

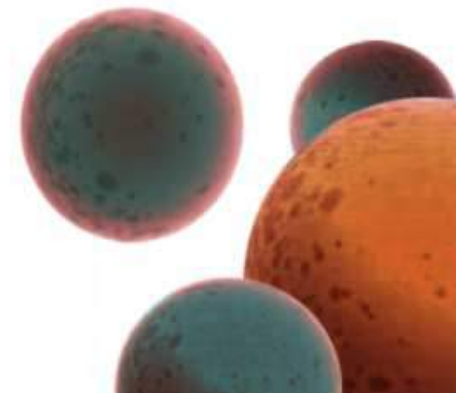


 **Bio4**

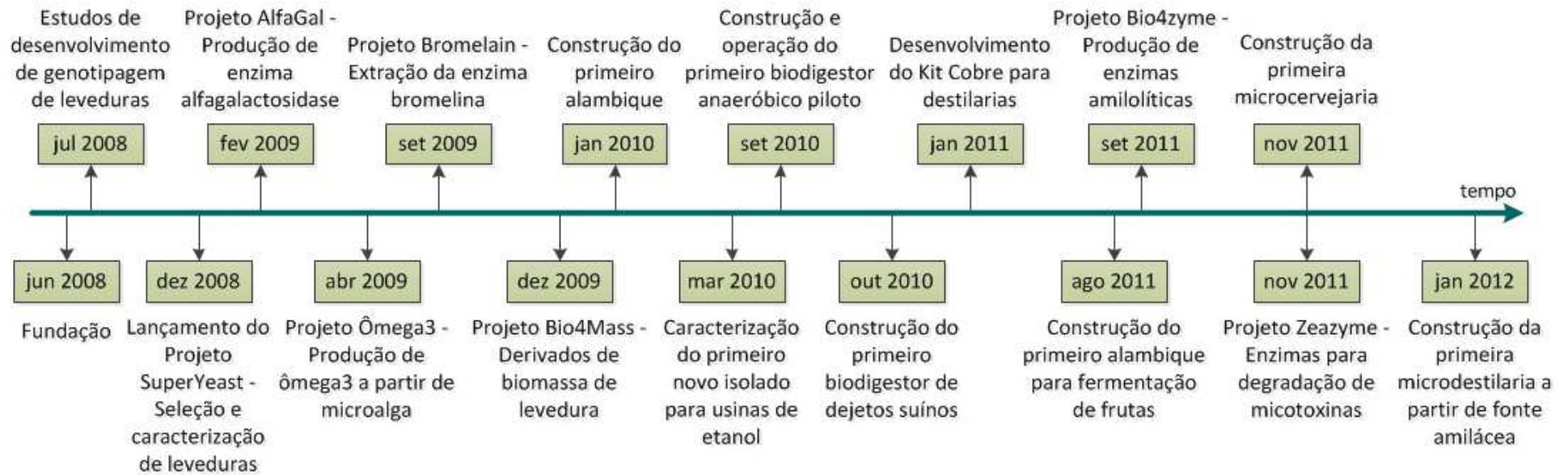
 Soluções Biotecnológicas

A Empresa

Empresa
executora de
P,D&I e
fornecedora de
leveduras



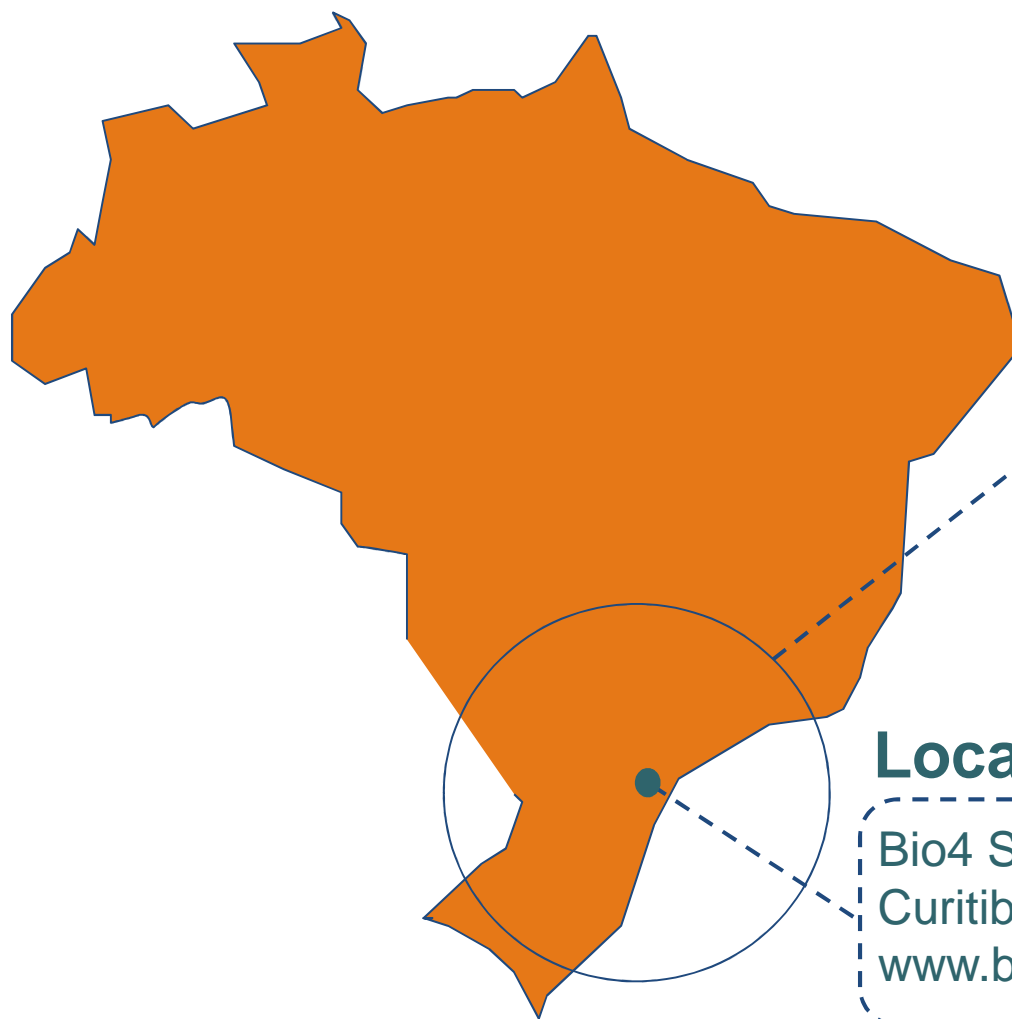
Histórico



A Empresa



A Empresa



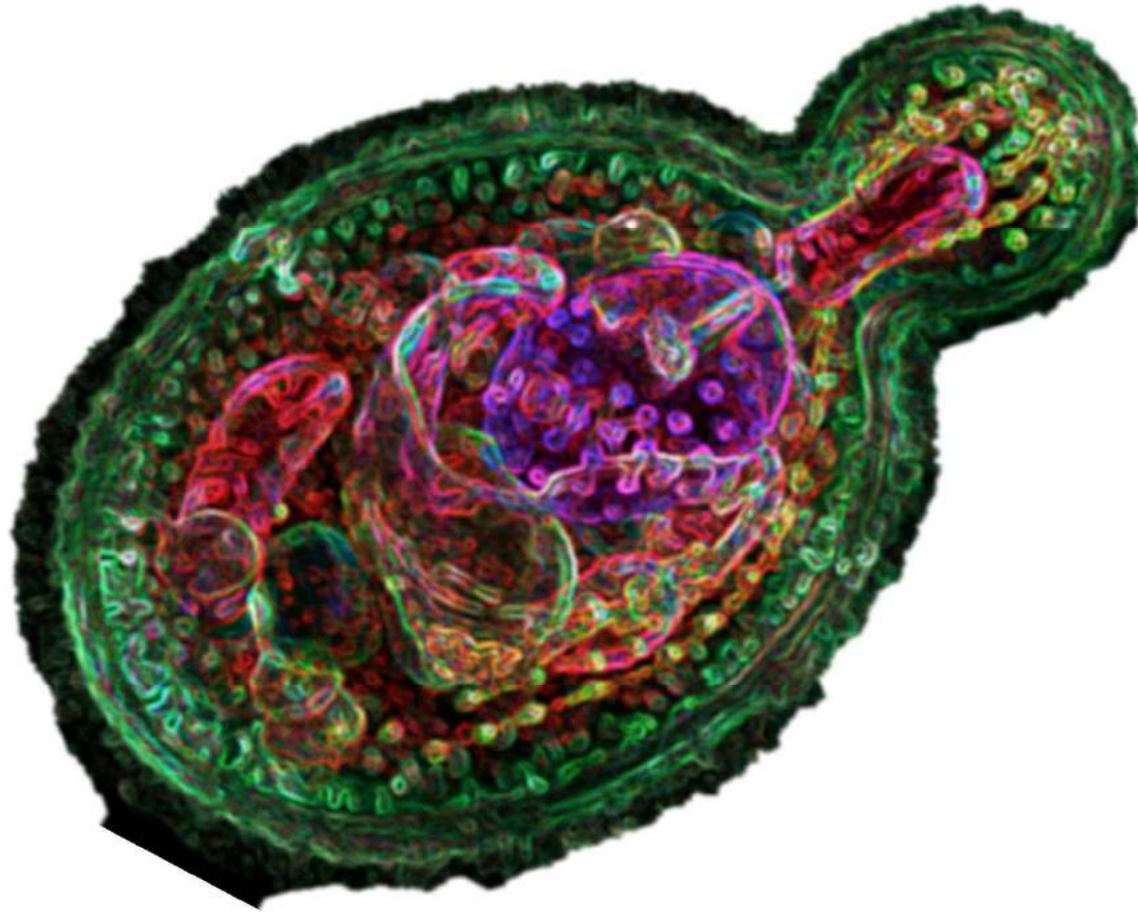
Área de Atuação

Minas Gerais
Rio de Janeiro
São Paulo
Paraná
Santa Catarina
Rio Grande do Sul

Localização

Bio4 Soluções Biotecnológicas
Curitiba – PR
www.bio4.com.br

A Levedura



Um pouco de história



Anthony van Leeuwenhoek (1680)



Antoine-Laurent Lavoisier (1789)

ANNALES
DE CHIMIE;
RECUEIL DE MÉMOIRES
CONCERNANT LA CHIMIE ET LES ARTS
QUI EN DÉPENDENT.
Par MM. DE MORVEAU, LAVOISIER,
MONGE, BERTHOLLET, DE FOUR-
CROY, & Baron DE DIEFFICH. HAS-
LE-NEUFVEAU, AUTEUR DES
TOME PREMIER.
PARIS, Chez M. DEBURE, Libraire, Palais-
National, ci-devant de la Nation, au Salon de Peinture, au Salon de Sculpture,
RUE ET HÔTEL SERPENTE.
Et se trouve à LONDRES,
chez M. HODGKIN, Libraire, en la Cour de la Rue de la Harpe, au Salon de Peinture,
N.º. 7. Soho.
M. DCC. LXXXIX.
Sous le Privilège de l'Académie.

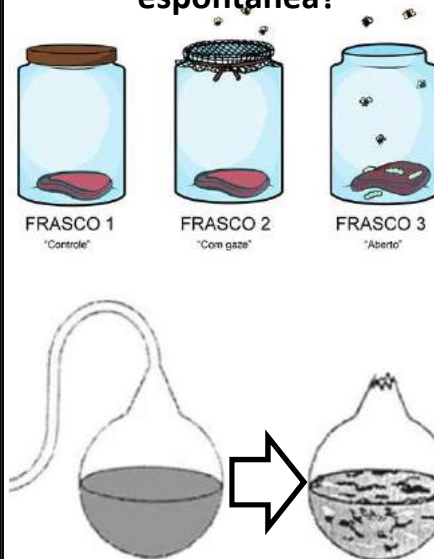
$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CO_2 + 2CH_3CH_2OH$

**"Nada se cria,
nada se perde,
tudo se
transforma"**

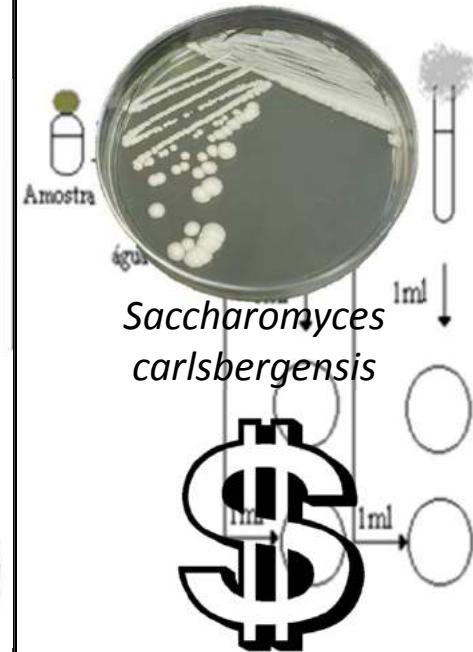


Louis Pasteur(1860)

Teoria da geração espontânea?



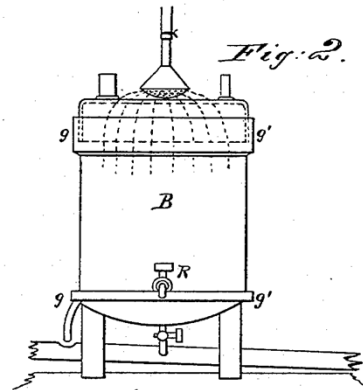
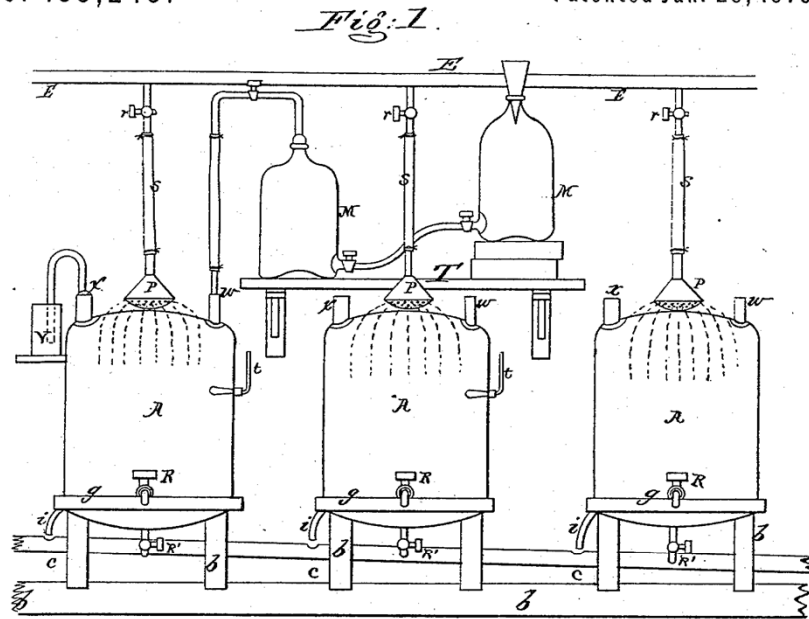
Emil Christian Hansen (1883)



L. PASTEUR.
Brewing Beer and Ale.

No. 135,245.

Patented Jan. 28, 1873.



Witnesses,
C. Wolf
J. Helbel

Inventor
Louis Pasteur
By his attorney
C. M. Keller

Figura 02. Patente de processo de elaboração de cerveja

a STUDIES ON FERMENTATION

THE DISEASES OF BEER
THEIR CAUSES, AND THE MEANS OF PREVENTING THEM

BY
L. PASTEUR
MEMBER OF INSTITUTE OF FRANCE, THE ROYAL SOCIETY OF LONDON, ETC.

A TRANSLATION, MADE WITH THE AUTHOR'S SANCTION, OF
"ÉTUDES SUR LA BIÈRE," WITH NOTES, INDEX, AND ORIGINAL
ILLUSTRATIONS

BY
FRANK FAULKNER
AUTHOR OF "THE ART OF BREWING," ETC.
AND
D. CONSTABLE ROBB, B.A.
LATE SCHOLAR OF WORCESTER COLL., OXFORD

London.
MACMILLAN & CO

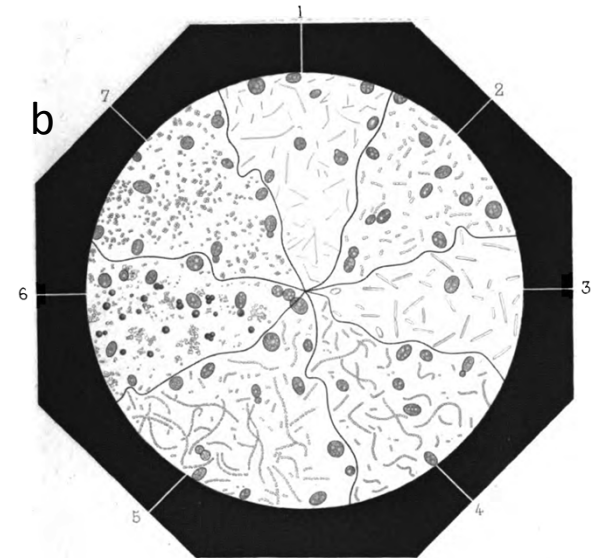


Figura 03. (a) Primeiro livro de L. Pasteur
(b) Diferentes formas de microrganismos ¹

Lager x Ale

Definição Clássica	Lager <i>Saccharomyces pastorianus</i> Levedura de baixa fermentação	Ale <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Levedura de alta fermentação
Definição Moderna	Capacidade de fermentar a melibiose	-
Aromas	Limpo Neutro Floral Malte	Limpo Neutro Frutado Fenólico
Temperatura	9-14 °C	16-26 °C

Brettanomyces sp.

Definição
Clássica

Brett
Brettanomyces lambicus
Brettanomyces bruxellensis
Brettanomyces claussenii
Brettanomyces bruxellensis Trois

Morfologia

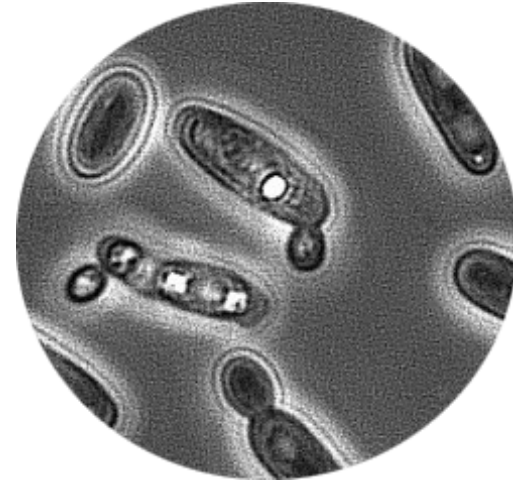
Fungo não formador de esporos e células ovais e alongadas

Aromas

4-etil fenol – Band-Aid
4-etil guaiacol – Madeira Mofada
Estábulo
Cavalo

Temperatura

18-26 °C

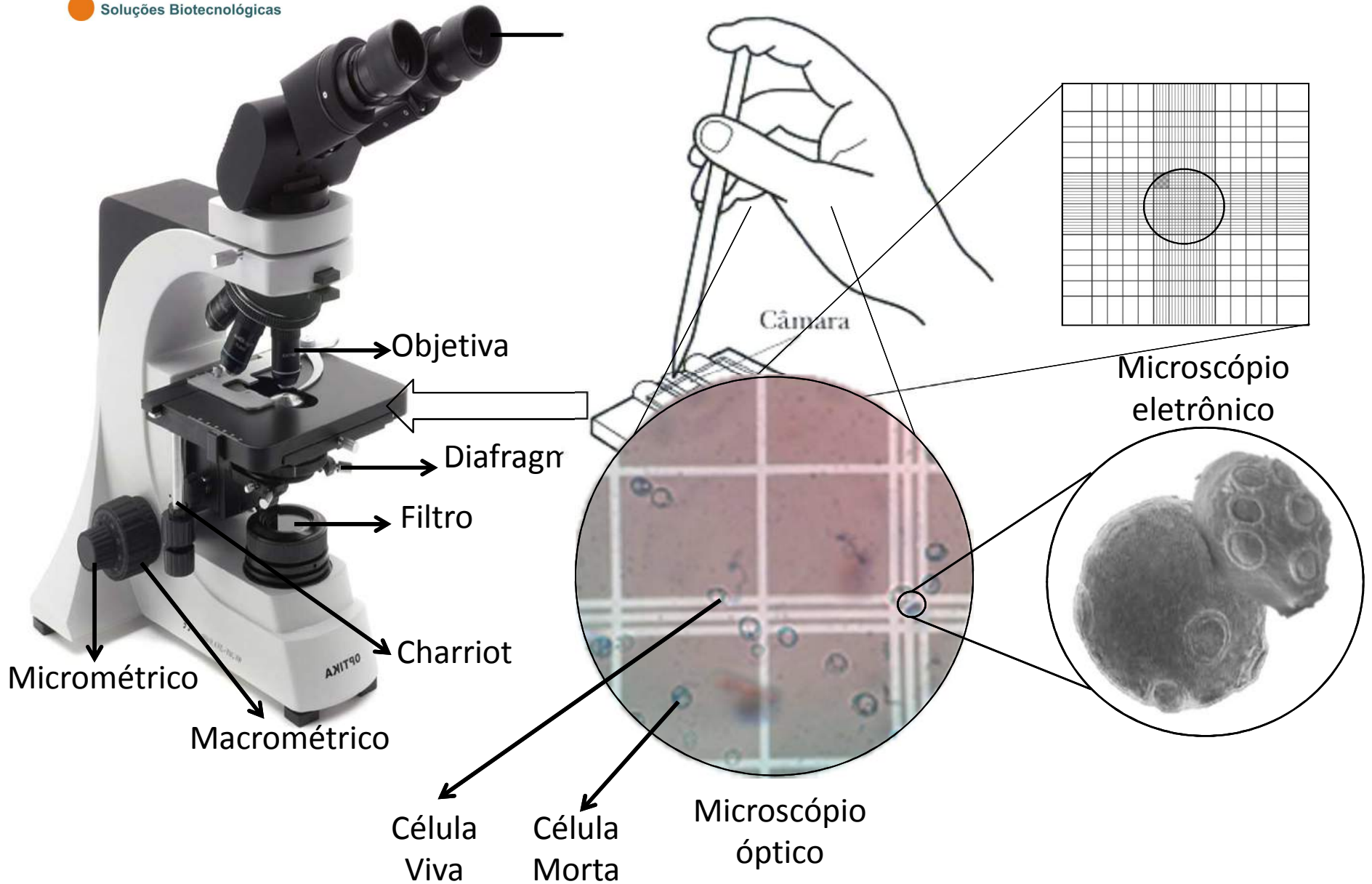


Brettanomyces lambicus



Brettanomyces bruxellensis

Microscópio



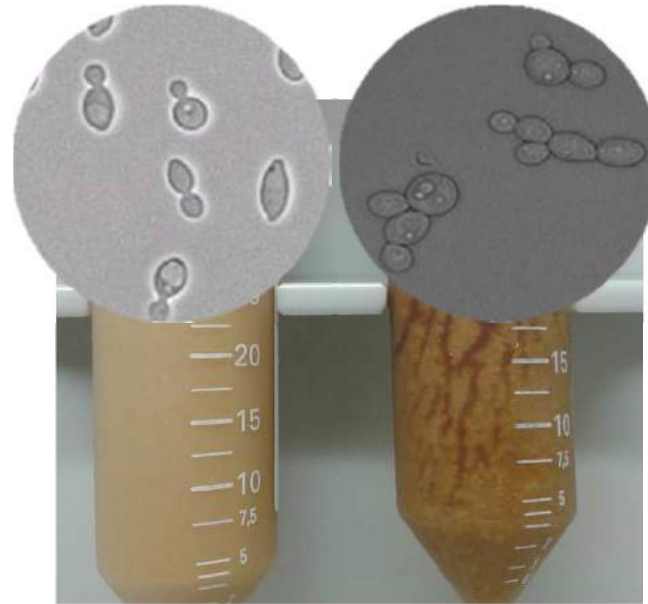
Morfologia



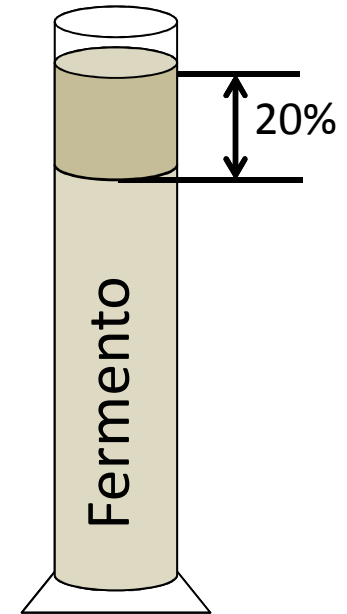
Colônia Lisa



Colônia rugosa

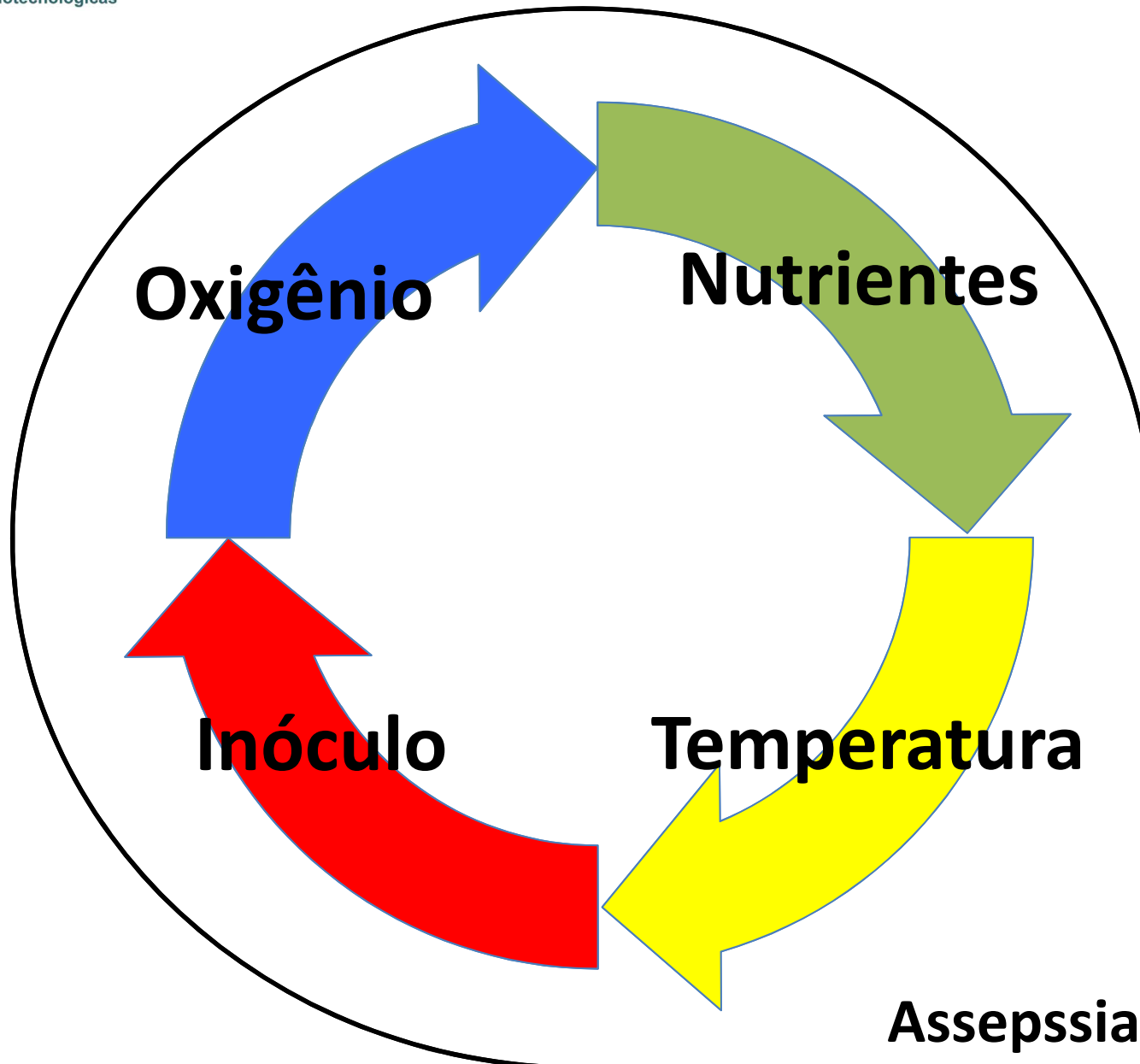


Floculação

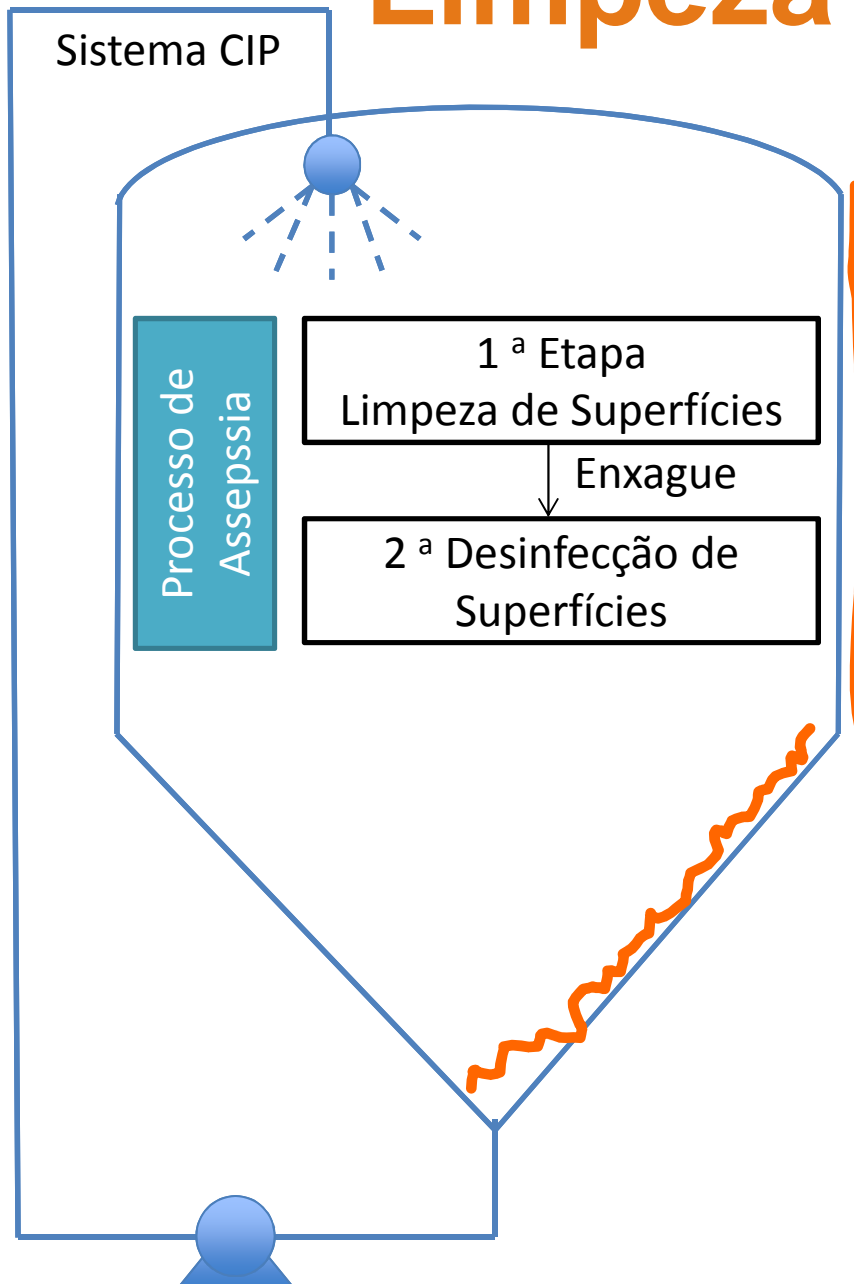


Grau de Floculação	Teste (15 °C) 12 horas
Baixa	20%
Média	50%
Alta	80%

Variáveis de Processo



Limpeza e Assepsia



Limpeza = Solução NaOH 1-2%

Sanitização = Solução de Ác. Peracético 0,2-0,3%

Superfície

Porque a superfície externa tem polimento melhor que a interna?

Limpeza

pH

**Cuidado com:
Mármore, cimento,
Pedra.**

**Cuidado com:
Alumínio, resina fenólica.**

Ácido

Neutro

Alcalino

0

5,5

7

8,5

14

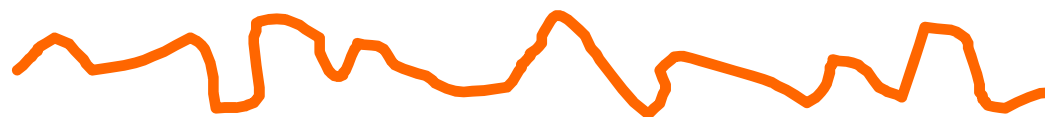
Sujidade inorgânica

Sujidade orgânica

Limpeza

Rugosidade

Groseira



Rugosa



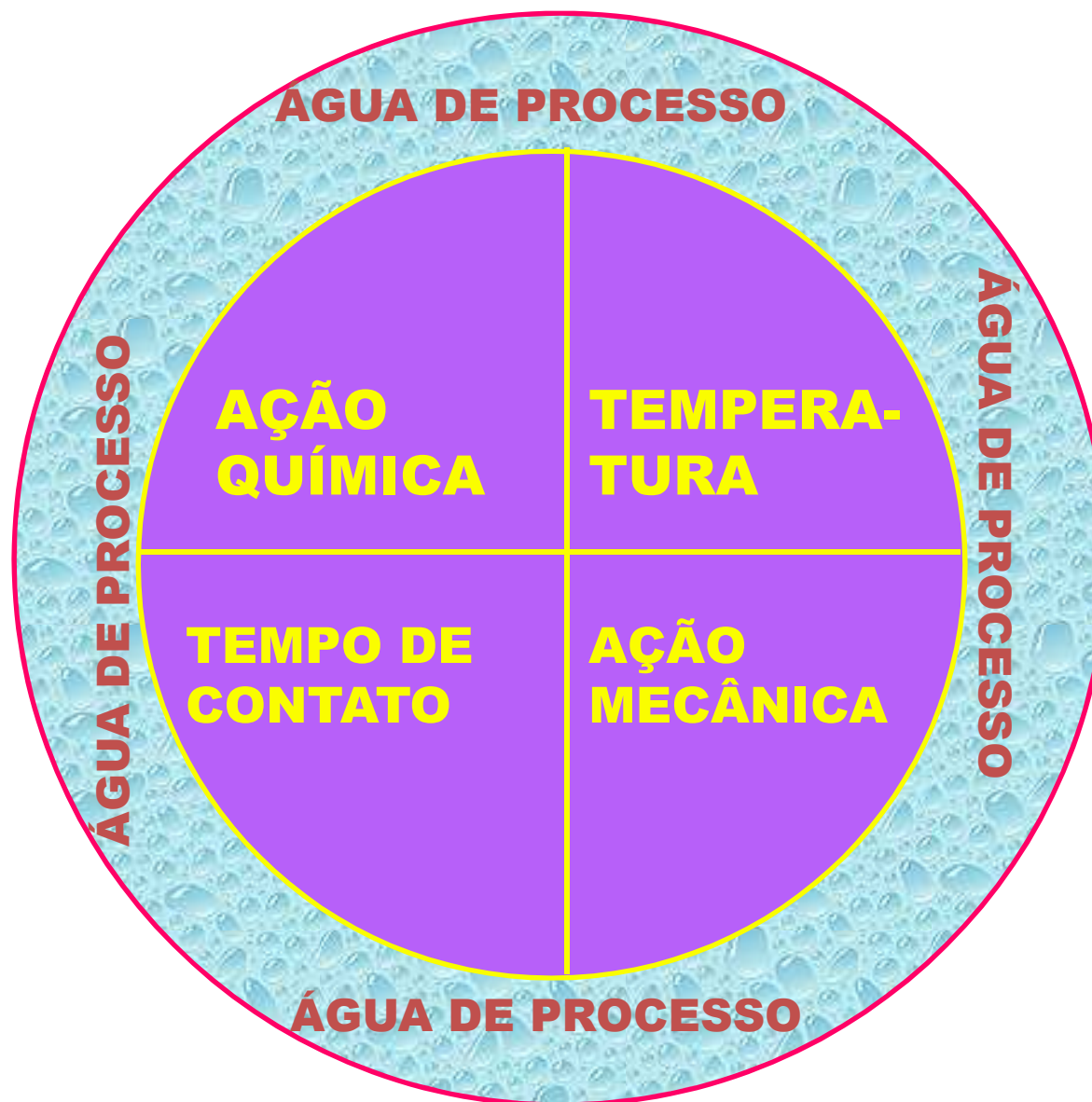
Lisa



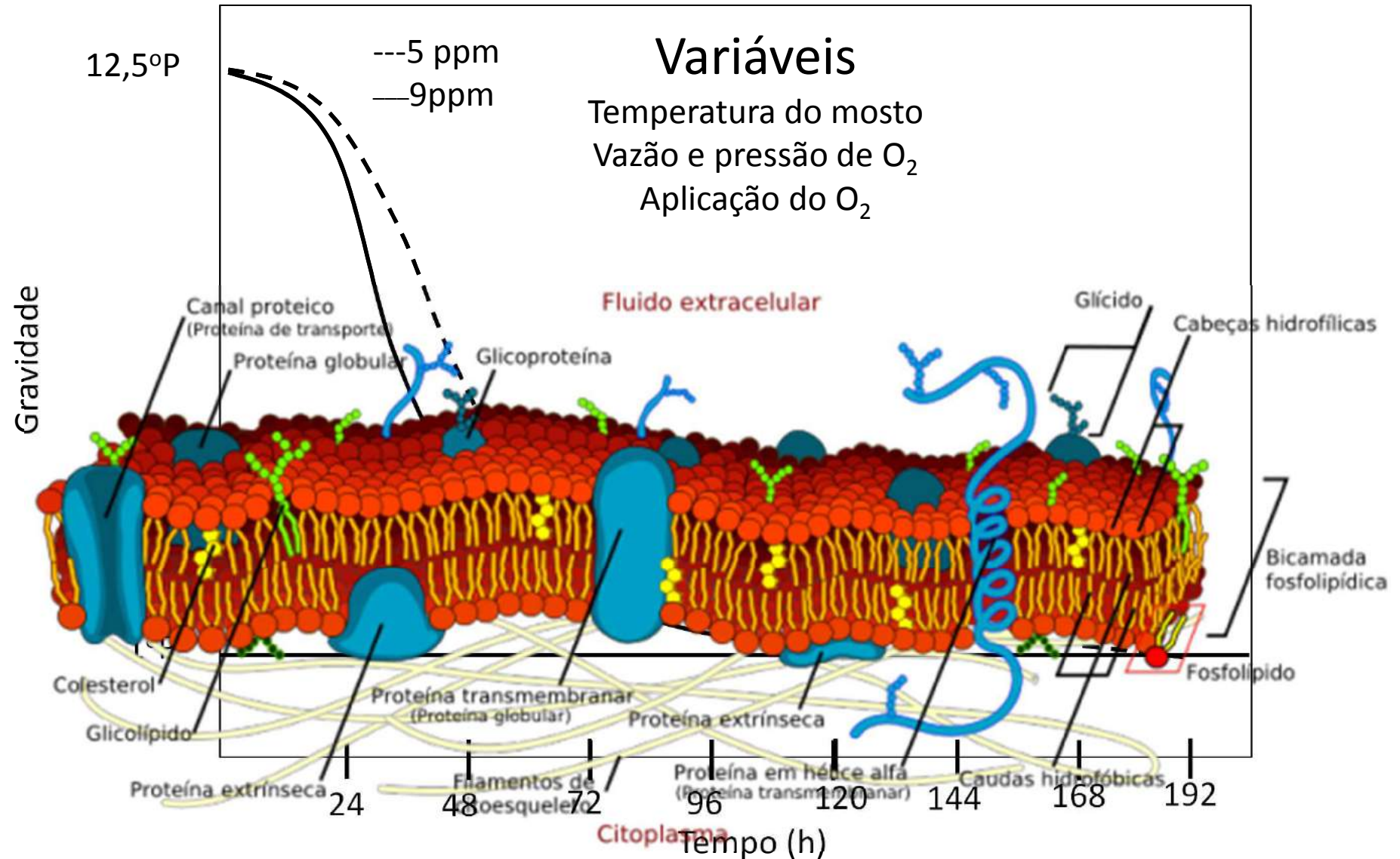
Brilhante



Limpeza



Oxigênio



Cinética de fermentação com diferentes concentrações de oxigênio dissolvido ²

Solubilidade do Oxigênio

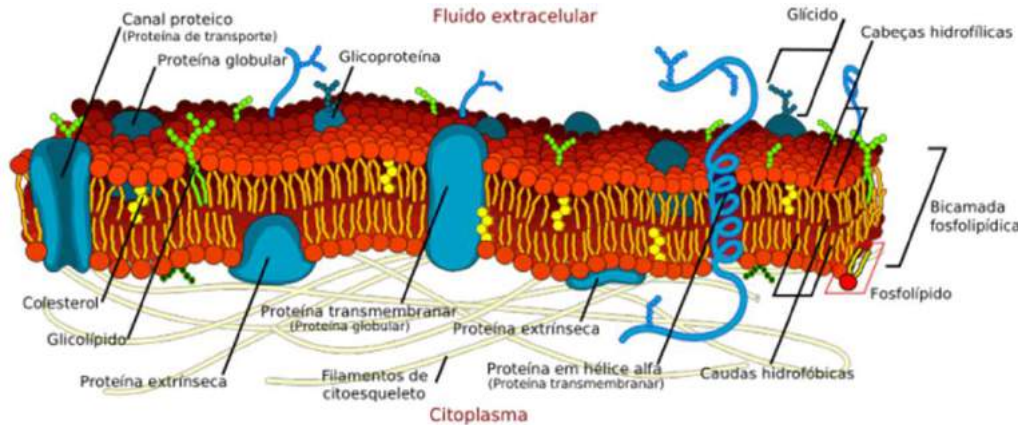
Tabela 01. Solubilidade do oxigênio (mg O₂/L) do ar em água e mosto em diferentes temperaturas e para oxigênio puro, todos e pressão atmosférica. ³

Temperature		From air		From oxygen
(°C)	(°F)	Water	Wort (12%)	Water
0	32	14.5	11.6	69
3	37.4	–	–	64
5	41	12.7	10.4	61
8	46.4	–	–	56
10	50	11.2	9.3	54
15	59	10.0	8.3	48
20	68	9.9	7.4	–

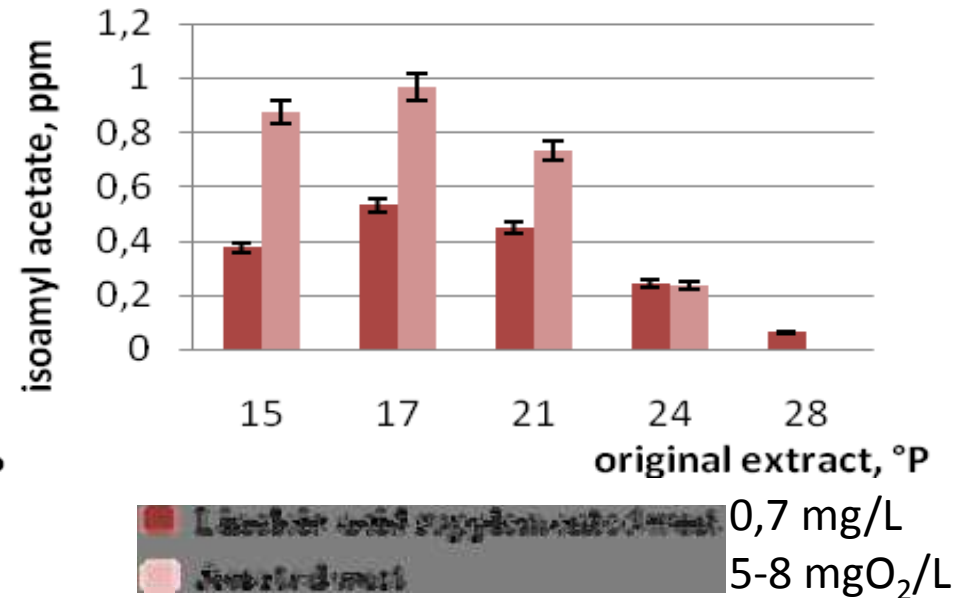
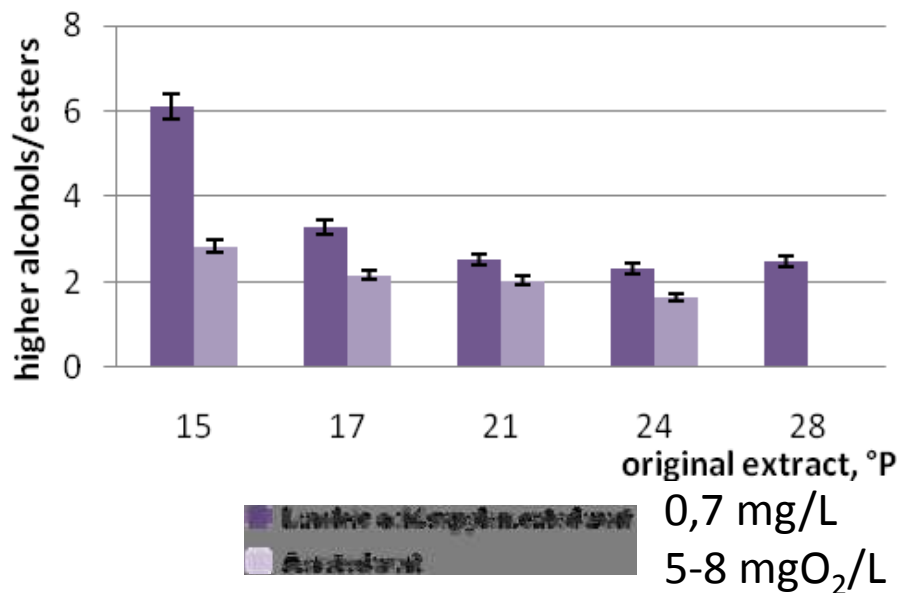
Tabela 02. Amostras de níveis de oxigênio dissolvido em microcervejarias. ²

Volume de Mosto (L)	Vazão de O ₂ (L/min)	Duração (min)	Gravidade Inicial (°P)	Oxigênio Dissolvido (ppm)
6359,49 (40bbl)	6	40	12,5	5,00
2384,80 (15 bbl)	6	45	13,2	5,42
2384,80 (15 bbl)	12	75-80	25,5	5,50
1589,87 (10 bbl)	6	35	12,3	5,85
6359,49 (40bbl)	7	40	12,3	6,20
2384,80 (15 bbl)	7	40	12,7	6,54
1589,87 (10 bbl)	7	35	12,5	7,20
1589,87 (10 bbl)	6	30	14,4	8,10
1589,87 (10 bbl)	7	30-40	12,0	8,25

Oxigênio x Ácido Graxo (azeite)



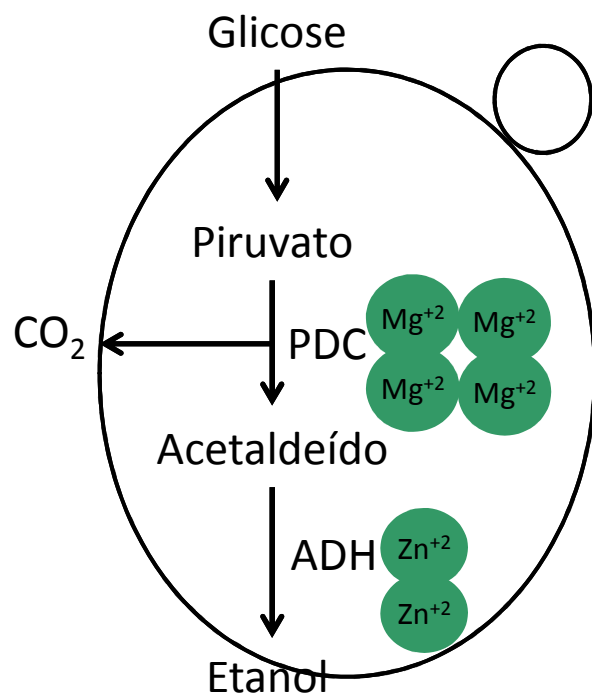
Experimento
 19°C
 1,5x10⁷ cel/mL (91,04%)
 pH = 5,34-5,3



Diferentes na produção de álcool superior e acetato de isoamila em experimentos utilizando aeração ou ácido linoleico. ⁴

Nutrientes

Levedura $C_{47}H_{6,3}O_{33}N_8P_{1,2}S_{3,5}$



Magnésio e Zinco

1. Requerido para reações de fosforilação oxidativa, síntese de ATP, síntese de DNA e regulação da informação genética;
2. Representa 0,3% da massa celular;
3. Importante no metabolismo fermentativo:

Vitaminas

1. Requerido como co-fatores das reações enzimáticas;

Biotina: reações de carboxilação > síntese de aminoácidos

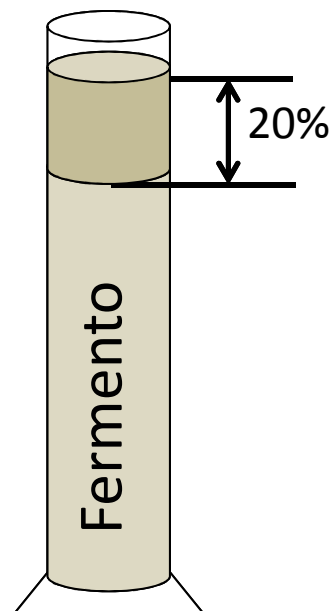
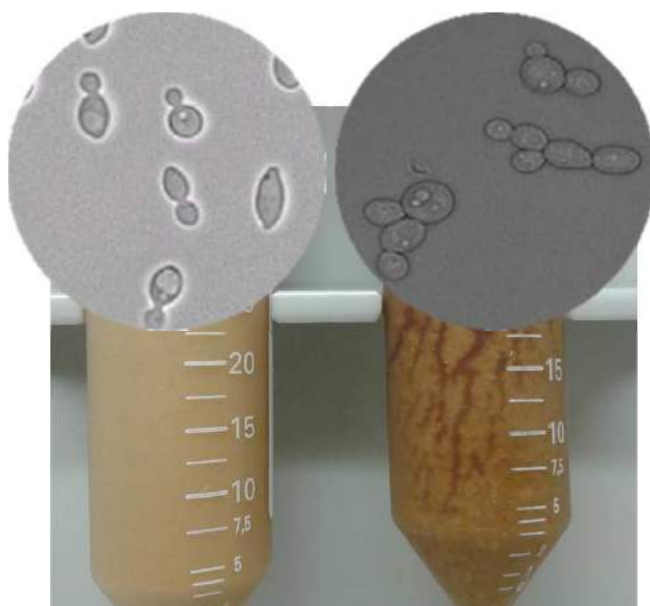
Ácido pantotênico: forma coenzima A

Ácido nicotínico: nicotinamida para síntese de ATP

Tiamina (vitamina B): reações de carboxilação

Floculação

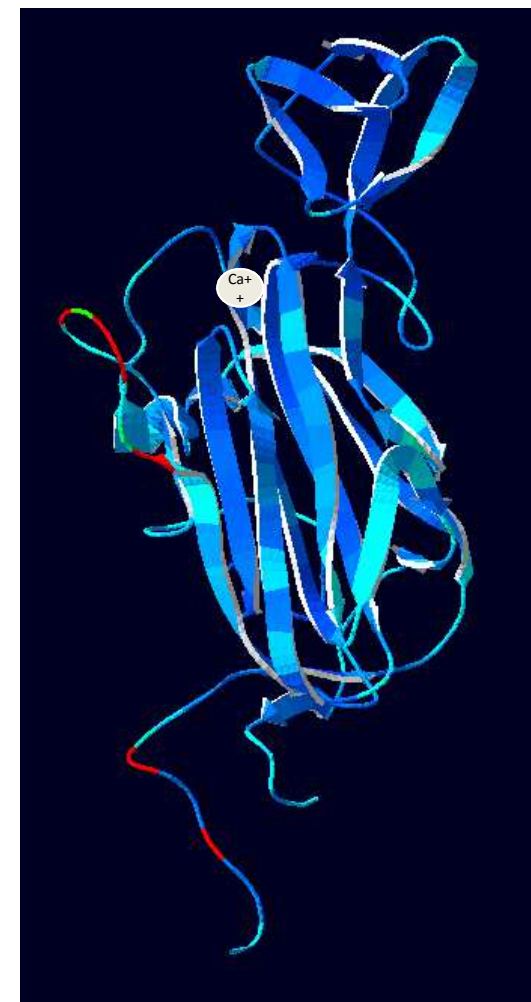
- A adesão celular → Floculação de levedura;



Floculação

Fatores que influenciam a floculação

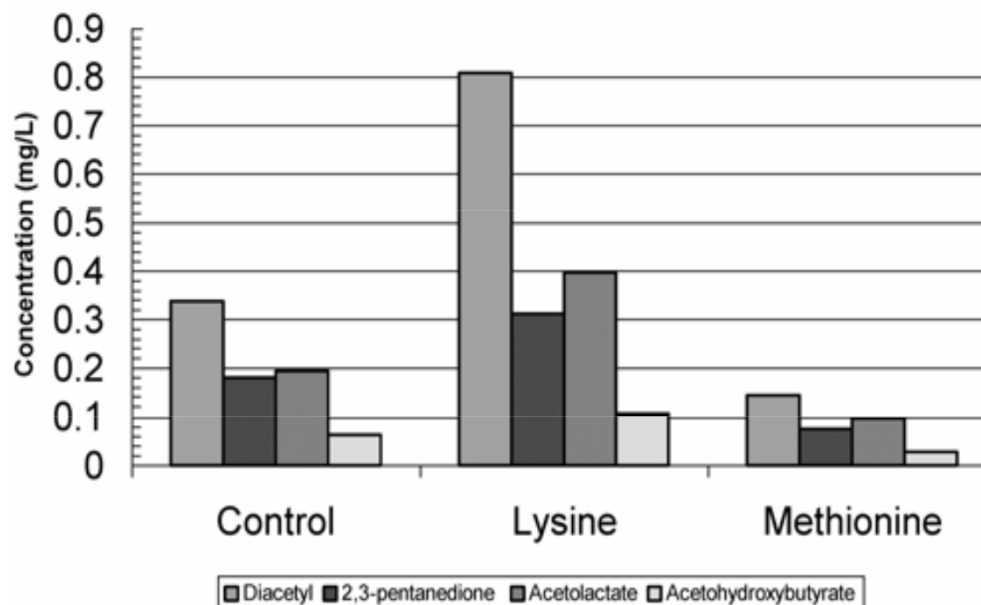
- pH,
- temperatura, etanol
- **Oxigenação**
- disponibilidade de **cálcio** ⁵



Amnoácidos

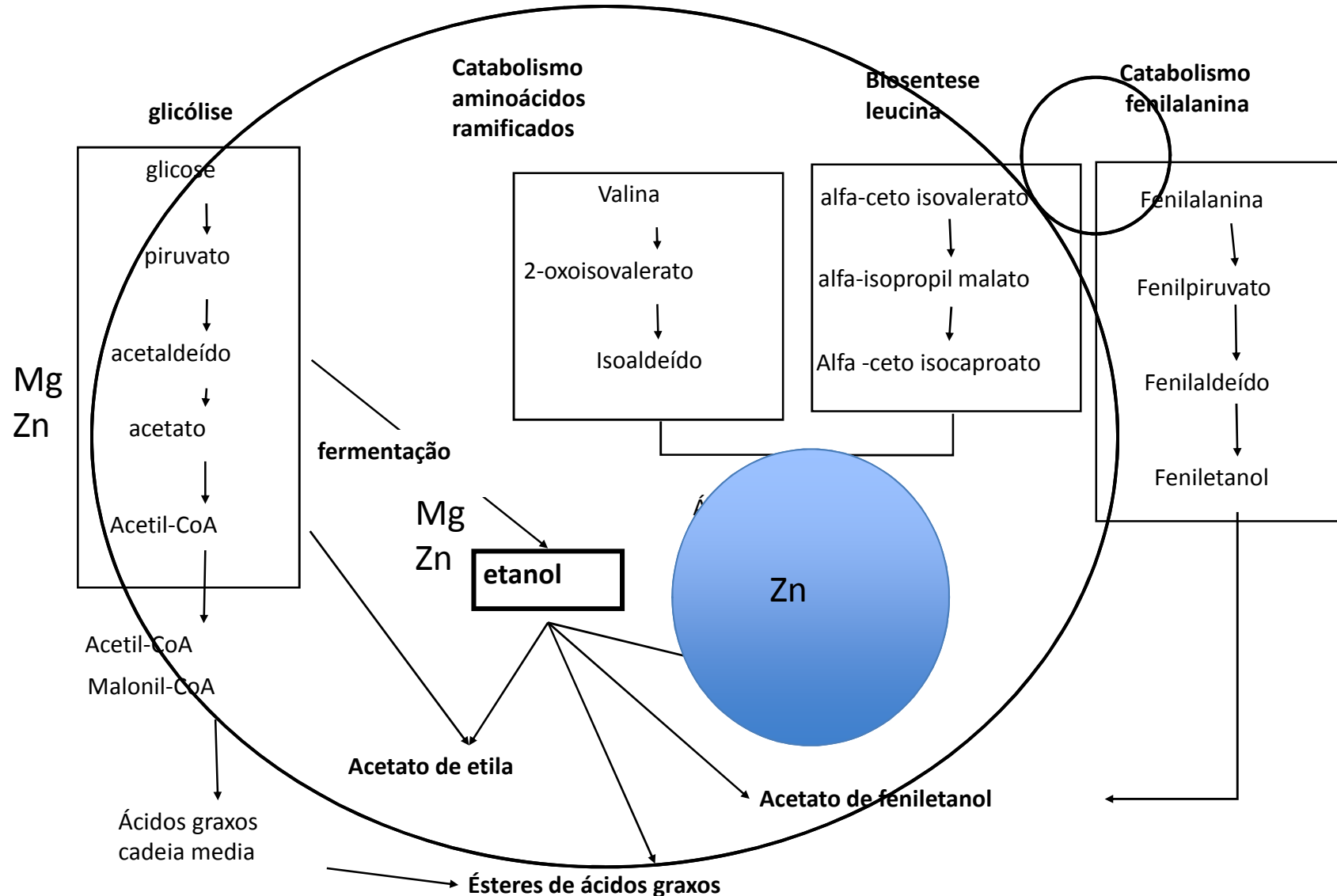
Tabela 03. Classificação dos aminoácidos do mosto de acordo com o seu consumo pela levedura.⁷

Group A Fast Absorption	Group B Intermediate Absorption	Group C Slow Absorption	Group D Little or No Absorption
Glutamic acid	Valine	Glycine	Proline
Aspartic acid	Methionine	Phenylalanine	
Asparagine	Leucine	Tyrosine	
Glutamine	Isoleucine	Tryptophan	
Serine	Histidine	Alanine	
Threonine		Ammonia	
Lysine			
Arginine			



Concentração de dicetonas vicinais no final da fermentação ⁷

Vias da produção de ésteres



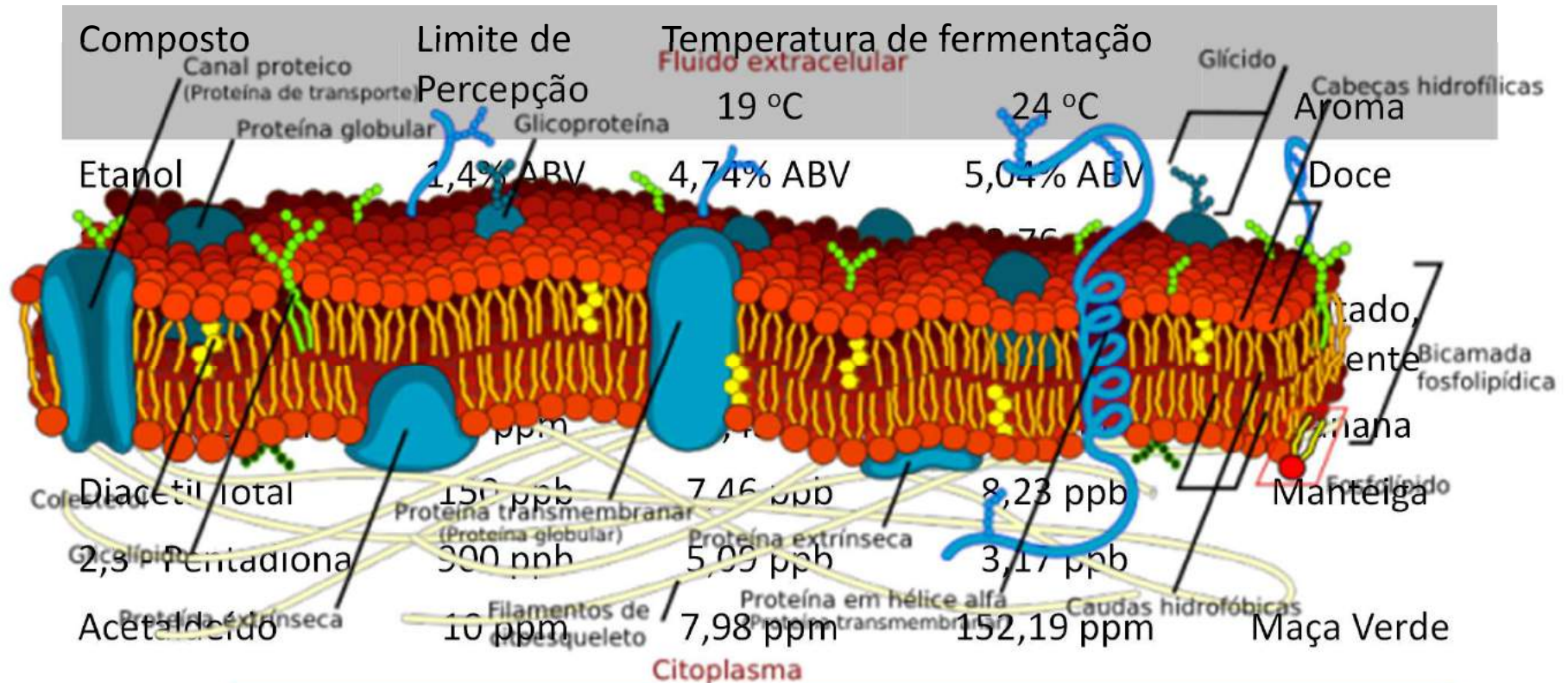
Produção de ésteres durante a fermentação. ⁷

Temperatura

Temperatura

Lager
9-14 °C

Ale
16-26 °C



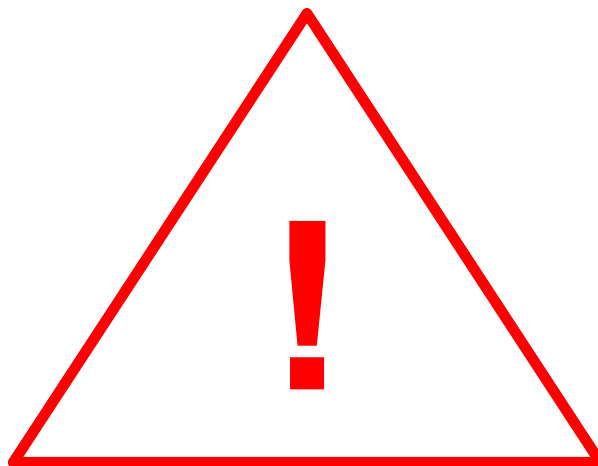
Cromatografia gasosa comparando duas cervejas com mesmo mosto e levedura ALE, fermentada em duas temperaturas

Inóculo

Microcervejaria

Cálculo de células viáveis para uma adequada taxa de inoculação

CUIDADO



Cálculo

Qual a taxa de inóculo mais indicada?

Densidade Inicial

Ale

$$0,5 \cdot 10^6 \text{ cel/mL/}^\circ\text{P}$$

Ex.: 12 °P

$$C_2 = 12 \cdot 0,5 = 6 \cdot 10^6 \text{ cel/mL}$$

Lager

$$1 \cdot 10^6 \text{ cel/mL/}^\circ\text{P}$$

Ex.: 12 °P

$$C_2 = 12 \cdot 1 = 12 \cdot 10^6 \text{ cel/mL}$$

Variáveis

Limpeza
Viabilidade e Vitalidade

Resultado

Tempo de fermentação
Produção de aromas

Taxa de inóculo

Ex. Para um volume de brassagem de 10 hL de uma cerveja do tipo **ALE** e mosto com 12 °P de concentração.

ALE

Taxa de inóculo (**TI**) = $0,5 \times 10^6$ cel/mL/°P (0,75 x 10⁶ cel/mL/°P (WHITE, C., 2010))

Densidade da cerveja (**OG**) = 12°P (1,045 g/mL)

Concentração de fermento (**CF**) = **TI x OG** = $0,5 \times 10^6$ cel/mL/°P x 12°P

CF = 6×10^6 cel/mL

Volume da brassagem (**VB**) = 10 hL = 1.000.000 mL

Concentração de fermento (**CF**) = 6×10^6 cel/mL

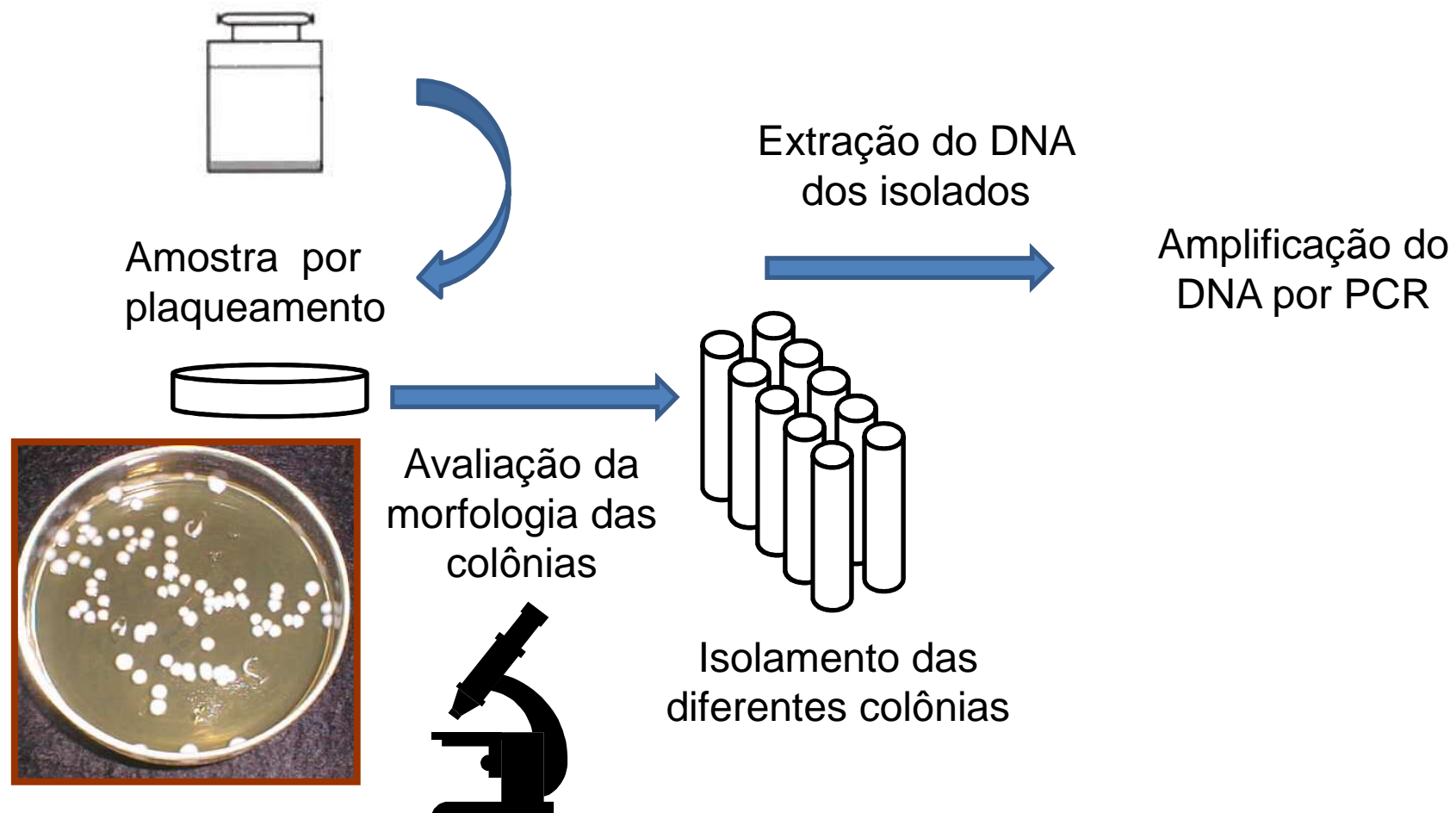
Quantidade de fermento (**QF**) = **CF x VB** = 6×10^6 cel/mL x 1.000.000 mL

QF = 6.000.000.000.000 = 6 trilhões

Seleção de leveduras

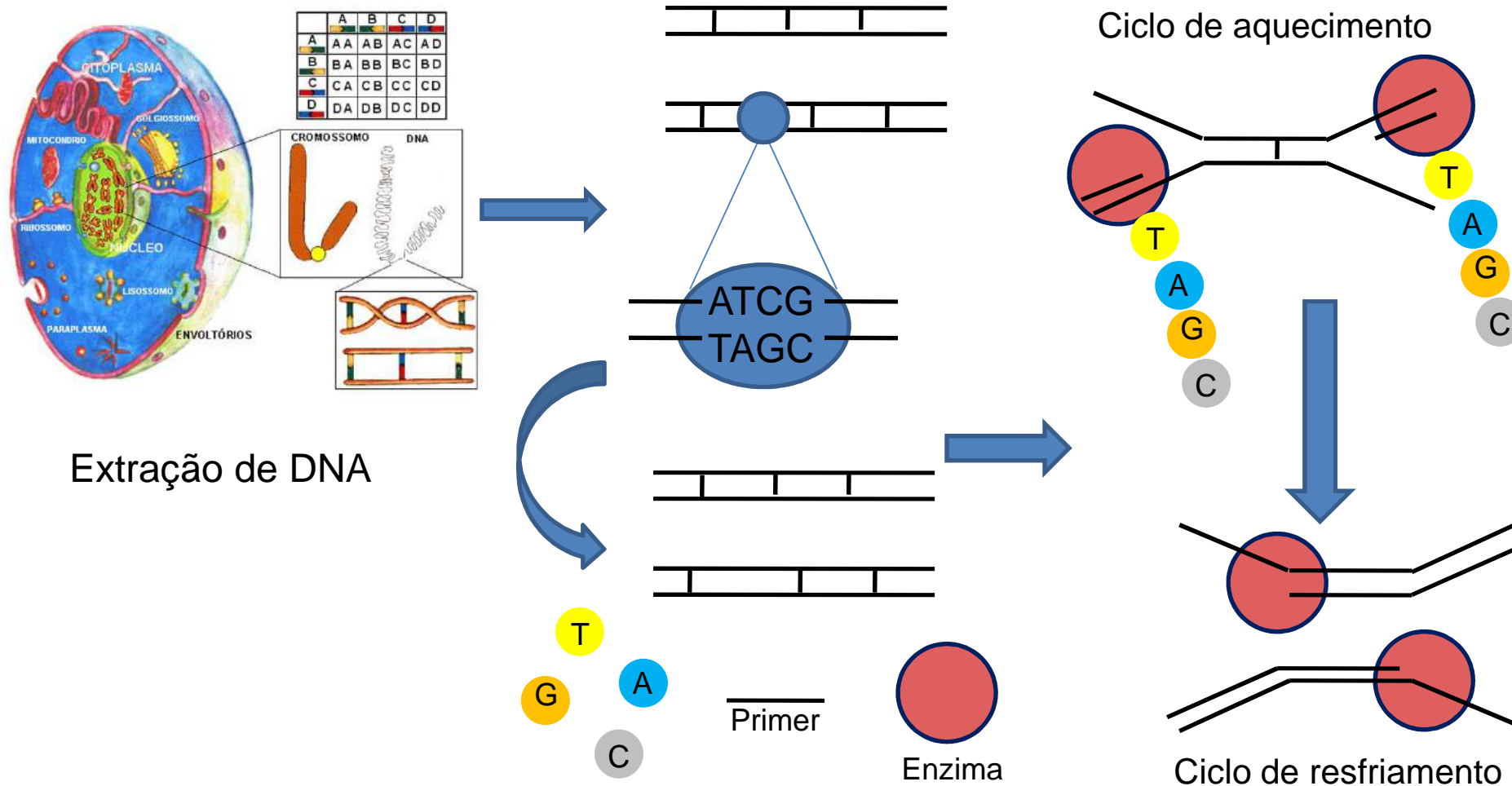
1ª Etapa – isolamento e extração de DNA

Amostra *in natura*



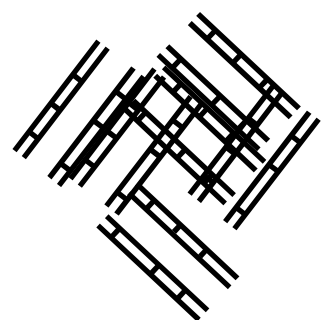
Seleção de leveduras

2ª Etapa – amplificação do DNA

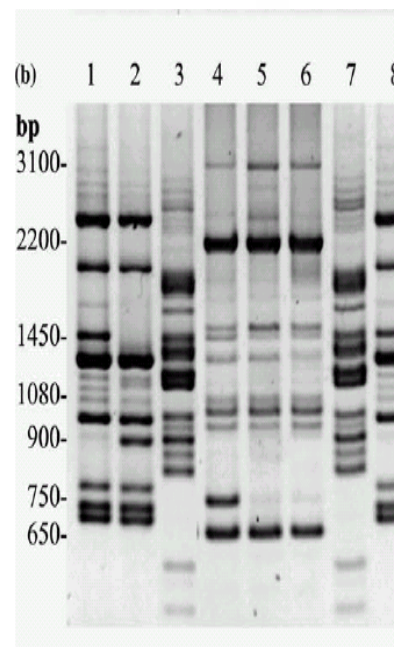
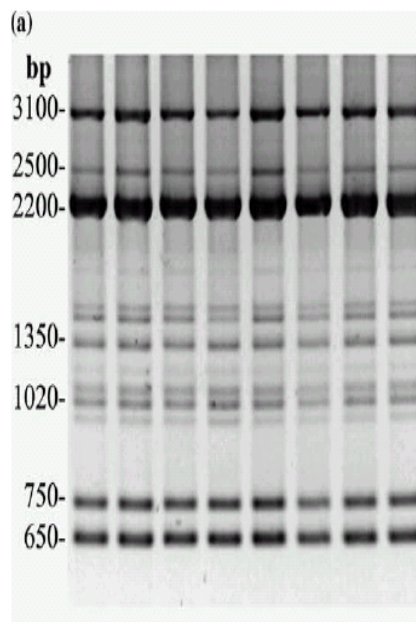
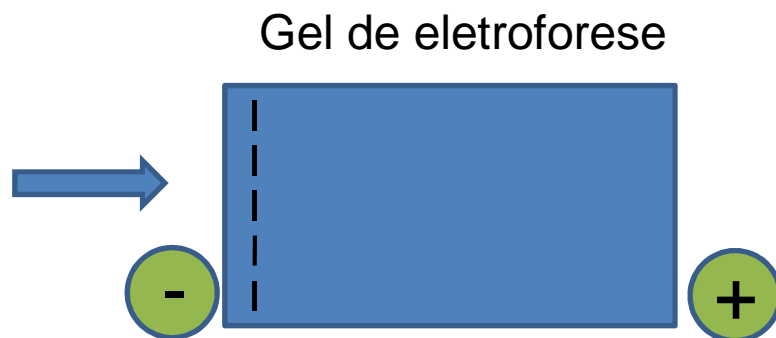


Seleção de leveduras

3ª Etapa – eletroforese

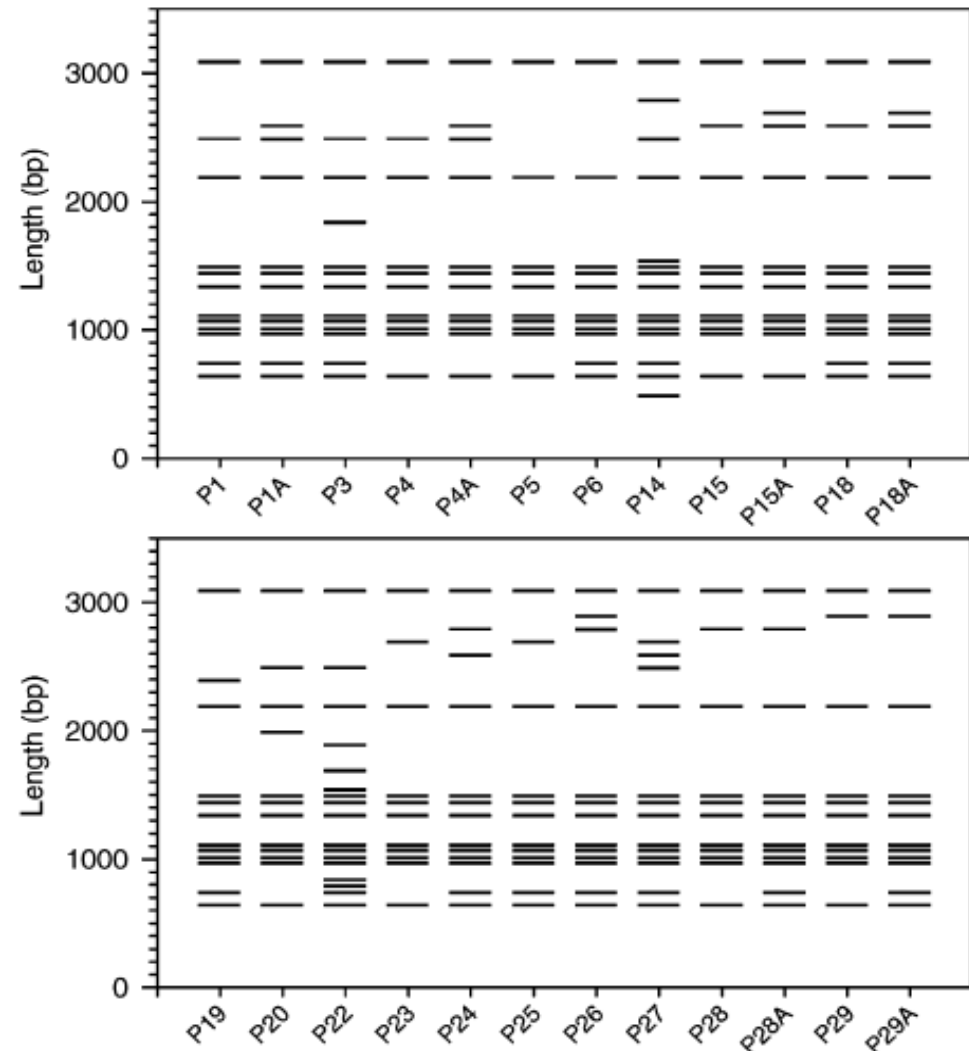


DNA amplificado



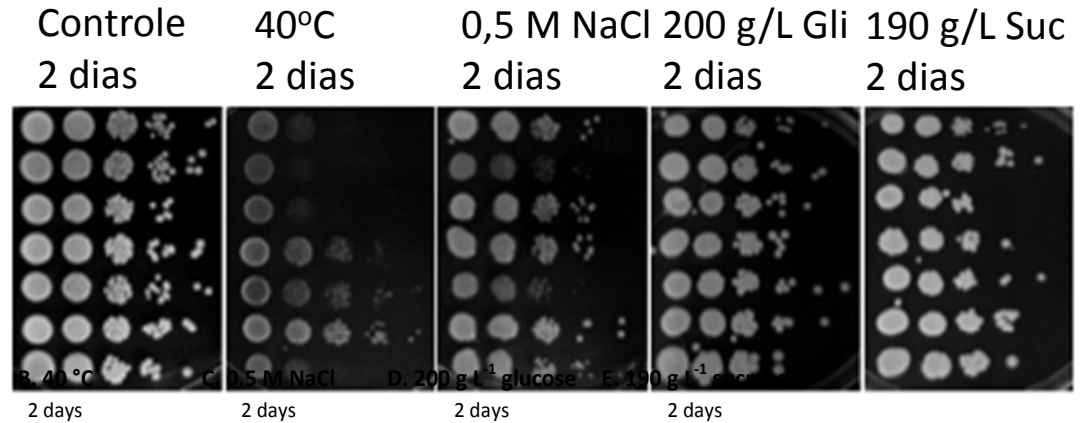
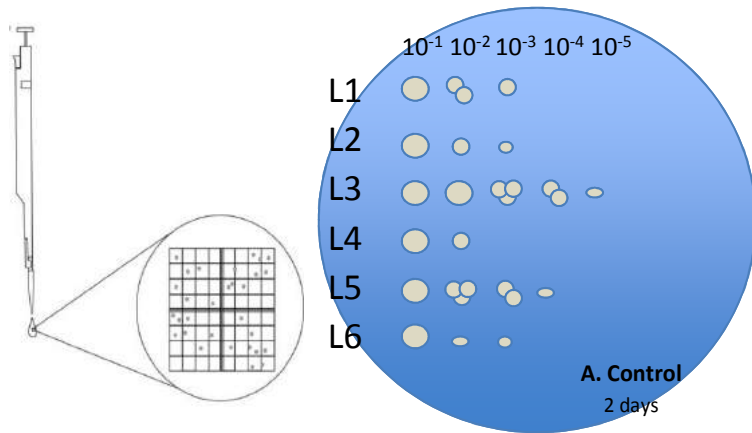
Seleção de leveduras

4ª Etapa – banco genético



Seleção de leveduras

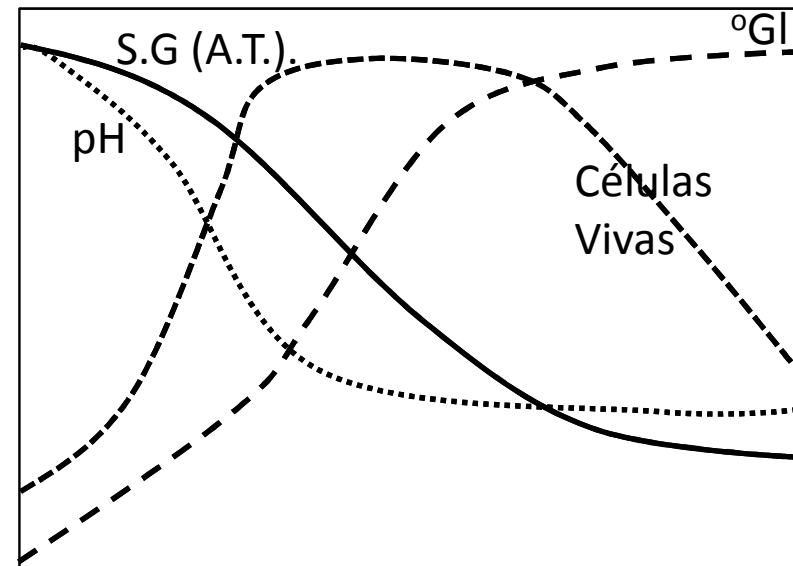
5ª Etapa – screening inicial



Meio YPD 2% Açucar Total



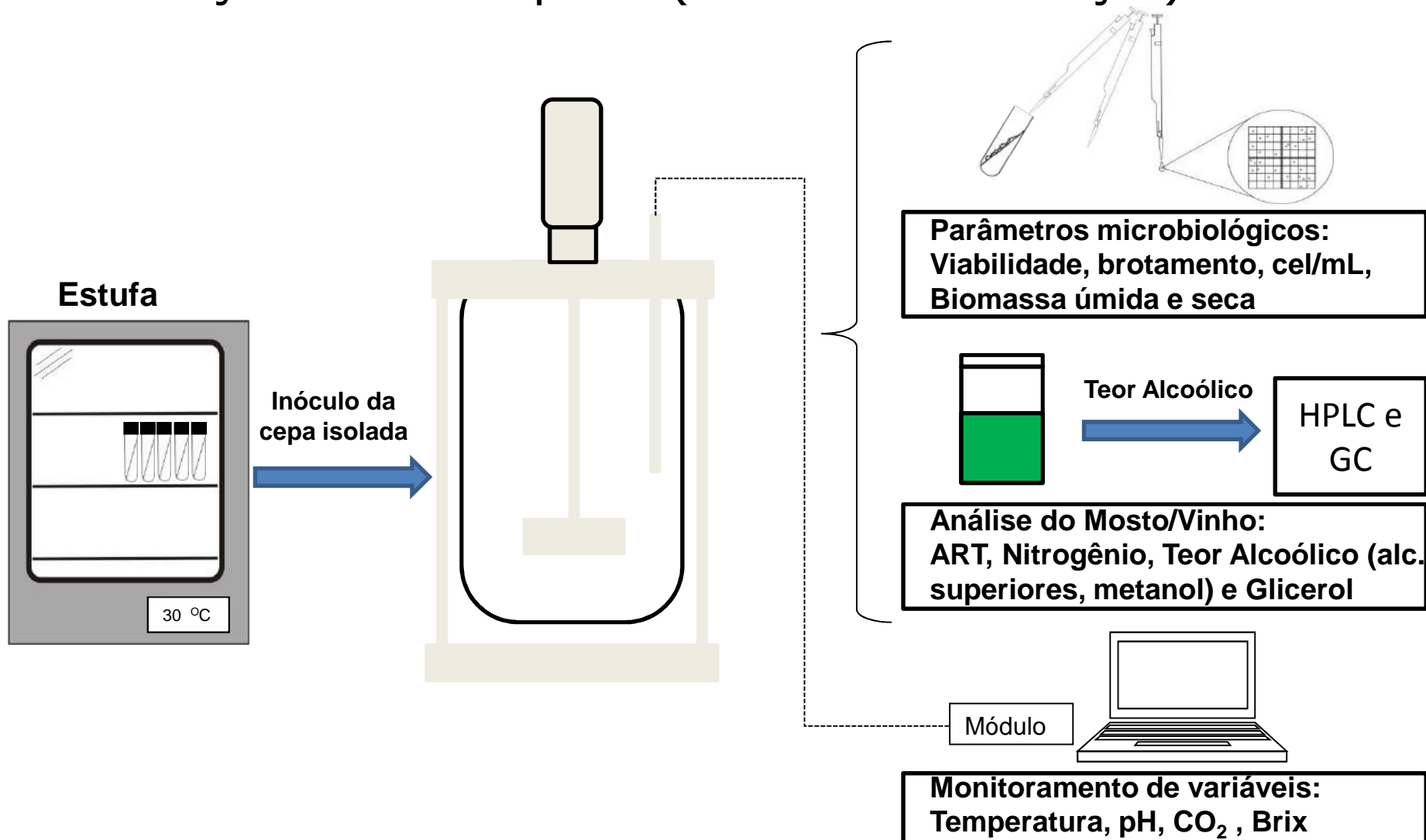
Sacarose
Maltose
Maltotriose



Seleção de leveduras

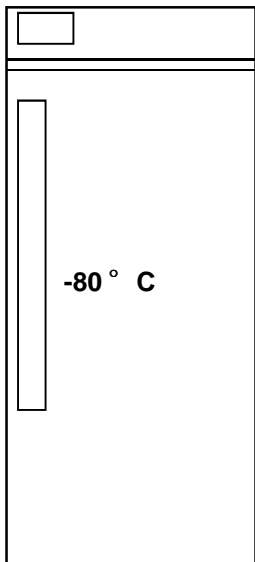
6ª Etapa – Caracterização bioquímica

fermentação em escala piloto (ciclos de fermentação)

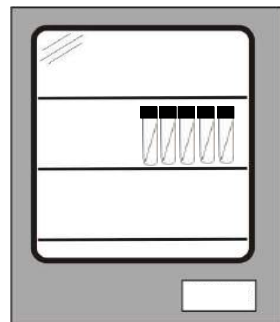


Manutenção das Leveduras

Ultra Freezer

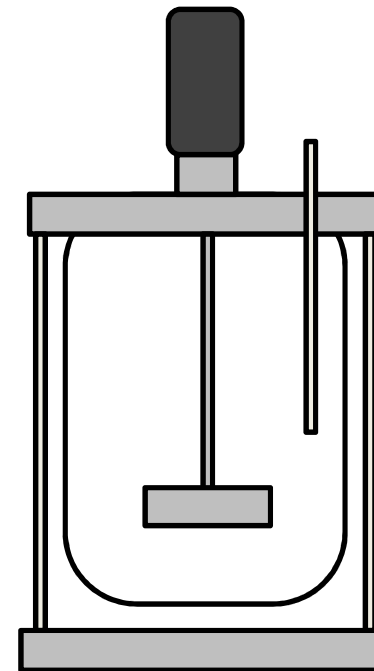
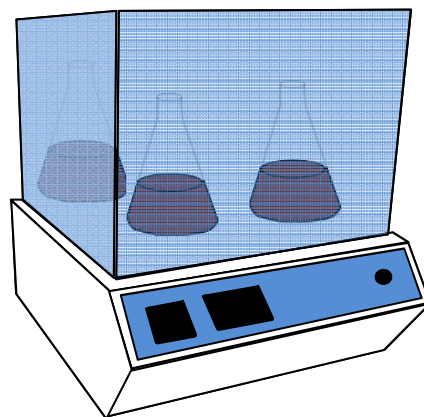


Estufa

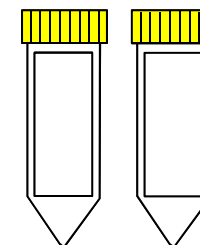
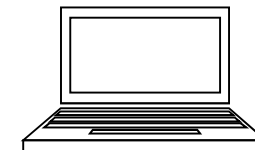


Cultivo de Leveduras

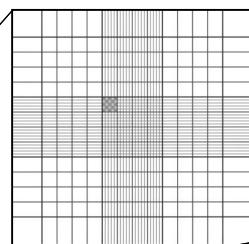
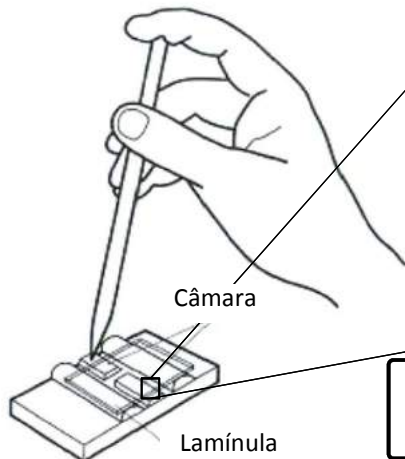
Shaker



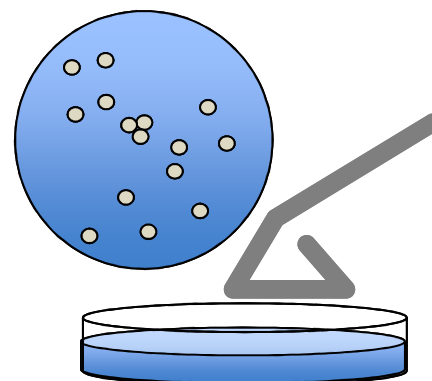
Biorreator



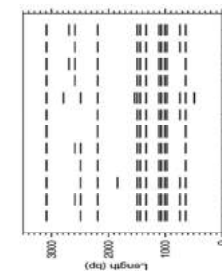
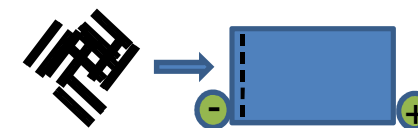
Controle de Qualidade



Viabilidade celular
Concentração celular
Coloração de GRAM



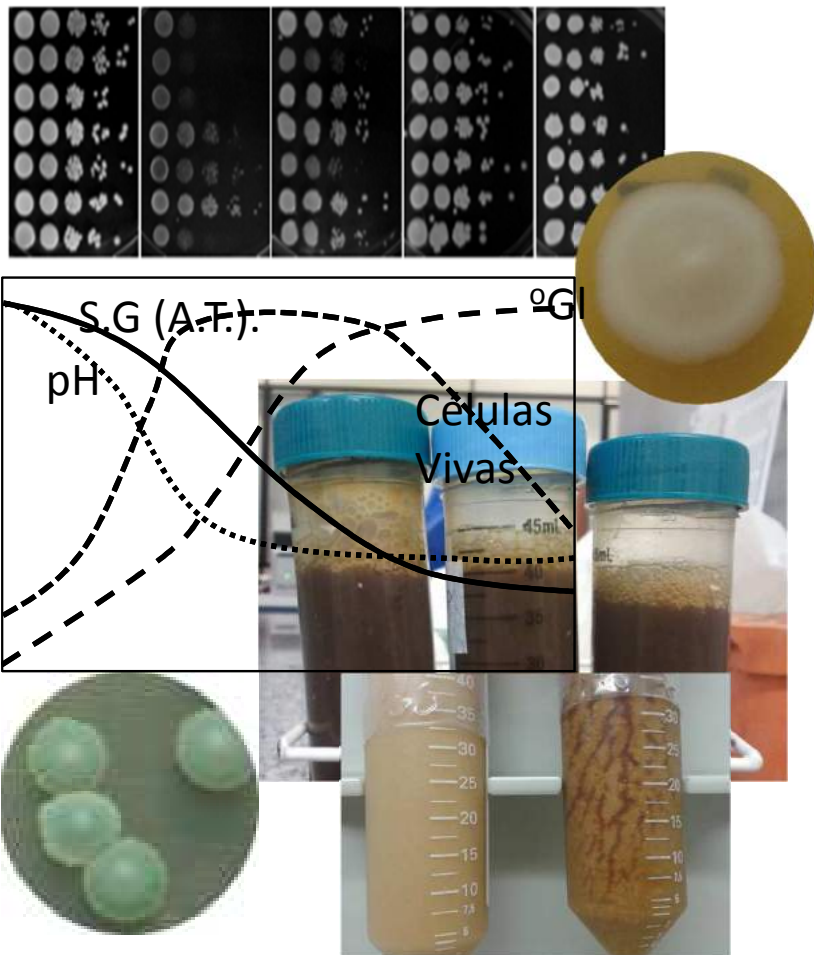
Contaminação (UFC/mL)
Teste para melibiose
Petit mutant



Cariotipagem genética
Fingerprinting da levedura
Banco genético de leveduras

Seleção de leveduras

Metabolismo/Genoma X Aplicação no processo



Análises Físico-Químicas

Densidade Real (mg/mL)

Extrato Original (% p/p)

Extrato Aparente (% p/p)

Extrato Real (% p/p)

Álcool (% p/p)

Álcool (% v/v)

Cor (EBC)

pH

Calorias (Kcal/100mL)

Amargor (IBU)

Dicetonas Vicinais Totais (mg/L)

Teste de Pasteurização

Turbidez (EBC)

Turbidez 0oC (EBC)

Teste Forçado (Shelf Life)

Oxigênio Dissolvido (mg/L)

Polifenóis Totais na Cerveja (mg/L)

Acidez Total (mg/L)

Gluten em Bebidas (ELISA) (ppm)

Atenuação Real (%)

Açúcar Total (g/L)

Açúcares Redutores Totais (g/L)

Cromatografia Gasosa (sob consulta)

Análises Microbiológicas

Contagem de Leveduras Câmara de NEUBAUER (Contagem e Viabilidade)

Contagem Total de Bactérias em Anaerobiose de Cerveja (Morfologia + GRAM) (UFC/mL)

Contagem Total de Bactérias em Aerobiose de Cerveja (Morfologia + GRAM) (UFC/mL)

Contagem Total de Bactérias em Anaerobiose de Fermento (Morfologia + GRAM) (UFC/mL)

Contagem Total de Bactérias em Aerobiose de Fermento (Morfologia + GRAM) (UFC/mL)

Plaqueamento leveduras (Morfologia e Contagem)

Petit Mutant Teste

Análise de Floclulação

Identificação de Leveduras Selvagens

Análise de Leveduras do Tipo LAGER x ALE

Análise de Leveduras Não *Saccharomyces*



Referências Bibliográficas

- 1) Pasteurs, L. Studies on fermentation. The diseases of beer. Their causes and the means of preventing them. London. Macmillan & Co, 1879.
- 2) White, C; Zainasheff, J. Yeast - The Practical Guide to Beer Fermentation. Brewers Publication, 2010.
- 3) Briggs, D. E.; Boulton, C. A.; Brookes, P. A.; Stevens, R. Brewing Science and practice. Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC, 2004.
- 4) Bonciu, C. RESEARCH CONCERNING THE INFLUENCE OF LINOLEIC ACID ADDITION IN WORT COMPARING WITH WORT AERATION. Innovative Romanian Food Biotechnology Vol. 4, Março, 2009.
- 5) Sim, L.; Groes, M.; Olesen, K.; Henriksen, A. Structural and biochemical characterization of the N-terminal domain of flocculin Lg-Flo1p from *S. pastorianus* reveals a unique specificity for phosphorylated mannose. FEBS Journal, Denmark, 2010
- 6) Brown, A.K.; Hammond, J.R.M. FLAVOUR CONTROL IN SMALL-SCALE BEER FERMENTATIONS. *Brewing Research International, Surrey, UK, vol 42, 2005.*
- 7) C. Lekkas,¹ G. G. Stewart,¹ A. Hill,¹ B. Taidi,² and J. Hodgson²
1. The Importance of Free Amino Nitrogen in Wort and Beer. . International Centre of Brewing and Distilling (ICBD)

Obrigado!

