

 **Bio4**  
 Soluções Biotecnológicas

# História



Mesopotâmia



Duque da Bavária, Wilhelm IV (1516)



*S. carlbergensis*

9.000 anos  
Fermentação de  
alimentos

500 anos  
Adição de lúpulo

150 anos  
Isolamento da  
Primeira Levedura

A origem do Sour

Lambics  
Berliner Weisse

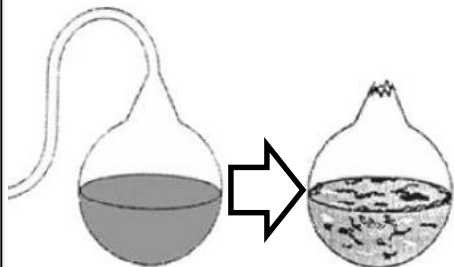
Surgimento de  
Estilos

# História



Louis Pasteur (1860)

Teoria da geração espontânea?



Emil Christian Hansen (1883)



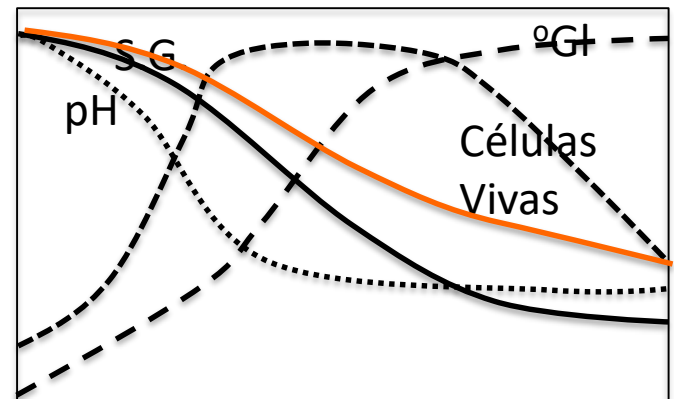
*Saccharomyces carlsbergensis*



N. Hjelte Claussen – propôs o nome da nova levedura de *Brettanomyces* (British Brewing Fungus) como responsável pela fermentação secundária (1904)



M.T.J. Custers – Efeito Custer (1940)



L. PASTEUR.

Brewing Beer and Ale.

No. 135,245.

Patented Jan. 28, 1873.

Fig. 1.

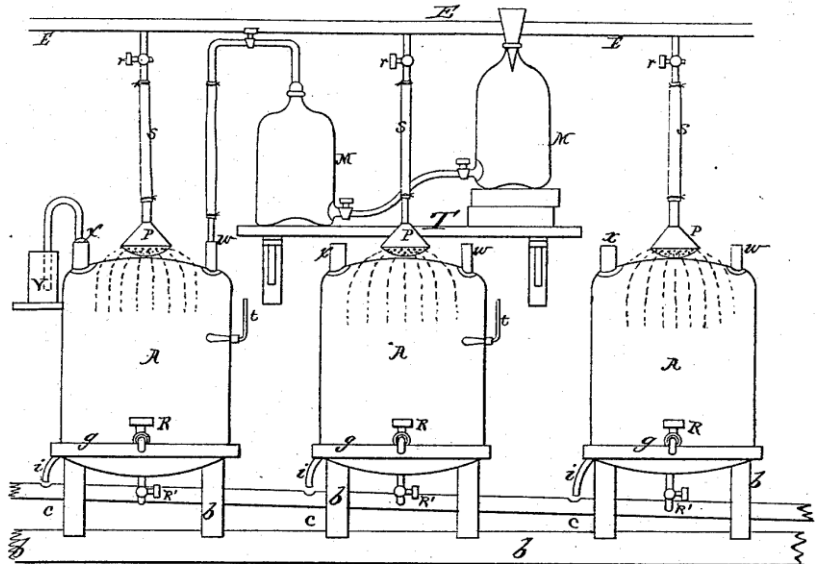
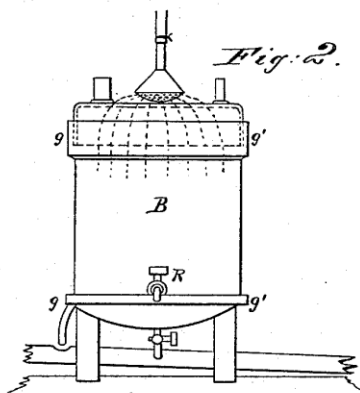


Fig. 2.



Witnesses,  
*C. Wolf*  
*J. Helbel*

Inventor  
*Louis Pasteur*  
 By his attorney  
*C. M. Keller*

a **STUDIES ON FERMENTATION**

THE DISEASES OF BEER

THEIR CAUSES, AND THE MEANS OF PREVENTING THEM

BY  
**L. PASTEUR**

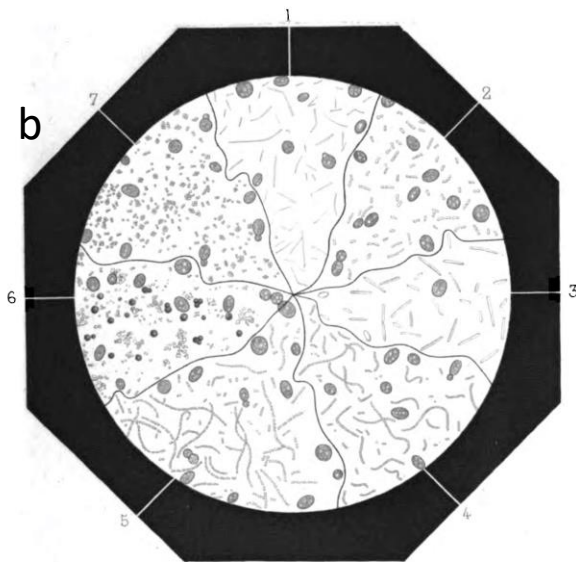
MEMBER OF INSTITUTE OF FRANCE, THE ROYAL SOCIETY OF LONDON, ETC.

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**



(a) Primeiro livro de L. Pasteur

(b) Diferentes formas de microrganismos 1

# MICHAEL JACKSON – THE BEER HUNTER (1942 – 2007)



No mundo da comida e da bebida, existe uma família abençoada com A vida eterna:  
a dos **FERMENTADOS**.

Há um apelo primitivo no que é gerado por fermentação – A sensação de algo **SELVAGEM**.

(Guia ilustrado Zahar - Cerveja)

# Sensorial



Ácido acético (vinagre)



Limpa



Ester



Funk (fenol)



Ácido láctico



Sour

# Cervejaria (1.900)



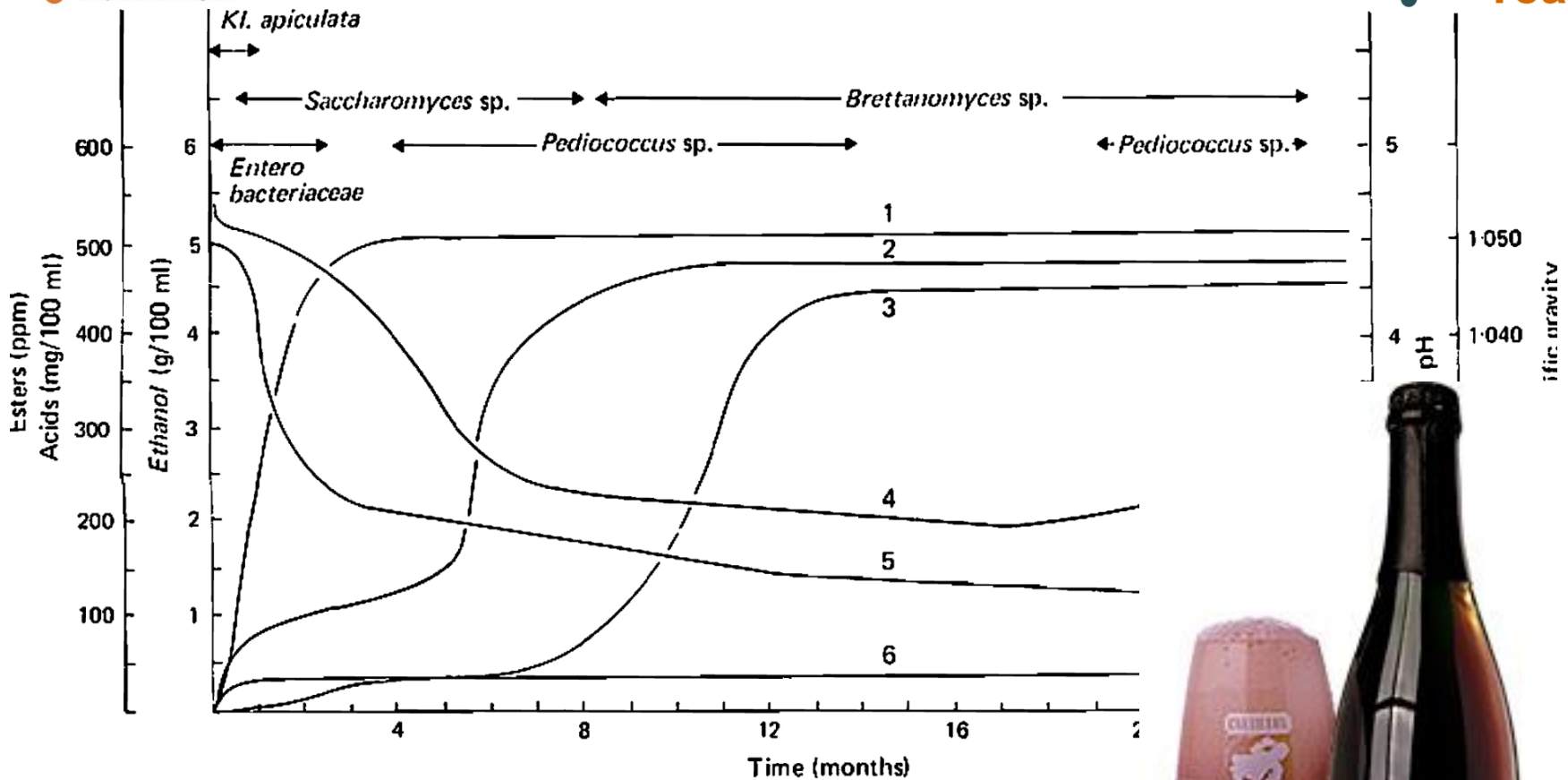


fig. 3. Evolution of some important parameters of spontaneous Lambic fermentation: 1 = catechins; 4 = pH; 5 = real extract content; 6 = acetic acid.



- Enterobacter(3 to 7 dias)
- \* Kloeckera apiculata (3 to 7 dias)
- \* Saccharomyces (2 semanas)
- \* Bactérias Ácido Láctica(3 to 4 meses)
- \* Brettanomyces (8 meses)

# Morfologia

*Saccharomyces sp.*



*Brettanomyces sp.*



*B. lambicus*



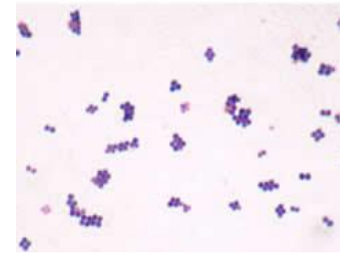
*B. clausenii*



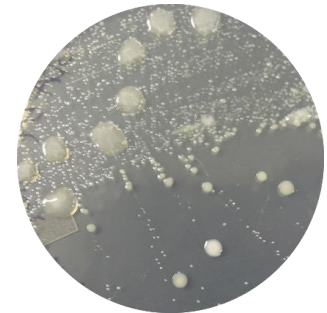
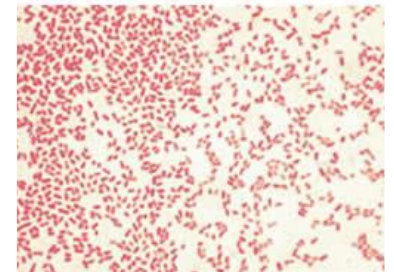
*B. bruxellensis*

*Bactérias*

**Gram-positivas**

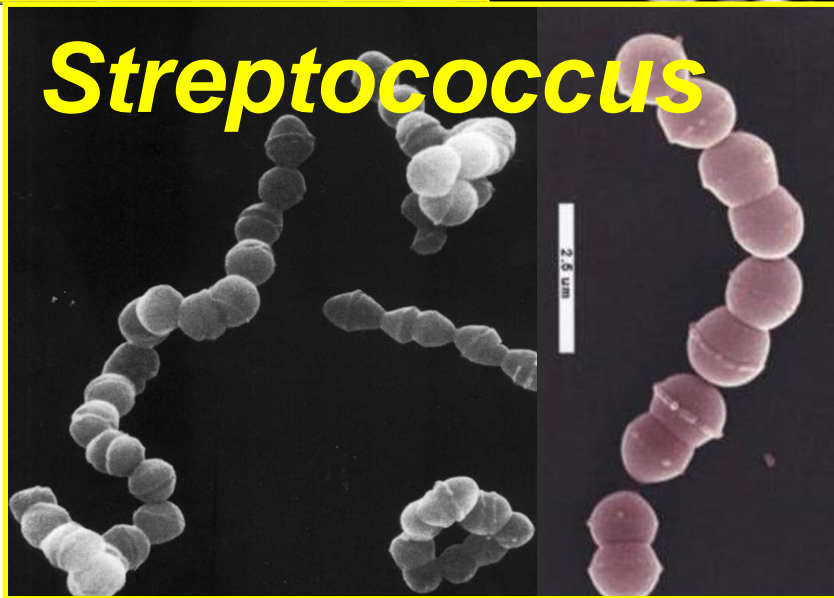
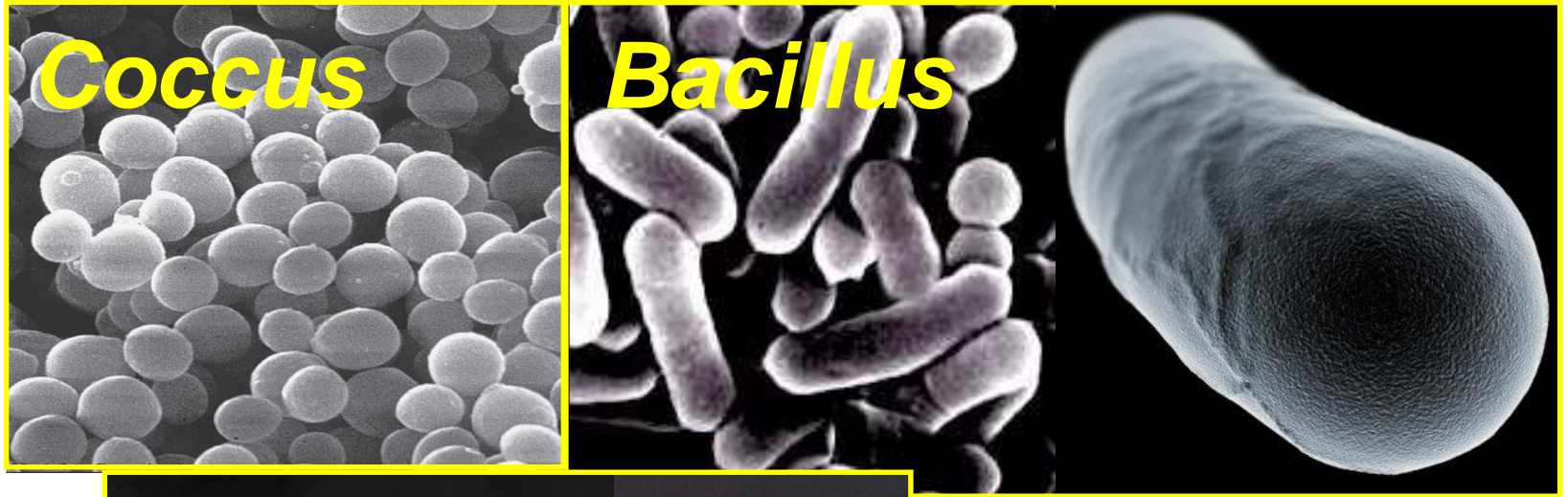


**Gram-negativas**

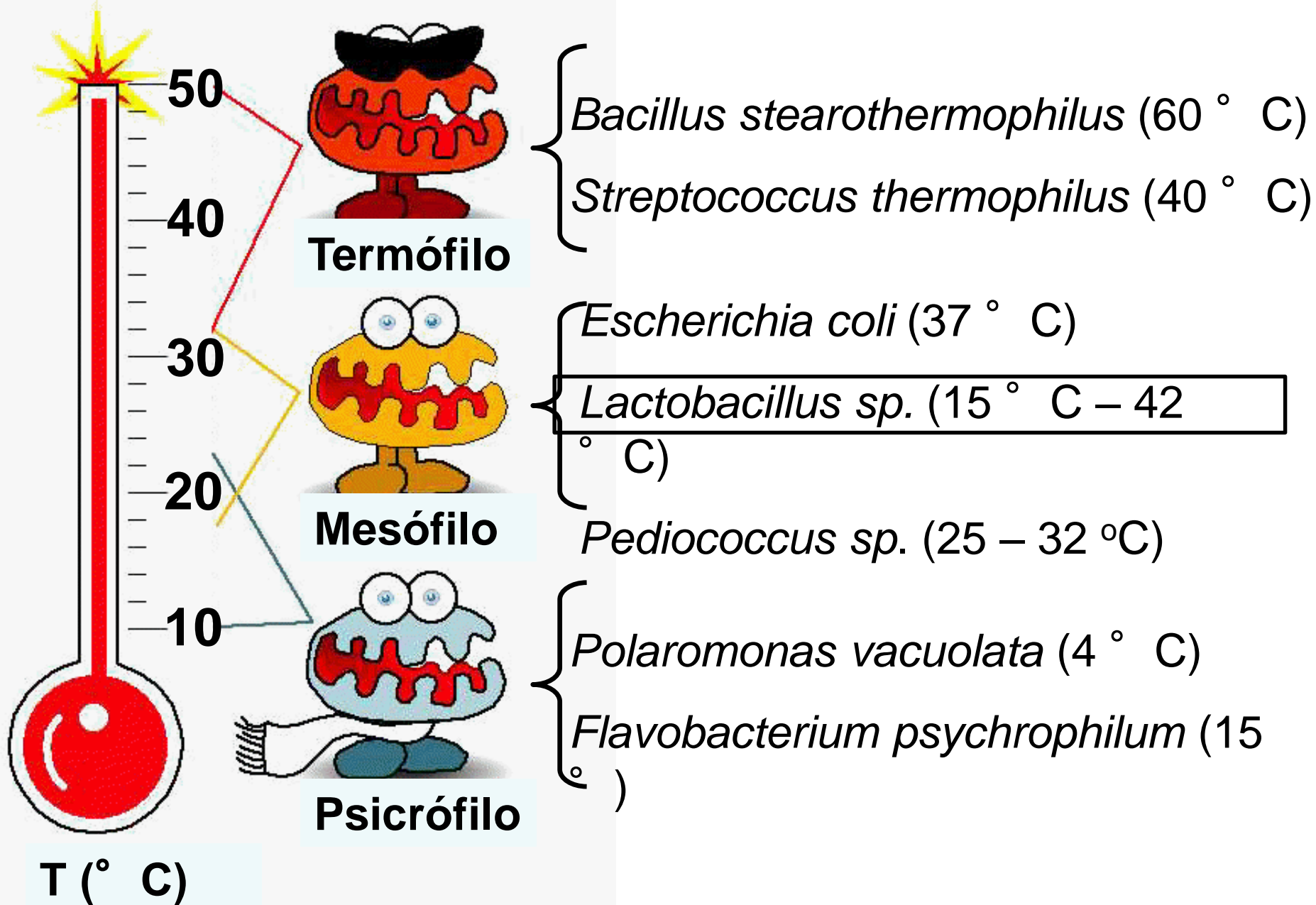


*L. buchneri*

# Bactérias

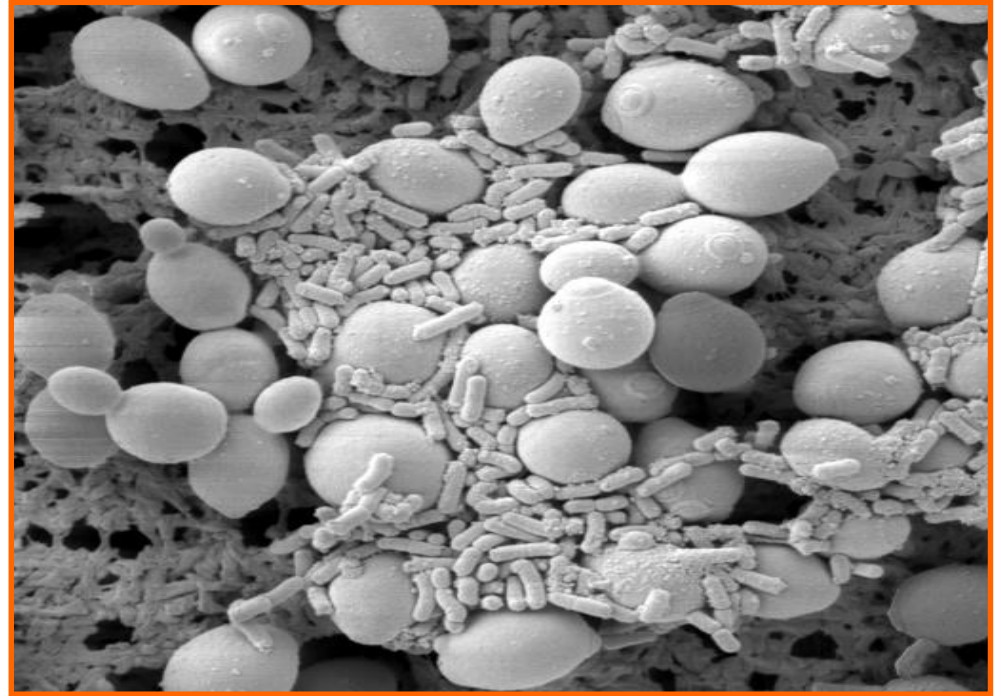


# Temperatura de Crescimento



*Lactobacillus sp.*

*Pediococcus sp.*

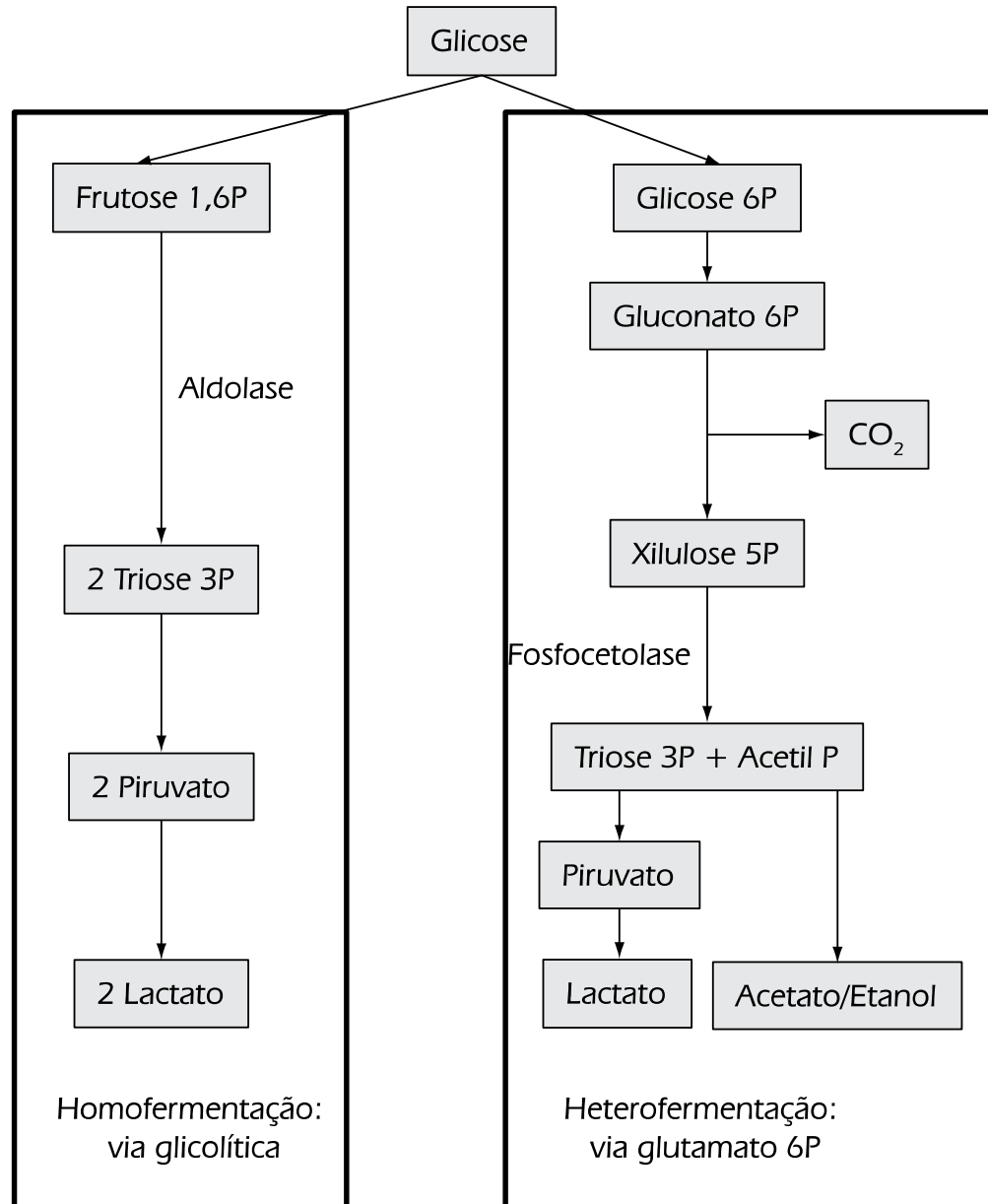


*70% Bactérias Ácido Lácticas (BAL)<sup>3</sup>*

<sup>3</sup>IJIMA, K.; SUZUKI, K.; ASANO, S.; KURIYAMA, H.; KITAGAWA, Y. Isolation and identification of potential beer-spoilage *Pediococcus inopinatus* and beer-spoilage *Lactobacillus backi* strains carrying the *horA* and *horC* gene clusters. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 113, n. 1, p. 96-101, 2007.

# Fermentação Láctica

L. delbruekii  
L. acidophilus



L. buchneri  
L. brevis  
L. plantarum  
L. fermentum  
L. casei

*Pectinatus cerevisiiphilus* -> 15-40 °C

ABV < 4,5%

ác.,. propiônico, acético, láctico e succínico

*Megasphaera cerevisiae* -> 15 – 37 °C

ABV < 3,5%

ác. butírico, acético, isovalérico, valérico, capróico, e acetoína

*Acetobacter aceti* -> 15 – 37 °C

ABV < 11 %

ác. acético

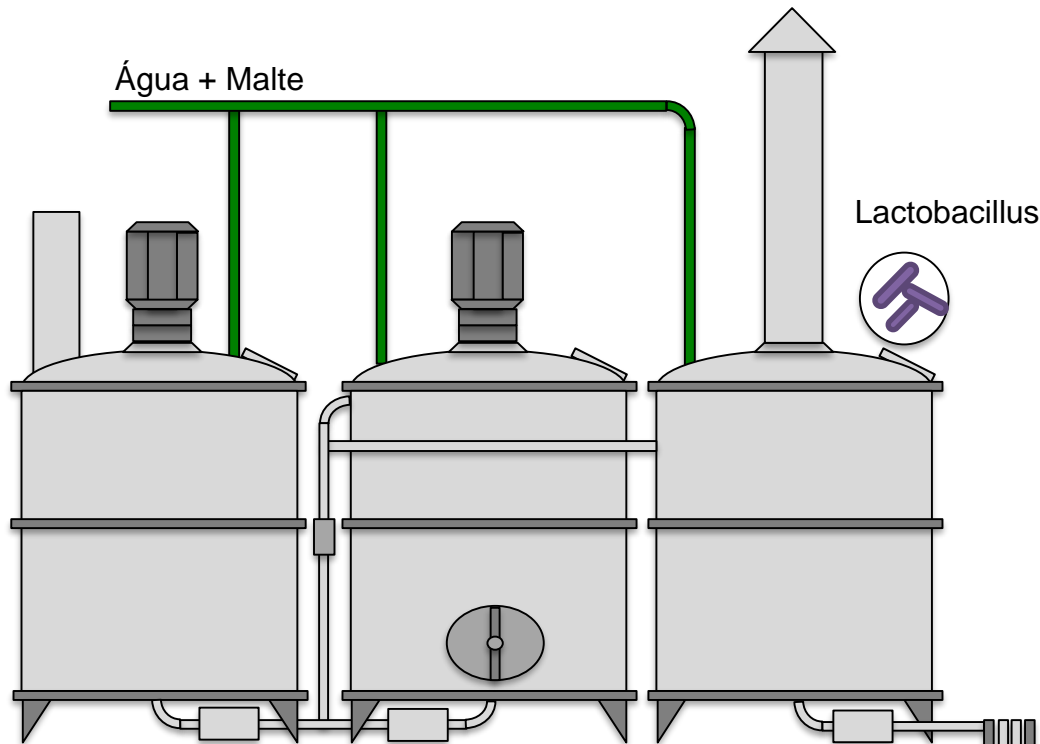
Meio	Bactéria	Recomendado por <sup>a</sup>
MRS (de Man, Rogosa and Sharpe)	BAL <sup>b</sup>	EBC, ASBC, BCOJ
Raka-Ray	BAL, G(-) <sup>c</sup>	EBC, ASBC, BCOJ
VLB S7-S (Versuchs-und Lehranstalt für Brauerei in Berlin)	BAL	EBC, BCOJ
HLP (Meio Hsu's <i>Lactobacillus e Pediococcus</i> )	BAL	EBC, BCOJ
WLD (Wallerstein Differential)	BAL	EBC, BCOJ
Nakagawa	BAL	EBC, BCOJ
DAS (Schwarz Differential Agar)	BAL	EBC, BCOJ
MRS concentrado	G(-)	EBC, BCOJ
PYF (Peptone, Yeasts extract and Fructose)	G(-)	EBC, BCOJ
Meio Thioglycolate	G(-)	EBC
LL-Agar	G(-)	EBC, BCOJ
UBA (Universal Beer Agar)	BAL, G(-)	EBC, ASBC, BCOJ
NBB (Nachweismedium für bierschädliche Bakteriën)	BAL, G(-)	EBC, BCOJ
Meio Brewer's Tomato Juice	BAL, G(-)	ASBC
LMDA (Lee's Multi-Differential Agar)	BAL	ASBC
BMB (Meio Barney-Miller Brewery)	BAL	ASBC
SMMP (Meio seletivo para <i>Megasphaera e Pectinatus</i> )	G(-)	ASBC, BCOJ

<sup>a</sup>EBC, European Brewery Convention; ASBC, American Society of Brewing Chemists; BCOJ, Brewery Convention of Japan.

<sup>b</sup>BAL, Bactérias ácido lácticas.

<sup>c</sup>G(-), Bactérias Gram-negativas.

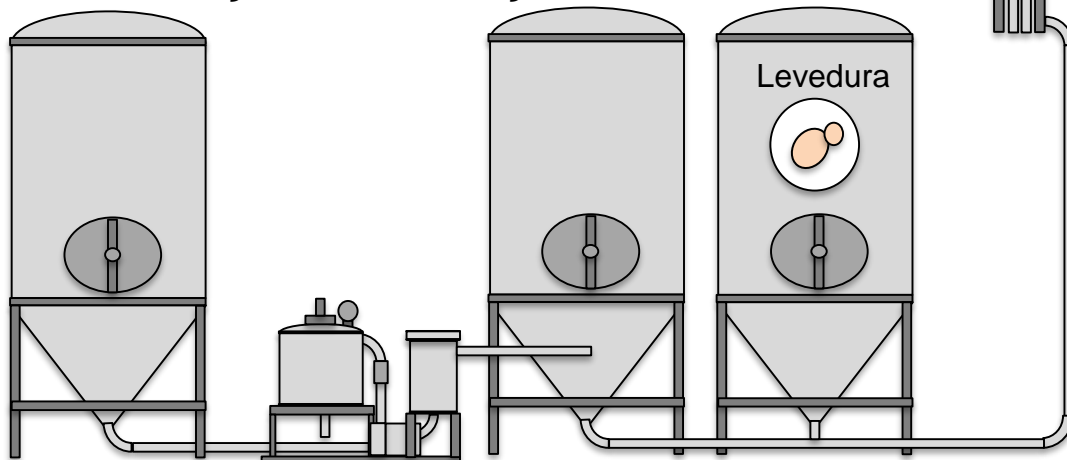
# Sour Kettle



## Na panela de fervura

- 1º Reduzir o pH para 4,5
- 2º Não adicionar lúpulo
- 3º Ferver por 15 min
- 4º Reduzir a temperatura para 40 °C
- 5º Acidificar com  $\text{CO}_2$  (evitando a produção de ac. acético)
- 6º Inocular o *Lactobacillus* sp.
- 7º Tempo de acidificação pH = 3,5 (24 a 48 h)
- 8º Após acidificação ferver o mosto e fazer lupulagem.

## Fermentação e Maturação



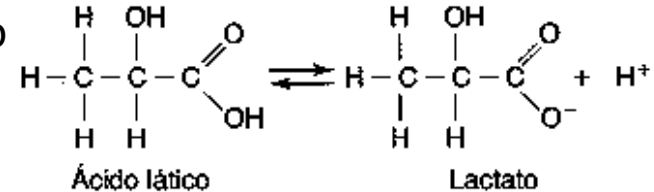
## Na fermentação

- 9º Adicionar a levedura
- 10º Após fermentação, fazer a medição de acidez titulável

# Acidez Titulável x pH

pH – mede a concentração de protons  $H^+$  em solução ( $pH = -\log (H^+)$ )

Acidez titulável – mede a concentração de ácidos em solução



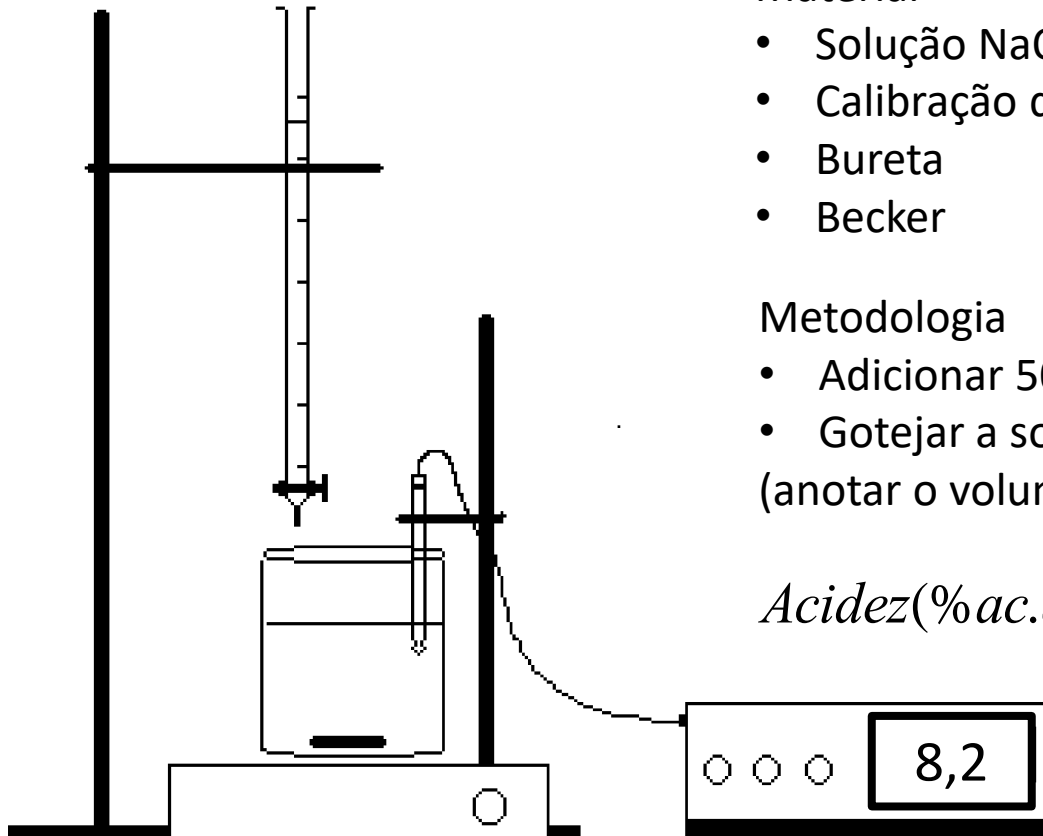
## Material

- Solução NaOH 0,1N
- Calibração do pHmetro
- Bureta
- Becker

## Metodologia

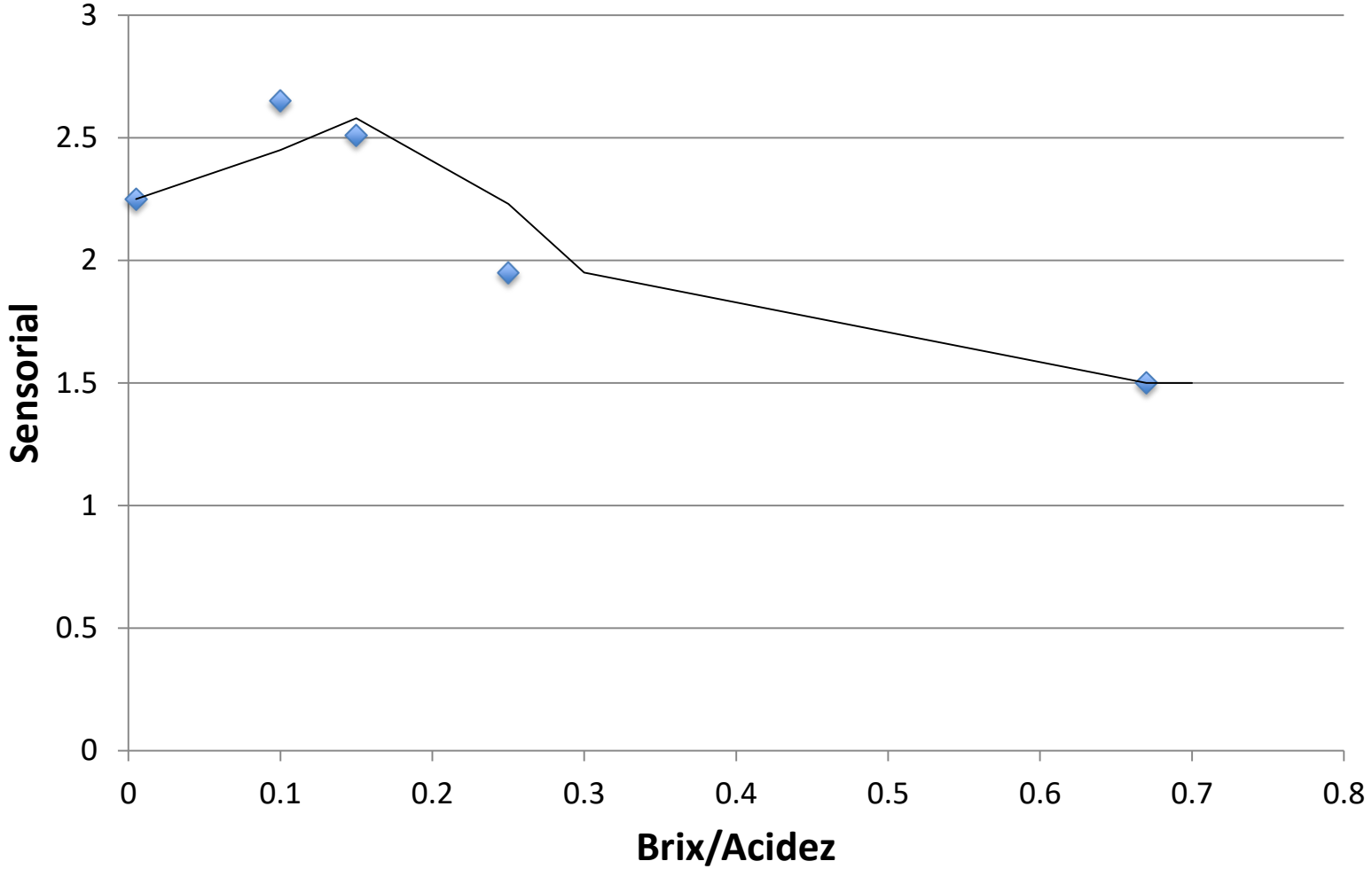
- Adicionar 50mL de cerveja no becker (sem gás)
- Gotejar a solução de NaOH até atingir o pH de 8,2 (anotar o volume)

$$\text{Acidez}(\% \text{ac. acético}) = \frac{mL \text{NaOH} \times 0,9}{S.G \times 50}$$



S.G = gravidade específica (g/mL)  
mL NaOH = volume de NaOH (mL)

# Brix/Acidez



Fonte: Craft Brewers Conference (2015) – Sour Beer – It's more than just a pH – Kara Taylor

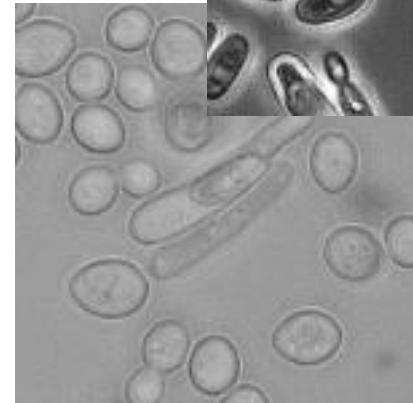
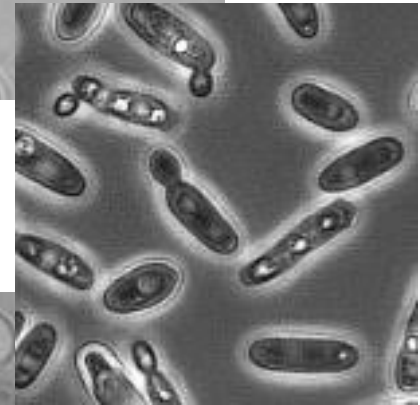
# Brettanomyces ou Dekkera

*Brettanomyces* – forma de reprodução assexuada (brotamento)

*Dekkera* – forma de reprodução sexuada

## Espécies

- *Brettanomyces bruxellensis*
- *Brettanomyces claussenii* (*B. anomalus*)
- *Brettanomyces lambicus* (*B. bruxellensis*)
- *Brettanomyces intermedius*
- *Brettanomyces custersii*



# Ezimas x Capacidade Fermentativa

## $\alpha$ glucosidase

- Enzima capaz de hidrolisar (quebrar) as dextrinas (moléculas com mais de 6 glicoses)
- As formas de enzima intra e extracelular são produzidas pelas *Brettanomyces sp.*
- *Essas enzimas são responsáveis pela atenuação acima de 85-90%*

## $\beta$ glucosidase

- Enzima capaz de quebrar outros açúcares como Lactose(açúcar do leite), celobiose (açúcar presente na madeira) e glicosídeos (presentes em vários aromas de lúpulo)



# Metabolitos Secundários



Descritores organolépticos –  
condimento,  
Cravo, defumado, medicinal, cavalo,  
band-aid, estábulo, metálico, biscoito,  
urina de gato, maçã, floral, fruta  
tropical e citrus

Compostos precursores – provêm da  
matéria prima, mas varia de acordo com  
espécie da levedura e o processo



# Fenólicos Voláteis

4-vinylguaiacol – cravo

4-ethylguaiacol – condimento, cravo

4-vinylphenol – plástico, defumado

4-ethylphenol – condimento, defumado, cavalo

4-vinylcatechol – plástico, amargo, defumado

4-ethylcatechol – band-aid, medicinal, estábulo

Mecanismo – ação de 2 enzimas

1) descarboxilase fenólica ácida - produção de derivados 4 – vinil

2) Redutase vinil-fenol - redução do 4-vinil para 4-etil correspondente

A segunda etapa é exclusiva para as *Brettanomyces*

# Ésteres

As esterases de *Brettanomyces* possuem maior atividade quando essa levedura é dominante no meio

- Ethyl acetate – frutado, solvente
- Ethyl lactate – frutado, amanteigado
- Phenethyl acetate – rosa, floral
- Isoamyl acetate – banana

Altas concentrações de ácidos graxos (C6-C12) - esses ácidos graxos são esterificados em seus etil ésteres correspondentes (fruta tropical e abacaxi) (Etil lactato, etil butirato, etil caproato, etil caprilato)

**Table 1.** Quantitative analysis of 16 standard fermentation compounds analysed from pure culture fermentations conducted with eight strains of *Brettanomyces* yeast. Fermentations were inoculated at a pitching rate of  $12 \times 10^6$ .

Compound	Threshold (mg/l)	Strains							
		WLP645	WLP650	WLP653	CMY001	BSI-Drie	WY5112	WY5526	WY5151
Acetaldehyde	10	1.37	1.21	1.25	1.26	1.98	0.80	1.05	1.16
Ethyl Acetate	30	1.26	3.62	12.25	16.76	35.80*	1.88	8.38	2.68
Ethyl Lactate	250	0.28	0.18	1.81	1.44	1.29	1.72	0.75	0.59
Isobutyl Acetate	1.6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ethyl Butyrate	0.4	ND	ND	0.04	0.06	0.08	ND	0.05	ND
Isoamyl Acetate	1.6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ethyl Caproate	0.21	ND	0.16	0.25*	0.39*	0.36*	0.11	0.29*	0.04
Ethyl Caprylate	0.9	0.08	1.65*	4.13*	3.35*	3.00*	0.72	1.34*	0.22
n-Propanol	800	0.59	2.57	4.14	3.72	6.56	0.88	3.01	1.12
Isobutanol	200	0.70	3.83	2.32	7.04	8.00	2.46	3.16	1.63
2-Methylbutanol	65	0.27	5.22	1.09	2.67	2.61	1.31	1.49	0.60
3-Methylbutanol	70	0.91	5.13	3.82	6.71	8.62	2.15	5.39	2.14
4-Vinylphenol	**	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4-Vinylguaiaicol	0.3	0.0397	0.0529	0.0244	0.0390	0.0458	0.0400	0.0511	0.0849
Diacetyl	0.15	0.012	0.024	0.220*	0.029	0.029	0.056	0.051	0.038
2,3-Pentanedione	0.9	0.003	0.004	0.018	0.004	0.004	0.009	0.003	0.007

ND, Not Detectable; \*, Indicates levels at or above threshold; \*\*, No conclusive data available. Fermentations were conducted in duplicate with samples of those fermentations analysed in duplicate. Data shown is the

WLP 645 – *B. clausenii*

WLP 650 – *B. bruxellensis*

WLP 653 – *B. lambicus*

CMY 001 – *B. brux. trois*

BSI – Drie – *B. brux. trois*

WY5112 – *B. bruxellensis*

WY5526 – *B. lambicus*

WY5151 – *B. clausenii*

# Fermentando com *Brettanomyces*

Primeiro passo – o que você quer em sua cerveja?

## **Aromas?**

- Frutado (frutas secas) - fermentação primária – lembra estilo belga
- Frutas tropicais – Fermentação Secundária (precisa de ácido graxo da levedura da fermentação primária– etil caproato)

## **Acidez?**

Sour (pH baixo – as leveduras *Brettanomyces* atenuam melhor)

Oxigênio + Brett (ác. Acético produzido no envelhecimento em barril)

# Tipo de Processo

## **Fermentação Primária (100% Brett) – (LIMPO, FRUTADO LEVE COM SABOR TERROSO)**

Se for desejável características de FRUTADO ou cravo leves, com aspecto terrosa na boca, então é preferível fazer uma fermentação primária com *Brettanomyces*

## **Fermentação Secundária (FUNKY + FRUTAS TROPICAIS)**

Se a escolha for uma cerveja FUNKY, com complexos de aromas fortes que são adquiridos através do envelhecimento, a fermentação secundária seria a escolha em barril

## **Fermentação Mista**

A fermentação mista pode dar o melhor dos dois processos (Ex.: Levedura de Saison + *Brettanomyces*)

# Fermentação Primária

PROCESSO

Brett + Mosto  
Temperatura = 20-25°C  
Oxigenação = 8-10 ppm  
Taxa de inóculo =  $1,2-1,5 \times 10^6$   
cel/mL/°P

Brett + Mosto Sour (pode ser com 10%  
de malte acidificado)  
Temperatura = 20-25°C  
Oxigenação = 8-10 ppm  
Taxa de inóculo =  $1,2-1,5 \times 10^6$   
cel/mL/°P

AROMA

Aroma Limpo – Pouco Frutado  
(2-4 semanas)  
Dependente da levedura  
  
Pode desenvolver  
aromas frutados baixo

Aroma Frutado (1-4 semanas)  
Dependente da levedura

Aromas lembrando os estilos belga

SABOR

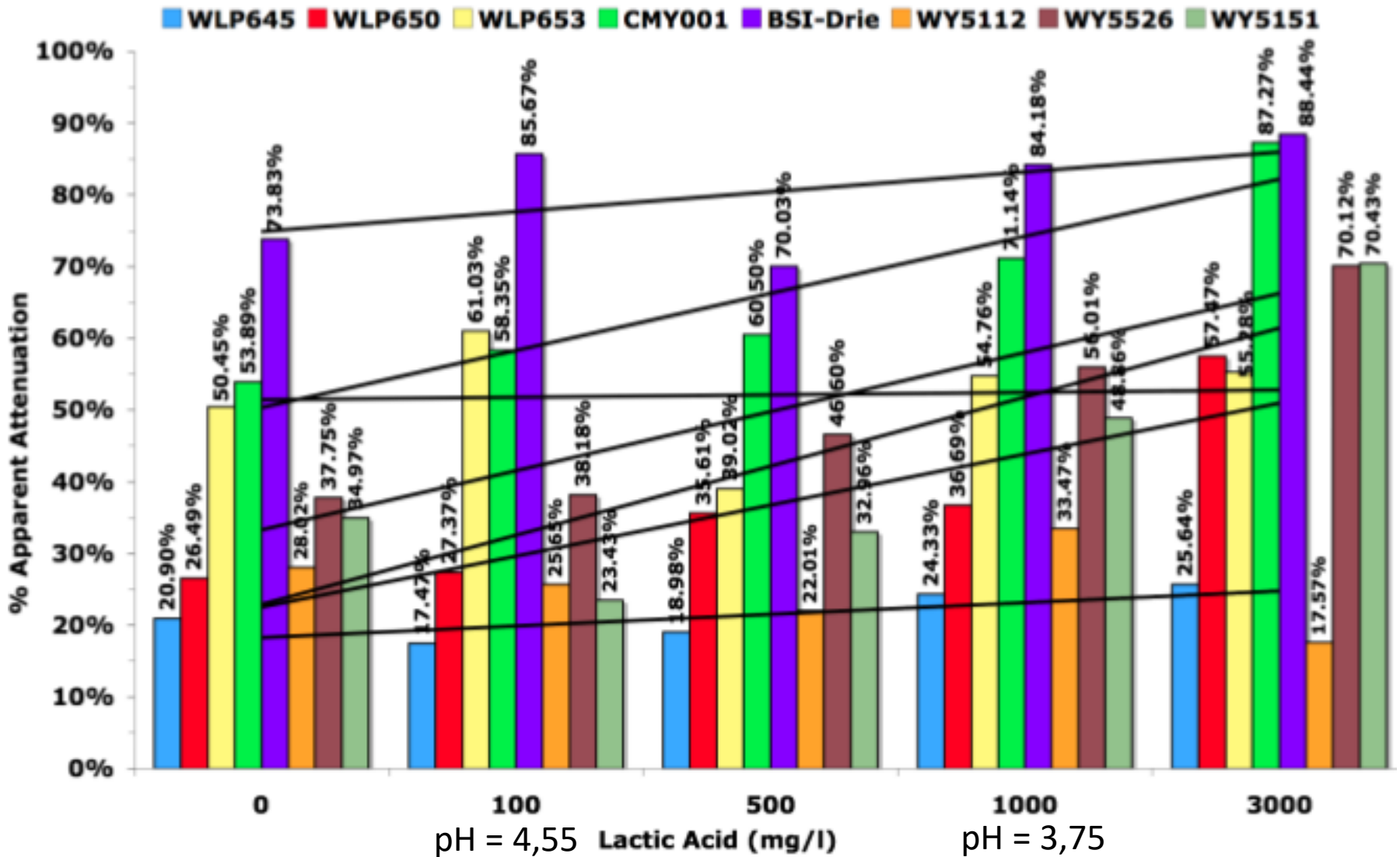
Pode desenvolver acidez  
caso a oxigenação do  
mosto seja feita em maior  
quantidade (12-15 ppm)  
  
A atenuação pode ser  
menor 60-75%

O pH mais baixo acelera a fermentação e  
pode aumentar a atenuação

A atenuação pode ser  
entre 75-85%

ENVELHECIMENTO EM BARRIL

# pH x Atenuação



Concentração do ácido láctico e sua influência na atenuação aparente (T=20-22°C, 1x10<sup>6</sup> cel/mL/°P)

# Fermentação Primária

Depende da levedura utilizada irá influenciar nos aromas produzidos pelas *Brettanomyces* na fermentação secundária

( Leveduras que produzem esteres 4-vinil -> 4 – etil)

# Fermentação Secundária

PROCESSO	<p>Brett + Mosto Fermentado (2,5°P) Brassagem a 68-72°C (dextrinas) e/ou com parada proteica (Ácido Ferulico (45°C)) Temperatura = 20-25°C Taxa de inóculo=0,2-0,5x10<sup>6</sup> cel/mL/°P</p>	<p>Brett + Mosto Sour Fermentado (2,5°P) Brassagem a 68-72°C (dextrinas) e/ou com parada proteica (Ácido Ferulico (45°C)) Temperatura = 20-25°C Taxa de inóculo = 0,2-0,5 x 10<sup>6</sup> cel/mL/°P</p>
AROMA	<p>Aroma FUNKY – (1-12 meses) Dependente da levedura</p> <p>Pode desenvolver aromas frutados (abacaxi)</p>	<p>Aroma FUNKY + FRUTADO (1-12 meses) Dependente da levedura</p> <p>Pode desenvolver aromas de frutas tropicais e frutas vermelhas</p>
SABOR	<p>Terroso em boca e leve acidez (depende da oxigenação nessa fase)</p> <p>Gravidade Final (1,003 g/mL = 0,9°P)</p>	<p>O pH mais baixo acelera a fermentação e pode aumentar a atenuação</p> <p>A acidez depende da oxigenação</p> <p>Gravidade Final (1,003 g/mL = 0,9°P)</p>

ENVELHECIMENTO EM BARRIL



# Refermentação na Garrafa



Técnica bastante utilizada – o ideal é ter uma linha de envase específico para evitar problemas de contaminação cruzada

Taxa de inóculo =  $0,2-0,5 \times 10^6$  cel/mL/°P

A autólise da levedura proveniente da fermentação primária poderá fornecer ácidos graxos para a *Brettanomyces* desenvolver novos aromas com o tempo (1-6 meses)

# Referências Bibliográficas

- 1) Michael Tonsmeire, American Sour Beer, 2014
  
- 1) Chad Yakobson, Brettanomyces project (<http://www.brettanomycesproject.com>)
  
- 3) White, C; Zainasheff, J. Yeast - The Practical Guide to Beer Fermentation. Brewers Publication, 2010.
  
- 4) Briggs, D. E.; Boulton, C. A.; Brookes, P. A.; Stevens, R. Brewing Science and practice. Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC, 2004
  
- 5) Greg Doss, “Brettanomyces: Flavours and performance of single and multiple strain fermentations with respect to time”