

PRODUÇÃO E ANÁLISE DE CERVEJAS PRODUZIDAS COM RECICLO DE LEVEDURAS

NASCIMENTO D.D.; BORTOLETO G.G.; CHRISTOFOLETTI B.; COSTA I.C.; FRANCO F.S.

*Fatec Piracicaba "Dep. Roque Trevisan" - Coordenadoria de Alimentos
e-mail daniela.nascimento01@fatec.sp.gov.br*

Production and analysis of beers brewed with back-slopping of yeast cells

Eixo Tecnológico: Produção Alimentícia

Resumo

O reciclo de leveduras tem sido uma prática ascendente nas cervejarias artesanais como forma de baixar o custo de produção, no entanto, ainda existem muitas dúvidas com relação às possíveis alterações que a bebida pode sofrer, a cada reciclo do fermento, principalmente quanto à formação dos aromas e sabores. Outro ponto de questionamento das cervejarias artesanais faz referência sobre as alterações da qualidade final da bebida quanto às pequenas variações dos processos como, por exemplo, % extrato inicial, volume do tanque de fermentação, variação da temperatura de fermentação. Assim, experimentos analíticos que possam monitorar e testar alguns destes parâmetros para posterior análises da qualidade do produto obtido se fazem necessário. Neste projeto, cervejas foram produzidas nos laboratórios da Fatec Piracicaba, com o reuso de leveduras. Acompanhamento microbiológico de sucessivos reciclos de leveduras cervejeiras ou não, demonstraram que a viabilidade celular e ausência de microrganismos contaminantes pôde ser mantida tomando os devidos cuidados de assepsia. Análises químicas e cromatográficas demonstraram não haver correlação entre reciclos, acondicionamento ou não das células na determinação final dos VOCs (compostos orgânicos voláteis). Porém, estamos especulando e testando se o controle adicional para evitar entrada de O₂ nos fermentadores pode desempenhar papel crucial na adequada atenuação e maturação dos aromas e sabores que influenciam na qualidade final de cervejas artesanais.

Palavras-chave: *Cerveja artesanal. Diacetil. Vitalidade celular. Floculação. Fermentação.*

Abstract

Yeast repitching has been an ascending practice in craft breweries as a way of lowering the production cost, however, there are still many doubts regarding the possible changes that the beverage may undergo with yeast back-slopping, especially regarding aromas and flavors. Another questioning point of craft breweries refers to changes in the final quality of the beverage in terms of small variations in the processes, such as % initial extract, volume of the fermentation tank, variation in fermentation temperature. Thus, analytical experiments that can monitor and test some of these parameters for further analysis of the quality of the product obtained are necessary. In this project, beers were produced in the laboratories of Fatec Piracicaba, with back-slopping of yeasts. Microbiological follow-up of successive cycles of brewer's yeast or not, demonstrated that cell viability and absence of contaminating microorganisms could be maintained by taking care of asepsis. Chemical and chromatographic analyzes showed no correlation between repitching, recuperation or not of cells in the final determination of VOCs (volatile organic compounds). However, we are speculating and testing whether additional control to prevent O₂ entry into the fermenters could play a crucial role in the proper attenuation and maturation of aromas and flavors that influence the final quality of craft beers.

Key-words: *Craft beer. Yeast repitching, Diacetyl. Flocculation. Brew.*

1. Introdução

Leveduras são reutilizadas em processos fermentativos até mesmo antes do conhecimento de que elas seriam as responsáveis pela fermentação. O reuso de leveduras está intimamente relacionado à redução de custo de produção da cerveja pela reutilização da matéria-prima e diminuição de tempo de fermentação pela redução da fase lag da biomassa aproveitada. O

Anais da VII Mostra de Docentes em RJJ

número de reutilizações de leveduras está relacionado à sanitização do processo, de modo a evitar contaminação. Alguns autores apontam que a capacidade fermentativa pode diminuir a medida que as condições do processo induzem estresse celular, e que, cada linhagem pode apresentar comportamento intrínseco diferente, bem como de viabilidade celular frente às condições adversas encontradas [1]. Entretanto, Powell e Diaceticis [2] analisaram a estabilidade genética e fisiológica de leveduras Ale e Lager após respectivamente 98 e 135 ciclos e concluíram que embora algumas linhagens sejam susceptíveis a danos fisiológicos e genéticos que podem interferir no desempenho fermentativo, outras são mais resilientes e se mantêm mais estáveis mesmo após extensivos ciclos. Em sua revisão de literatura, Kalayu [3] apresenta vários resultados controversos sobre este assunto, ressaltando a importância de mais pesquisas aplicadas sobre este procedimento.

O passo mais importante na produção da cerveja é a fermentação, quando diferentes compostos são formados, sendo os majoritários etanol e dióxido de carbono, porém são produzidos também elementos-chave pela levedura, como álcoois superiores, ésteres e dicetonas vicinais (VDKs) [4; 5; 6; 7].

O diacetil, produzido em maiores quantidades na fermentação primária, é um dos principais compostos responsável por promover alteração sensorial desagradável na cerveja, deixando-a com aroma e sabor remetente à manteiga rançosa. Sendo assim, ele é um parâmetro de qualidade importante e, por isso, deve-se fazer o acompanhamento de sua concentração durante a etapa de fermentação. Além do diacetil, outros off flavors podem aparecer na cerveja, como, por exemplo, o acetaldeído, ácidos orgânicos e compostos sulfurosos.

Os microrganismos responsáveis pelo processo fermentativo, leveduras do gênero *Saccharomyces*, produzem o α -acetolactato, de forma extracelular, como metabólito indispensável para o crescimento celular. Este composto pode sofrer oxidação, por meio de um processo lento, não enzimático, porém que depende da temperatura, o qual irá causar uma descarboxilação, resultando no composto diacetil que será removido posteriormente no processo de fermentação por conversão redutora para acetoína e 2,3 butanediol [8]. Sua formação é desvantajosa porque, mesmo após a ação de redutases na etapa de maturação da bebida, se o diacetil permanecer em concentrações superiores a 0,15 mg/ litro de bebida, o seu sabor será perceptível [9].

Para que se possa ter nova produção de cerveja a partir da levedura reciclada de uma produção anterior, alguns cuidados precisam ser tomados, já que o processo fermentativo em si, é um processo estressante para a levedura. Conteúdo intracelular de glicogênio, trealose, proteinases, esterol e ácidos graxos não saturados, além de cicatrizes de brotamento são os biomarcadores mais comuns para monitorar e prever atividades fisiológicas de células de levedura [10; 11; 12]. O número de cicatrizes de brotamento presentes na superfície celular está diretamente relacionado ao número de divisões que uma célula individual realizou [13; 14] e pode ser determinado usando microscopia confocal [13; 15].

Este projeto teve como principal objetivo comparar através de análises relacionadas à qualidade das cervejas produzidas, o reuso de leveduras nos processos de fermentação e produção das mesmas.

2. Materiais e métodos

As análises microbiológicas, bem como a produção de cervejas em escala laboratorial, foram feitas nos laboratórios da FATEC em Piracicaba – “Deputado Roque Trevisan”.

As leveduras utilizadas no primeiro experimento deste trabalho, foram linhagens não comerciais “Modena”, “Alessandro” e “Indígena”. A levedura “Modena” corresponde a cepa

Anais da VII Mostra de Docentes em RJI

cervejeira proveniente de cervejaria da Itália. As demais cepas são leveduras usualmente empregadas na produção de cachaça artesanal. As cervejas produzidas a partir dos reciclados destas leveduras foram subdivididas em 2 tratamentos. Tratamento 1 – Cervejas produzidas com leveduras de reciclo puro; Tratamento 2 - Cervejas produzidas com leveduras de reciclo, porém, previamente “recondicionadas” nos laboratórios da Fatec Piracicaba, sob agitação orbital de 150-rpm por 1 hora em mosto diluído a 50% com água autoclavada;

Num segundo experimento, optou-se por comparar duas leveduras comerciais, uma cervejeira, a S04 da Fermentis® e a outra, uma levedura selecionada para produção industrial de etanol, Cat1 da Fermentec®. Neste experimento, não houve tratamento dos reciclados. Apenas se recuperou 10mL do creme levedurado do fundo do fermentador, após 7 dias de fermentação a 18°C mais 7 dias de maturação a 8°C, e o inoculou em 125mL de mosto para início de novo processo de fermentação.

A reativação e multiplicação de todas leveduras, foi feita em meio YPD líquido, sob agitação orbital a 150rpm e 25°C por 16 horas. O mosto cervejeiro (tipo Soul-IPA), foi preparado conforme o padrão já pré-estabelecido pela microcervejaria parceira, em volume suficiente para o preparo de todas as cervejas, em escala laboratorial. Após o preparo e resfriamento do mosto, o mesmo foi repartido e congelado a -80°C até o uso.

Uma primeira cerveja, em escala laboratorial de 125mL, foi produzida com cada levedura reativada, em cada experimentos. Esta primeira cerveja foi fermentada por 7 dias a 18°C e maturada por mais 14 dias a 8°C. A mesma foi considerada como amostra padrão, a fim de ser comparada com as demais cervejas produzidas, justamente a partir do reuso dessas leveduras. Ao todo, foram efetuados 4 ciclos de produção de cerveja a partir do reciclo das leveduras selecionadas para cada experimento desse projeto.

As alíquotas das leveduras multiplicadas na Fatec e as que foram usadas para a fermentação, foram rotineiramente analisadas através da medição da densidade ótica em espectrofotômetro a 600 nm de absorvância. Como parâmetro para comparação das cervejas de reciclo com a cerveja padrão, sucederam-se análises da viabilidade celular das leveduras, pela contagem das células em câmara de Neubauer.

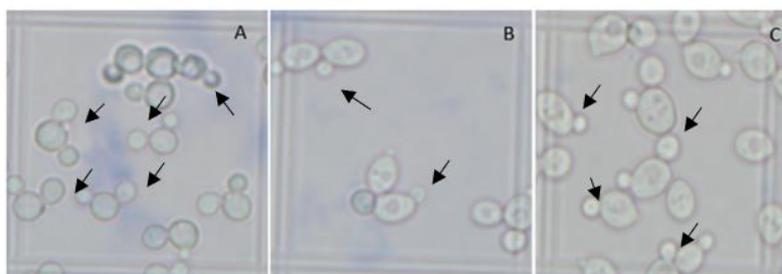
A quantidade de etanol gerada a partir dos processos de fermentação, determinada por cromatografia gasosa e a determinação do diacetil em amostras coletadas no final do processo de maturação das cervejas, feitas pelo método espectrofotométrico recomendado pela Convenção Europeia Brewery (EBC), onde o desenvolvimento da coloração é obtido através da reação com ortofenilenodiamina para obtenção da 2,3 dimetilquinoxalina, cuja absorvância medida a 335 nm é proporcional à concentração de dicetonas vicinais.

3. Resultados e Discussão

As três cepas de leveduras usadas no preparo das cervejas “padrão” (R0) foram rotineiramente analisadas após reativação em meio YPD líquido quanto a sua viabilidade, através de coloração com azul de metileno, em câmara de Neubauer, e observação em microscópio óptico. A micrografia apresentada na Fig. 1, demonstra o padrão de alta viabilidade celular que foi sempre seguido para dar início aos ciclos de fermentação das cervejas. Desta forma, padronizou-se usar como inóculos R0 células 100% viáveis (células inviáveis, se estivessem presentes, apareceriam nas micrografias como coloração azul escuro). Ainda na Fig. 1, pode ser salientada a presença de brotos, indicativo de pleno vigor das células.

Anais da VII Mostra de Docentes em RJJ

Fig. 1 – Micrografia das leveduras coradas com azul de metileno para produção das cervejas “padrão” (R0) em escala laboratorial. Leveduras apresentam-se com coloração azul clara indicando viabilidade de 100%. As setas evidenciam multiplicação das leveduras por brotação. A) Alessandro; B) Indígena e; C) Modena.



Fonte: autores

Antes da adição das leveduras aos mostos cervejeiros, procedeu-se leitura de densidade óptica em espectrofotômetro a 600nm, das soluções celulares para garantir que proporção semelhante fosse adicionada em cada fermentador. Tomou-se como padrão estabelecido em projetos anteriores da orientadora, a adição de 125µL de solução celular de levedura com D.O.600nm \approx 0,650, para cada 125mL de mosto cervejeiro a ser fermentado.

Após 7 dias de fermentação, o mosto fermentado foi centrifugado 3000xg por 5 min. A 4°C, recuperando-se o sobrenadante (cerveja) e esta mantida para maturação por mais 15 dias. A levedura recuperada pela centrifugação foi usada para ser inoculada novamente em novo mosto para novo ciclo de produção de cerveja. No entanto, após cada ciclo de fermentação, portanto, antes de cada reciclo, esta levedura foi analisada em microscópio óptico para observação e determinação de sua viabilidade celular, seguido de leitura de sua densidade óptica para garantir que, em cada reciclo, fosse adicionada quantidade similar de levedura. O mesmo procedimento foi realizado com a porção de levedura que foi recondicionada por 1 hora sob agitação 150rpm e 25°C em solução de mosto diluído a 50% (~7,8°Brix) em água autoclavada.

De acordo com as análises e acompanhamentos realizados, observa-se que conforme o progresso dos reciclos, as leveduras submetidas ao tratamento 1 apresentaram maior quantidade de células inviáveis do que as leveduras recondicionadas (tratamento 2). Durante o reciclo 2 da levedura recondicionada Alessandro, pode-se observar que a quantidade de células presentes na mesma, diminuiu drasticamente, provavelmente por algum tipo de contaminação não identificada ou por falta de controle rigoroso de fatores como temperatura, pH e presença de O₂ [7]. Contudo, no reciclo seguinte as células se multiplicaram e voltaram a ser observadas em quantidades similares aos demais tratamentos.

Considerando a geração 0, ou seja, preparada com o inóculo fresco, observa-se na Tab. 1 que as concentrações de diacetil nas 3 cervejas produzidas apresentaram valores de diacetil conforme esperado, ou seja, menor que 0,1 mg/L [16]. Ao comparar os valores de diacetil nas amostras da Geração 0 com as da Geração 1, observando o comportamento das 3 diferentes leveduras, podemos observar que a variação de concentração do diacetil em todas elas é mínima, com destaque para os valores abaixo do limite de percepção sensorial [16], ou seja, de acordo com o esperado para uma boa cerveja. A partir da geração 2, observa-se que os valores de diacetil estão muito elevados e não próximos entre si, ainda que para uma mesma amostra. A partir dessa observação, fica difícil correlacionar a presença do diacetil ao processo de reciclo. Um exemplo disso é a comparação específica dos resultados para as cervejas da geração 2 e 4. Quando se esperava então um aumento na concentração do diacetil, houve uma queda.

Anais da VII Mostra de Docentes em RJJ

Tab. 1 – Médias de concentração de diacetil (mg/L) nas cervejas da geração 0 a 4 com as leveduras “Alessandro”, “Modena” e “Indígena”. A- amostras condicionadas (Tratamento 2).

Reciclos	Alessandro Média conc. (mg/L)	Modena Média conc. (mg/L)	Indígena Média conc. (mg/L)
Geração 0	0,0819	0,079	0,056
Geração 1	0,031	0,070	0,088
Geração 1A	0,088	0,120	0,107
Geração 2	0,314	-	-
Geração 2A	-	0,160	0,587
Geração 3	-	0,373	0,185
Geração 3A	-	-	-
Geração 4	0,175	0,615	0,725
	-	0,228	0,390

Fonte: autores

Dessa forma, infelizmente os resultados obtidos não permitiram concluir essa pesquisa com uma análise eficiente sobre a influência do reuso de leveduras, quanto à presença do composto diacetil nas cervejas. A Tab. 2 evidencia que, de forma geral, não importa o reciclo (diferentes gerações) ou o tratamento (acondicionamento da levedura antes de ser empregada no processo novamente) as concentrações dos VOCs presentes em cada bebida são estatisticamente diferentes. Uma observação relevante quanto ao acondicionamento da levedura antes de ser empregada em novo processo fermentativo é que levam a formação mais controlada dos VOCs, com poucas exceções de alguns reciclos [10; 11; 17; 18]. O fato de não acondicionar o fermento leva a produção de VOCs em elevadas concentrações.

De posse deste resultados preliminares, optou-se por alterar a dinâmica do processo de produção das cervejas em laboratório e condução de novos reciclos, visando reproduzir em pequenos volumes e com a vidrarias de laboratório, ambiente e manuseio mais similares aos praticados nas cervejarias. No segundo experimento que foi estabelecido, foi decidido comparar apenas duas cepas de leveduras, uma comercial para produção de cervejas tipo Ale, a S04 da Fermentis®; e outra cepa, também comercial, porém selecionada para produção industrial de etanol que se mantém estável por sucessivos reciclos ao longo de uma safra de cana, a levedura Cat1 da Fermentec®. Também optou-se por trocar o sistema de liberação do CO₂ produzido nas etapas da fermentação e maturação que no experimento 1 foi feito com a instalação de um filtro micropore®, o qual impede a entrada de microrganismos, porém permite troca de gases e possível entrada de O₂ no sistema. Assim, para evitar troca de gases e permitir apenas a saída do CO₂ produzido foi utilizado um airlock, convencional para produção de cervejas artesanais.

Anais da VII Mostra de Docentes em RJ

Tab. 2 – Resultados das análises cromatográficas das cervejas da geração 0 a 4 com as leveduras “Alessandro”, “Modena” e “Indígena”. Ac- amostras condicionadas (Tratamento 2).

Amostras Alessandro	Acetaldeído (mg/L)	Acetato de Etila (mg/L)	N-Propanol (mg/L)	Isobutanol (mg/L)	Álcool Isoamilico (mg/L)	Etanol (% (v/v))
Ciclo 0	39,67	4,24	7,10	11,22	63,39	1,65
Ciclo 1	74,42	17,04	26,39	30,73	122,22	3,84
Ciclo 1Ac	84,35	15,66	28,14	31,22	134,46	3,65
Ciclo 2	22,82	4,29	14,91	12,66	49,43	2,72
Ciclo 2 Ac	3,22	-	-	-	-	0,11
Ciclo 3	24,76	3,96	12,56	10,46	43,35	2,08
Ciclo 3 Ac	94,74	12,03	15,95	13,05	40,04	1,99
Ciclo 4	57,18	4,50	13,48	12,09	51,19	2,48
Ciclo 4 Ac	26,05	4,62	8,27	9,35	40,29	3,18

Amostras Modena	Acetaldeído (mg/L)	Acetato de Etila (mg/L)	N-Propanol (mg/L)	Isobutanol (mg/L)	Álcool Isoamilico (mg/L)	Etanol (% (v/v))
Ciclo 0	136,18	8,43	11,98	15,58	90,74	3,47
Ciclo 1	130,03	12,22	18,93	23,88	126,18	4,43
Ciclo 1Ac	82,00	9,99	18,26	22,12	115,76	4,46
Ciclo 2	30,51	3,98	5,08	6,82	30,77	1,77
Ciclo 2 Ac	8,03	2,16	5,44	6,74	32,78	1,62
Ciclo 3	31,65	1,68	6,91	7,48	38,31	2,42
Ciclo 3 Ac	172,86	4,77	13,73	13,65	52,18	3,24
Ciclo 4	74,70	2,12	12,10	10,92	57,99	4,53
Ciclo 4 Ac	21,30	6,85	15,08	12,44	58,93	4,97

Amostras Indígena	Acetaldeído (mg/L)	Acetato de Etila (mg/L)	N-Propanol (mg/L)	Isobutanol (mg/L)	Álcool Isoamilico (mg/L)	Etanol (% (v/v))
Ciclo 0	181,51	6,46	8,96	14,61	77,58	3,23
Ciclo 1	45,98	5,06	9,96	15,45	79,54	4,64
Ciclo 1Ac	128,33	13,85	19,33	27,81	138,39	4,92
Ciclo 2	23,93	2,43	2,44	5,14	21,47	1,46
Ciclo 2 Ac	23,97	2,30	4,93	7,20	28,91	1,98
Ciclo 3	48,95	3,46	5,83	8,46	37,02	3,16
Ciclo 3 Ac	114,34	2,89	12,66	14,08	44,63	3,33
Ciclo 4	30,04	3,93	10,59	12,20	50,69	5,11
Ciclo 4 Ac	27,37	4,42	11,53	12,10	47,40	4,50

Fonte: autores

Anais da VII Mostra de Docentes em RJI

Neste segundo experimento, a cerveja padrão inicial foi obtida com a inoculação de levedura seca comercial. Para 125mL de mosto IPA Soul, foram adicionados 0,07g de cada levedura. Para as demais cervejas dos 8 ciclos seguintes, não foi feito tratamento de condicionamento de leveduras, apenas se recuperou 10mL do creme de leveduras depositado no fundo do fermentador após etapa de fermentação e mais uma semana de maturação a 8°C e o mesmo já foi imediatamente inoculado em 125mL de mosto. Alíquotas de cada levedura usada nos ciclos foi coletada e analisada quanto sua viabilidade e concentração celular em microscópio óptico e por leitura de densidade óptica em espectrofotômetro, conforme descrito no item material e métodos. Análises químicas e cromatográficas ainda estão sendo realizadas e deverão ser apresentadas em relatório final deste projeto.

As leituras da densidade óptica realizadas em espectrofotômetro a 600nm, de 50µL de creme de levedura de ciclo, dissolvida em 950µL de água tem sido bem uniforme, variando suas médias entre 0,7 e 0,9 ao longo dos 4 ciclos realizados, indicando que neste segundo experimento, as condições microbiológicas tem sido mantidas, e provavelmente evitou instabilidade fisiológica das leveduras. A viabilidade celular tem se mantido acima de 98% e presença de bactérias ou outros microrganismos contaminantes não tem sido observada.

4. Considerações finais

Acompanhamento microbiológico de sucessivos ciclos de leveduras cervejeiras ou não, demonstraram que a viabilidade celular e ausência de microrganismos contaminantes pôde ser mantida tomando os devidos cuidados de assepsia.

Análises químicas e cromatográficas demonstraram não haver correlação entre ciclos, acondicionamento ou não das células na determinação final dos VOCs. Porém, estamos especulando e testando se o controle adicional para evitar entrada de O₂ nos fermentadores pode desempenhar papel crucial na adequada atenuação e maturação dos aromas e sabores que influenciam na qualidade final de cervejas artesanais.

Agradecimentos

Agradecemos ao CNPq pelas bolsas concedidas: PIBITI para Fabio S. Franco e PIBICJr. para Bruna Christofolletti e Isabelly C. Costa.

Referências

- [1] WHITE, C.; ZAINASHEFF, J. **Yeast: the practical guide to beer fermentation**. Colorado: Brewers Publications, 2010. 304 p.
- [2] POWELL CD, DIACETIS AN. Long term serial repitching and the genetic and phenotypic stability of Brewer's yeast. **J Inst Brew**. 113:67-74, 2007.
- [3] KALAYU, G. Serial re-pitching: its effect on yeast physiology, fermentation performance, and product quality. **Annals of Microbiology**. 69:787-796 2019. <https://doi.org/10.1007/s13213-019-01493-4>
- [4] HANNEMANN, W. Reducing beer maturation time and retaining quality, Tech. Q. **Master Brew. Assoc. Am.**, 39(3), 149-155. 2002.

Anais da VII Mostra de Docentes em RJI

- [5] VANDERHAEGEN, B.; NEVEN, H.; VERACHTERT, H.; DERDELINCKX, G.; **Food chem.**95, 357–381. 2006.
- [6] DONG, L.; PIAO, Y.; ZHANG, X.; ZHAO, C.; HOU, Y.; SHI, Y. **Food Res. Int.** 51 x, 783–789. 2006.
- [7] CARVALHO, D.S., ZAMBIAZI, R.C. Avaliação do Processo Fermentativo de Cerveja Pilsen Pelo Uso de Diferentes Concentrações de *Saccharomyces Cerevisiae*. **Alim. Nutr.**, Araraquara.v. 22, n. 3, p. 351-357, jul./set. 2011.
- [8] KABAKTSCHIEVA, G.; GINOVA-STOJANOVA, T.; DIMITROVA, T. The use of an enzyme solution with alpha-acetolactate decarboxylase activity, **Brew Bever Ind Int**, 2, 22- 24, 1994.
- [9] LANDAUD, S.; LIEBEN, P.; PICQUE, D. Quantitative analysis of diacetyl, pentanedione and their precursors during beer fermentation by an accurate GC/MS method **J. Inst. Brew.**, 104, pp. 93-99. 1998.
- [10] VERBELEN PJ, DEKONINCK TML, VAN MULDERSE, SAERENS SMG, DELVAUX F, DELVAUX FR. Stability of high cell density brewery fermentations during serial repitching. **Biotechnol Lett** 31:1729–1737, 2009a.
- [11] KORDIALIK-BOGACKA E, DIOWKSZ A. Physiological state of reused brewing yeast. **Czech J Food Sci** 31:264–269, 2013.
- [12] MELEDINA, T.V., DAVYDENKO, S.G., DEDEGKAEV, A.T. Yeast Physiological State Influence on Beer Turbidity. **Agronomy Research** 13(4), 992–1001, 2015.
- [13] KUREC M, BASZCZYNSKI M, LEHNERT R, MOTA A, TEIXEIRA JA, BRÁNYIK T. Flow cytometry for age assessment of a yeast population and its application in beer fermentations. **J Inst Brew** 115:253–258, 2009.
- [14] LAYFIELD JB, SHEPPARD JD. What brewers should know about viability, vitality, and overall brewing fitness: a mini-review. **MBAATQ** 52:132–140. 2015. <https://doi.org/10.1094/TQ-52-3-0719-01>
- [15] POWELL CD, QUAIN DE, SMART KA. Chitin scar breaks in aged *Saccharomyces Cerevisiae*. **Microbiology** 149:3129–3137, 2003.
- [16] TIAN, J. Determination of several flavours in beer with headspace sampling–gas chromatography. **Food Chemistry**, Vol. 123, no4, 1318-1321, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.06.013> acesso em 20 de Jan 2023
- [17] PALMER, J. J. **How to brew**: everything you need to know to brew beer right the first time. Brewers Publications, 2006.
- [18] BAMFORTH, C. W. **Beer: a Quality Perspective**. Burlington: Academic Press, 2009.