acima do limite de sabor), etil decanoato, ácido acético, acetato de etila e glicerol foram produzidos em quantidades elevadas, enquanto isoamila e acetato de isobutila estavam reduzidos e hexanoato de etila, isobutanol, álcool isoamílico não foram produzidos. A fermentação sequencial aumentou o nível de acetaldeído em uma das cepas de *B. bruxellensis* (Holt et al., 2018).

Dekkera bruxellensis (*D. bruxellensis*) é a forma teleomórfica e *B. bruxellensis* é a forma anamórfica da mesma levedura, assim *D. bruxellensis* e *B. bruxellensis* são diferentes apenas pela forma de reprodução (Jolly, Varela, Pretorius, 2013). *D. bruxellensis* foi utilizada em co-fermentação com *S. cerevisiae*, sendo observado que a razão entre os inóculos na co-fermentação afetou o crescimento das leveduras e a formação de metabólitos da cerveja. A exemplo, a produção de ácido acético foi aumentada em co-culturas onde houve favorecimento da *D. bruxellensis*, enquanto estava ausente em co-culturas favorecendo *S. cerevisiae*, esse resultado em particular é interessante, pois a produção deste ácido afeta negativamente o sabor da bebida (Coelho et al., 2020).

Foi observado ainda, que concentrações maiores de glicose no mosto afetam o crescimento de *D. bruxellensis*, essa característica é inibida em co-cultura com *S. cerevisiae*. Os metabólitos produzidos nas

co-culturas dependiam das espécies avaliadas. Foi observado que o acetato de isobutila estava presente apenas em culturas *D. bruxellensis* e a concentração detectada estava aumentada nas co-culturas, indicando sinergia entre as espécies, o mesmo foi observado para o etil hexanoato e octanoato de etila. Vários ácidos graxos estavam presentes em maior quantidade nas cervejas puras de *D. bruxellensis* (Steensels et al., 2014), esses ácidos conferem características sensoriais indesejadas e são considerados compostos de deterioração. 4-etilfenol e 4-etil guaiacol foram encontrados apenas nas bebidas obtidas por *D. bruxellensis* e os álcoois monoterpênicos linalol e geraniol foram produzidos em concentrações mais elevadas por *D. bruxellensis* em comparação à *S. cerevisiae* (Coelho et al., 2020). Estes últimos conferem à cerveja um aroma floral desejável, sendo geralmente correlacionado com descritores de lúpulo (Denby et al., 2018).

3.6 HANSENIASPORA

Espécies do gênero *Hanseniaspora* estão frequentemente relacionadas a produção de vinhos, apresentam baixo poder fermentativo porém são importantes produtores de compostos voláteis (Jolly, Varela, Pretorius, 2014).

Hanseniaspora uvarum (*H. uvarum*) são em maior parte encontradas no mosto de uva, tornando-as ótimas opções devido a capacidade de melhorar a qualidade de vinhos (Jolly, Varela, Pretorius, 2013). No emprego da *H. uvarum* para a produção de cerveja, observou-se baixo teor alcoólico (0,8-1,0% ABV), poder redutor de aldeídos de cadeia ramificada, sem produção de ésteres detectáveis. Além disso, a levedura foi sensível à temperatura e ao estresse osmótico. Por outro lado, a cerveja continha aroma característico de cravo produzido por 4-vinil guaiacol (Johansson et al., 2021).

Hanseniaspora vineae (*H. vineae*) quando utilizada em vinhos produziu quantidades maiores de 2-etil acetato, associado a descritores de aroma de rosa, mel, frutado e floral (Jolly, Varela, Pretorius, 2013). *H. vineae* atenuou 75% do mosto e produziu ácido láctico durante a fermentação. As análises sensoriais realizadas a caracterizaram como uma cerveja muito azeda, com sabor de frutas de caroço e o aroma continha notas de frutas azedas e cidra de maça (Osborn et al., 2018).

3.7 SACCHAROMYCES CEREVISIAE VAR. BOULARDII

Saccharomyces cerevisiae var. boulardii (*S. var. boulardii*) é uma espécie do gênero *S. cerevisiae* distinta pelas suas propriedades benéficas à saúde, principalmente no que diz respeito ao efeito probiótico (McFarland, 2010). Embora seja uma levedura englobada ao gênero Saccharomyces sua aplicação em cervejas não é popular, ao mesmo tempo que propicia qualidades probióticas à cerveja, tornando-a apropriada como levedura não convencional (Capece et al., 2018; Senkarcinova et al., 2018).

A cerveja produzida com *S. var. boulardii* apresentou redução de 50% do mosto e continha teor alcoólico igual a 3,8% ABV, resultados comparáveis ao observado para cepas tradicionais de *S. cerevisiae* (Capece et al., 2018). Senkarcinova et al. (2018) relacionaram o aumento de etanol e iso-α-ácidos do lúpulo à redução do crescimento da levedura, sendo observado que a co-cultura não modificou o teor alcóolico

(Capece et al., 2018), a levedura foi capaz ainda, de consumir maltose e maltotriose (Senkarcinova et al., 2018).

As cervejas produzidas por *S. var. boulardii*, em cultura pura e co-cultura, apresentaram maior acidez volátil que *S. cerevisiae*, entretanto, para cervejas co-fermentadas esses valores foram significativamente menores, indicando que a acidez volátil é afetada por *S. cerevisiae* (Capece et al., 2018). Cepas de *S. cerevisiae* de origens diferentes exibiram conteúdo de compostos voláteis diversificado, deste modo, a cultura mista com *S. var. boulardii* apresentou características variáveis e dependentes da cepa utilizada. De todo modo, a presença de *S. var. boulardii* nas fermentações mistas não afeta negativamente o sabor da cerveja, visto que os compostos produzidos não foram maiores que os da fermentação pura (Capece et al., 2018). Senkarcinova et al. (2018) identificaram influência da temperatura e da proporção dos inóculos na produção de mais ésteres e álcoois superiores em cervejas produzidas com *S. var. boulardii*.

Além dessas características sensoriais e químicas observadas, a cerveja produzida com *S. var. boulardii* se destacou com relação a atividade antioxidante. Esta cepa apresentou atividade antioxidante superior a cultura pura *S. cerevisiae*, sendo que essa atividade foi potencializada em cervejas co-inoculadas. O teor de polifenóis, associado a atividade antioxidante, também foi significantemente maior nas cervejas co-fermentadas (Capece et al., 2018).

Senkarcinova et al. (2018) demonstrou que a cerveja obtida com *S. var. boulardii* apresentava características organolépticas de frutas, cravo e ácidas e que a interrupção da fermentação não afetou esse resultado.

3.8 WICKERHAMOMYCES

A aplicação de *Wickerhamomyces anomalus* (*W. anomalus*) em vinhos normalmente é feito em associação a *S. cerevisiae*, o que proporciona melhorias nas características de sabor de vinhos (Jolly, Varela, Pretorius, 2014).

Osborn et al. (2018) destacaram a capacidade fermentativa de *W. anomalus* a partir dos resultados da atenuação do mosto (83% de atenuação real) associados à um teor alcoólico de 3,36 % ABV, o que é considerado relativamente alto para leveduras não convencionais. No entanto, Canonico et al. (2019) encontraram resultados divergentes, com atenuação do mosto (57,32%) e teor alcoólico (1,53% ABV) menores do que previamente descrito. O teor alcoólico foi aumentado em fermentações mistas com *S. cerevisiae* (3,99-4,03% ABV) quando comparado a cervejas feitas apenas com *W. anomalus*.

O ácido acético foi produzido em fermentações isoladas de *W. anomalus* havendo redução nesses valores quando houve co-fermentação com *S. cerevisiae* nas proporções 1:1 e 1:10 (Canonico et al., 2019). Além disso, a *W. anomalus* produziu ácido láctico em grandes quantidades tanto em culturas puras quanto mistas, a única exceção foi na inoculação na proporção de 1:1 com *S. cerevisiae* (Osborn et al., 2018; Canonico et al., 2019). Foi observado também conteúdo de álcool superiores significativamente maior nas

culturas isoladas, enquanto as culturas mistas apresentaram redução na quantidade de acetaldeído e aumento na quantidade de acetato de etila e butirato de etila em relação a *S. cerevisiae* (Canonico et al., 2019).

A produção de ácido lático não refletiu significativamente no sabor da cerveja, reproduzindo caráter azedo, porém com pouca intensidade. A análise sensorial da cerveja caracterizou cerveja muito azeda com sabores de pera, maçã e damasco, o aroma continha notas frutadas, limpa, aromática e com reminiscência de bebida fermentada de pera (Osborn et al., 2018).

3.9 OUTRAS ESPÉCIES

Outras espécies pouco estudadas para a produção de cerveja, mas adicionadas no presente estudo foram: *Kazachstania servazzii* (*K. servazzi*), *Kluyveromyces marxianus* (*K. marxianus*), *Mrakia gelida* (*M. gelida*), *Schizosaccharomyces japonicus* (*S. japonicus*), *Zygotorulaspora florentina* (*Z. florentina*), *Lactobacillus paracasei* (*L. paracasei*) e *Pediococcus acidilactici* (*P. acidilactici*).

A fermentação com a levedura *K. servazzii* demonstrou que a levedura foi particularmente sensível ao etanol, temperatura e estresse osmótico. A cerveja produzida por *K. servazzii* em pequena escala apresentou teor alcoólico de 0,8-1,0% ABV, enquanto em grande escala a cerveja produzida apresentou teor um pouco menor (0,73% ABV), entretanto, a maioria dos compostos formados se manteve semelhante, tanto em pequena quanto em larga escala. O 2-fenil etil acetato apresentou concentrações diferentes entre as escalas, enquanto a produção em pequena escala continha 3,0 mg/L de 2-fenil etil acetato, abaixo do limite de 3,8 mg/L, a produção em grande escala aumentou a concentração do composto alcançando 7,39 mg/L, acima do limite de percepção, este éster reproduz sabor adocicado de rosa, mel e maçã. O perfil das cervejas produzidas com *K. servazii* apresentou descritores doce, cereal e dimetilsulfeto, este último é um *off flavor* conhecido pelo sabor de legumes cozidos frequentemente associado a cervejas de bactéria do ácido láctico. O aroma continha notas de pera e maçã, geralmente associados a 3-metil butila que estava presente em pequenas concentrações nas cervejas (Johansson et al., 2021).

K. marxianus apresentou tolerância a altas temperaturas, com crescimento melhorado acima da temperatura de 25°C, no entanto, a levedura se mostrou sensível ao etanol e ao estresse osmótico. O mosto fermentado por *K. marxianus* produziu cervejas com teor alcoólico de 0,8-1,0% ABV. De forma interessante e contrária a outras leveduras não convencionais, a *K. marxianus* aumentou a concentração de aldeídos, o 2-metilbutanal estava presente no mosto na concentração de 0,014 mg/L e aumentou para 0,025 mg/L e 2-metilpropanal aumentou de 0,027 mg/L para 0,143 mg/L após a fermentação. Os aldeídos são responsáveis pelo sabor de mosto, são produzidos durante a maltagem e fervura do mosto e posteriormente reduzidos na fermentação (Johansson et al., 2021). A espécie também produziu acetaldeído e 2-fenil etil acetato acima do limite de percepção.

Diversas leveduras da espécie *M. gelida* de diferentes origens foram selecionadas, devido a sua capacidade de fermentar frutose, glicose, sacarose e maltose, de 32 cepas apenas cinco fermentavam maltose. As cepas apresentaram baixa produção de etanol (1,16% ABV) o que é desejável na produção de

cervejas com baixo teor alcoólico, e baixa produção de diacetil, *off flavor* indesejável em cervejas. A espécie foi comparada à uma levedura de referência (*Saccharomyces ludwigii*), aplicada industrialmente para produção de cervejas sem álcool (Liu et al., 2011). Observou-se que as cervejas produzidas com *M. gelida* continham menos álcoois superiores e éster acetato, sendo descrito a cerveja produzida como tendo cor amarela, espuma fina e bem distinta, aroma e sabor frutado, com notas de damasco, uva e lichia (De Francesco et al., 2018).

O gênero *Schizosaccharomyces* foi apontada por Domizio et al. (2017) como promissor na produção de cerveja pela capacidade de liberação de polissacarídeos do mosto e diferenças relacionadas entre espécies do mesmo gênero. Pouco se sabe sobre a aplicação da espécie em bebidas sendo o estudo de Osborn et al. (2018) o primeiro relato da aplicação de *S. japonicus* na fabricação de cerveja. A levedura produziu 73% de atenuação do mosto com uma cinética de fermentação incomum (Osborn et al., 2018), houve produção de ácido láctico apenas na presença de oxigênio o que foi relacionado ao efeito Crabtree depois de descartar a possibilidade de contaminações por bactérias do ácido láctico. Na análise sensorial, a cerveja foi descrita como ácida com aroma e sabores intensos de frutas de caroço, o aroma continha notas frutadas e de maça imatura (Osborn et al., 2018).

A levedura *Z. florentina* produziu cervejas com teor alcoólico de 3,47% ABV associado a gravidades finais mais altas, o que é explicado pela capacidade da levedura de fermentar maltose, diferentemente da maioria das leveduras não convencionais. Culturas mistas de *Z. florentina* e *S. cerevisiae* exibiram maior teor alcoólico (3,81 e 4,30% ABV), sem diferença significante com a cultura pura de *S. cerevisiae* (Canonico et al., 2019).

Proporções de inóculo iguais nas culturas mistas apresentaram cinética de crescimento semelhante às respectivas culturas puras, com relativa inibição mútua. Nas proporções maiores de *Z. florentina*, as leveduras não foram inibidas ainda que a levedura não convencional tenha prevalecido sobre *S. cerevisiae*. Houve produção de ácido láctico nas fermentações na presença de *Z. florentina*, em quantidades significativamente maiores que na cultura pura de *S. cerevisiae*. A produção de ácido acético, que é indesejável, teve aumento significativo nas culturas mais favoráveis a *Z. florentina* (Canonico et al., 2019).

As fermentações mistas estavam relacionadas a redução significativa no teor de acetaldeído, enquanto razões mais altas de *Z. florentina* na inoculação aumentaram significativamente o teor de butirato de etila. Acetato de etila estava aumentado em todas as fermentações mistas, enquanto o acetato de fenil-etil, hexanoato de etila e acetato de isoamila estavam reduzidos em maiores razões de inóculo. O teor de álcoois superiores teve aumento significativo comparados à cultura pura *S. cerevisiae*, com exceção de 2-fenil-etanol que diminuiu na fermentação mista (Canonico et al., 2019).

A espécie *L. paracasei* foi selecionada por demonstrar boa capacidade de sobrevivência no mosto lupulado e foi co-inoculada no mosto com *S. cerevisiae*. Em mosto sem lúpulo, o *L. paracasei* cresceu e manteve alto número de células viáveis durante a fermentação. A co-inoculação com *S. cerevisiae* não foi prejudicial para o crescimento da bactéria nem da levedura. A fermentação com *L. paracasei* produziu

ácido láctico, o que resultou na redução significativa do pH (3,62), interessantemente, *L. paracasei* é capaz de realizar fermentação malolática e *S. cerevisiae* converte o ácido málico em piruvato que dá sequência a fermentação malo etanólica. Ambas as fermentações podem contribuir para a produção de cervejas ácidas e perfis sensoriais mais complexos. *L. paracasei* não produziu etanol em fermentações puras, em fermentações mistas a bactéria não comprometeu a produção de etanol por *S. cerevisiae*. Nas culturas mistas houve maior produção de 2-fenil-etanol (69.83 mg/L) e álcool isoamílico (44.80 mg/L) acima do limite de sabor, agregando características positivas para a cerveja. No entanto, as cervejas co-cultivadas produziram menos ésteres. Cetonas não foram detectáveis ou estavam abaixo do limite de sabor nas culturas mistas, diferente da cultura pura *L. paracasei*, o que é uma característica desejável tendo em vista a ausência de *off flavors* como diacetil e acetoína (Alcine Chan et al., 2019).

A espécie *P. acidilactici*, produtora de bacteriocina, foi isolada de um malte que exibiu atividade antimicrobiana contra *Lactobacillus plantarum*. A atividade da bacteriocina permaneceu mesmo após tratamentos térmicos e variação de pH (2-11) e inibiu as principais bactérias do ácido láctico responsáveis pela deterioração da cerveja. Os ensaios de fermentação indicaram que *P. acidilactici* não sobrevive às etapas de mosturação e ebulição do mosto. A bacteriocina produzida, no entanto, permanece e pode prevenir contaminação do mosto ou da cerveja por leveduras do ácido láctico. Adicionalmente, a produção de bacteriocina foi sensível em mosto com lúpulo, esta sensibilidade está relacionada ao efeito antibiótico moderado de ácidos do lúpulo, que são capazes de reduzir a atividade da bacteriocina. *P. acidilactici* foi incapaz de crescer na cerveja, indicando que a bactéria não deteriora a cerveja (Ahn, Kim, Kim, 2017).

4 CONCLUSÃO

As leveduras não convencionais proporcionam cervejas distintas daquela obtida pela fermentação tradicional com *Saccharomyces cerevisiae* e apresentam potencial interessante, para aprimorar as características sensoriais e produzir estilos diferentes de cervejas. As fermentações mistas e sequenciais com *Saccharomyces cerevisiae* revelaram uma nova forma de produzir cervejas com composição química única, rica em compostos originais das leveduras e novos compostos derivados da sinergia entre as espécies. O estudo também abordou brevemente a aplicação de bactérias não usuais (*Lactobacillus paracasei* e *Pediococcus acidilactici*) em fermentações mistas originando cervejas com propriedades de sabor e conservação aprimoradas. Deste modo, pode-se concluir que as leveduras não convencionais são uma alternativa interessante para produção de cervejas com sabores e aromas desejáveis e únicos, refletindo potencial para o mercado cervejeiro.

REFERÊNCIAS

Ahn, H.; Kim, J.; Kim, W. J. Isolation and characterization of bacteriocin-producing Pediococcus acidilactici HW01 from malt and its potential to control beer spoilage lactic acid bacteria. **Food Control**, v. 80, p. 59–66, 2017.

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. April, p. 541–550, 2019.

Anderson, H. E. A review of the analytical methods used for beer ingredient and finished product analysis and quality control. **Analytica Chimica Acta,** Arlington, vol. 1085, p. 1-20, 2019.

Basso, R. F.; Alcarde, A. R.; Portugal, C. B. Could non-Saccharomyces yeasts contribute on innovative brewing fermentations? **Food Research International**, v. 86, p. 112–120, 2016.

Bellut, K.; Krogerus, K.; Arendt, E. K. Lachancea fermentati Strains Isolated From Kombucha: Fundamental Insights, and Practical Application in Low Alcohol Beer Brewing. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. April, p. 1–21, 2020.

BRASIL. Decreto no 9.902, de 8 de junho de 2019. **Dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas.** Brasília, DF, 8 jun. 2019. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2019-2022/2019/Decreto/D9902.htm#art2>. Acesso em: 27 maio 2020.

Callemien, D.; Collin, S. Structure, organoleptic properties, quantification methods, and stability of phenolic compounds in beer-A review. **Food Reviews International**, v. 26, n. 1, p. 1–84, 2010.

Canonico, L. et al. Torulaspora delbrueckii in the brewing process: A new approach to enhance bioflavour and to reduce ethanol content. **Food Microbiology**, v. 56, p. 45–51, 2016.

Canonico, L. et al. Exploitation of three non-conventional yeast species in the brewing process. **Microorganisms**, v. 7, n. 1, 2019.

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

Capece, A. et al. Use of Saccharomyces cerevisiae var. boulardii in co-fermentations with S. cerevisiae for the production of craft beers with potential healthy value-added. **International Journal of Food Microbiology**, v. 284, n. June, p. 22–30, 2018.

Coelho, E. et al. Evaluation of multi-starter S. cerevisiae/ D. bruxellensis cultures for mimicking and accelerating transformations occurring during barrel ageing of beer. **Food Chemistry**, v. 323, n. January, p. 126826, 2020.

De Francesco, G. et al. Mrakia gelida in brewing process: An innovative production of low alcohol beer using a psychrophilic yeast strain. **Food Microbiology**, v. 76, p. 354–362, 2018.

Del Mônaco, S. M. et al. Selection and characterization of a Patagonian Pichia kudriavzevii for wine decidification. **Journal of Applied Microbiology**, v. 117, n. 2, p. 451–464, 2014.

Denby, C. M. et al. Industrial brewing yeast engineered for the production of primary flavor determinants in hopped beer. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2018.

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.

Domizio, P. et al. Cell wall polysaccharides released during the alcoholic fermentation by Schizosaccharomyces pombe and S. japonicus: quantification and characterization. **Food Microbiology**, v. 61, p. 136–149, 2017.

Holt, S. et al. Bioflavoring by non-conventional yeasts in sequential beer fermentations. **Food Microbiology**, v. 72, p. 55–66, 2018.

Johansson, L. et al. Sourdough cultures as reservoirs of maltose-negative yeasts for low-alcohol beer brewing. **Food Microbiology**, v. 94, n. August, p. 103629, 2021.

Jolly, N. P.; Varela, C.; Pretorius, I. S. Not your ordinary yeast: Non-Saccharomyces yeasts in wine production uncovered. **FEMS Yeast Research**, v. 14, n. 2, p. 215–237, 2014.

Kiat Toh, D. W. K.; Chua, J. Y.; Liu, S. Q. Impact of simultaneous fermentation with Saccharomyces cerevisiae and Torulaspora delbrueckii on volatile and non-volatile constituents in beer. LWT - **Food Science and Technology**, v. 91, p. 26–33, 2018.

Krogerus, K.; Gibson, B. R. 125th anniversary review: Diacetyl and its control during brewery fermentation. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 119, n. 3, p. 86–97, 2013.

Kurtzman, C.; Fell, J. W.; Boekhout, T. **The Yeasts:** A Taxonomic Study. 5. ed. New York: Elsevier, 2011.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Anuário da Cerveja 2019.** 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/pasta-publicacoes-DIPOV/anuario-da-cerveja-2019/view >. Acesso em: 5 jun. 2020.

Meier-Dörnberg, T. et al. The Importance of a Comparative Characterization of Saccharomyces Cerevisiae and Saccharomyces Pastorianus Strains for Brewing. ***Fermentation***, v. 3, n. 41, 2017.

Michel, M. et al. Screening for new brewing yeasts in the non-Saccharomyces sector with Torulaspora delbrueckii as model. **Weihenstephan for Brewing and Food Quality**, v. 33, p. 129–144, 2016.

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

Osburn, K. et al. Primary souring: A novel bacteria-free method for sour beer production. **Food Microbiology**, v. 70, p. 76–84, 2018.

Pires, E. J. 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.

Rosa, N. A., Afonso, J. C. A Química da Cerveja. **Química Nova,** São Paulo, n. 2, vol. 37, p. 98-105, 2015.

Saerens, S., Swiegers, J.H., 2013. WO2013030398: Enhancement of Beer Flavor by a Combination of Pichia Yeast and Different Hop Varieties.

Saison, D. et al. Contribution of staling compounds to the aged flavour of lager beer by studying their flavour thresholds. **Food Chemistry**, v. 114, n. 4, p. 1206–1215, 2009.
Senkarcinova, B. et al. Probiotic alcohol-free beer made with Saccharomyces cerevisiae var. boulardii. **Lwt**, v. 100, p. 362–367, 2019.

Steensels, J. et al. Improving industrial yeast strains: Exploiting natural and artificial diversity. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 38, n. 5, p. 947–995, 2014.

Steensels, J. et al. Brettanomyces yeasts - From spoilage organisms to valuable contributors to industrial fermentations. **International Journal of Food Microbiology**, v. 206, p. 24–38, 2015.

Van Rijswijck, I. M. H. et al. Performance of non-conventional yeasts in co-culture with brewers' yeast for steering ethanol and aroma production. **Microbial Biotechnology**, v. 10, n. 6, p. 1591–1602, 2017.

Zdaniewicz, M. et al. Low lactic acid-producing strain of lachancea thermotolerans as a new starter for beer production. **Biomolecules**, v. 10, n. 2, 2020.