



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional de Propriedade Industrial

(21) BR 10 2012 011149-7 A2



(22) Data de Depósito: 11/05/2012

(43) Data da Publicação: 11/08/2015
(RPI 2327)

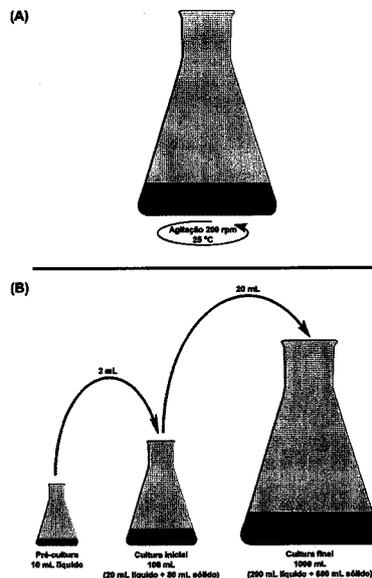
(54) Título: PROCESSO DE OBTENÇÃO DE LEVEDURAS PARA FABRICAÇÃO DE BEBIDAS FERMENTADAS

(51) Int.Cl.: C12C11/00; C12N1/18; C12R1/865

(73) Titular(es): Universidade Federal do Rio Grande do Sul

(72) Inventor(es): Diego Bonatto

(57) Resumo: PROCESSO DE OBTENÇÃO DE LEVEDURAS PARA FABRICAÇÃO DE BEBIDAS FERMENTADAS. A presente invenção descreve um novo método de obtenção de leveduras em quantidades suficientes e metabolicamente ativas, a serem usadas no processo de fermentação para a fabricação de cerveja. Mais especificamente, o processo envolve o uso de um sistema bifásico de cultura, onde as células são cultivadas na presença simultânea de um meio de cultura sólido e de um meio de cultura líquido.



Relatório Descritivo de Patente de Invenção

PROCESSO DE OBTENÇÃO DE LEVEDURAS PARA FABRICAÇÃO DE BEBIDAS FERMENTADAS

5 **Campo da Invenção**

A presente invenção descreve um novo método de obtenção de leveduras em quantidades suficientes e metabolicamente ativas, a serem usadas no processo de fermentação para a fabricação de bebidas fermentadas, mais especificamente, cerveja. Mais especificamente, o processo
10 envolve o uso de um sistema bifásico de cultura, onde as células são cultivadas na presença simultânea de um meio de cultura sólido e de um meio de cultura líquido. A presente invenção se situa no campo da Biologia e Engenharia.

Antecedentes da Invenção

15 A cerveja é obtida pela fermentação do mosto do malte de cevada, que consiste na conversão em álcool dos açúcares presentes nos grãos de malte. A fermentação é a principal etapa do processo cervejeiro e sua efetividade depende de várias operações anteriores, incluindo o preparo das matérias-primas. Após a fermentação são realizadas etapas de tratamento da cerveja,
20 para conferir as características organolépticas (sabor, odor, textura) desejadas no produto final. A seguir cada etapa é descrita mais detalhadamente.

a) Obtenção do malte

O malte, em geral, é obtido em instalações dedicadas a este propósito, conhecidas como maltarias, que podem ou não ser anexas às empresas
25 cervejeiras. As principais etapas de obtenção do malte são a limpeza e seleção de grãos, a embebição, germinação e a secagem do malte.

b) Preparo do mosto

Após obter o malte conforme descrito anteriormente, ou o que é mais comum no Brasil, após adquiri-lo de uma maltaria, a cervejaria dá início ao
30 processo de produção da cerveja propriamente dita, onde a primeira etapa

consiste em obter o mosto. O mosto pode ser definido como uma solução aquosa de açúcares, que serão os alimentos para as leveduras que realizam a fermentação, dando origem ao álcool. Desta maneira, percebe-se a importância do correto preparo do mosto para que se obtenha uma cerveja de qualidade. O
5 preparo do mosto consiste em cozinhar o malte com os devidos cuidados, inclui etapas de preparo (como a moagem do malte, maceração, separação do mosto e sua filtração), o cozimento em si, e etapas de condicionamento posterior como a clarificação e o resfriamento. A solução livre de impurezas e rica em açúcares resultante deste processo é então enviada para a fermentação.

10 c) Fermentação

Uma vez tendo sido preparado o mosto, e este tendo sido clarificado e resfriado, pode-se dar início a fermentação, processo central da indústria
cervejira. A fermentação do mosto é dividida em duas etapas: numa primeira etapa, denominada aeróbia, as leveduras se reproduzem, aumentando de
15 quantidade de 2 a 6 vezes; em seguida inicia-se a fase anaeróbia, onde as leveduras realizam a fermentação propriamente dita, convertendo os açúcares presentes no mosto em CO₂ e álcool. O processo de fermentação dura de 6 a 9 dias, ao final dos quais se obtém, além do mosto fermentado, uma grande quantidade de CO₂, que após ser purificado é enviado para a etapa de
20 carbonatação da cerveja. De modo a garantir um bom andamento ao processo de fermentação, é necessário que a temperatura se mantenha constante, em valores entre 8 e 15°C dependendo de vários fatores. Para isso, no entanto, é necessário que as dornas de fermentação sejam resfriadas, uma vez que a fermentação é um processo exotérmico, ou seja, que gera calor. Ao final da
25 fermentação, obtém-se também um excesso de levedos, já que estes se multiplicam durante o processo. Este levedo é então levado para tratamento e estocagem, sendo uma parte reutilizada em novas bateladas de fermentação, e parte vendida para a indústria de alimentos.

d) Processamento da cerveja

30 Após a fermentação obtém-se o mosto fermentado, chamado também de cerveja verde, que já possui diversas características da cerveja a ser

produzida. No entanto antes de proceder ao envase do produto certas providências são necessárias, de modo a gaseificar a bebida, garantir sua qualidade e fornecer características organolépticas adicionais.

e) Envase

5 Uma vez concluída a produção da cerveja, esta deve ser devidamente envasada. Nesse processo deve-se ter grande cuidado com possíveis fontes de contaminação, perda de gás e contato da cerveja com oxigênio. Tais ocorrências podem comprometer a qualidade do produto. Em geral, o envase é a unidade com o maior contingente de funcionários, equipamentos de maior
10 complexidade mecânica e maior índice de manutenção, onde podem ocorrer as maiores perdas por acidentes e má operação, como regulagem inadequada de máquinas, quebra de garrafas, etc. O envase é a fase final do processo de produção, sendo composto por diversas operações relacionadas ao enchimento dos vasilhames (cujos mais comuns atualmente são as garrafas,
15 vasilhames de alumínio e barris para chope).

f) Utilidades e operações auxiliares

Para a produção de cerveja são necessários diversos insumos, tais como: vapor, energia elétrica, amônia nem todas utilizam este composto para resfriamento, gás carbônico, ar comprimido e água, produtos químicos para
20 limpeza de equipamentos.

Tradicionalmente, a propagação de leveduras cervejeiras é um processo aeróbico gradativo com mudanças incrementais no volume e na temperatura e que pode ser dividido em propagação laboratorial e propagação na planta de produção/cervejaria. O principal propósito na escala piloto é prover condições
25 favoráveis para o crescimento das leveduras. Assim, os requerimentos para os vasos de propagação de leveduras são o desenho que facilite a sua higienização, oxigênio suficiente para manter um ambiente aeróbico (incluindo misturas de gases) e a presença de nutrientes suficientes (aminoácidos, carboidratos, vitaminas e íons inorgânicos). O estágio de cultivo laboratorial é
30 iniciado a partir de culturas estocadas (criotubos ou Agar inclinado), os quais são tipicamente inoculados em 15 mL de meio de cultura e, então, transferidos

para 200 mL de meio de cultura, com o estágio final em frascos de Carlsberg. Vários sistemas de propagação estão em uso atualmente. O desenho destes sistemas considera o rendimento final (contagem de leveduras finais no propagador) e a quantidade de inóculo alvo requerida para a primeira fermentação. Baseado nestes fatores, taxas de escalonamento podem ser inferidas e resultando em vasos de propagação de tamanhos variados. Uma desvantagem das escalas pilotos de propagação é o seu custo relativamente alto, onde formas alternativas de cultivo de leveduras cervejeiras são de interesse. Destas formas alternativas, o uso de leveduras secas ou obtidas por batelada alimentada (tecnologia de assimilação) é considerada. Investigações iniciais relacionadas com a aplicação de leveduras secas mostraram que, em condições similares, as mesmas linhagens de leveduras secas ou frescas possuem performances de fermentação bastante semelhantes entre si. Contudo, pesquisas independentes demonstraram que para as linhagens de leveduras do tipo ale, não há diferenças em termos de desempenho entre as células frescas ou secas, o que não se observa para as leveduras do tipo lager. Neste caso, a viabilidade das leveduras lager secas foi de 20-30% menor do que as células frescas, causando impacto sensorial no produto final.

Uma segunda alternativa para o cultivo de leveduras cervejeiras é o uso da tecnologia de assimilação ou de batelada alimentada. O processo se baseia na manutenção das culturas em fase logarítmica por meio da remoção continuada de células e adição de novo meio de cultura. Esta tecnologia tem demonstrado inúmeras vantagens em relação aos métodos convencionais de cultivo, onde as células geradas por este processo têm a capacidade de fermentar rapidamente e de produzir baixas quantidades de subprodutos da fermentação. O risco de contaminação também diminui devido à alta atividade metabólica das células crescidas em batelada alimentada, resultando em cervejas mais uniformes e de melhor qualidade sensorial. Contudo, o cultivo em batelada requer o uso de equipamentos dedicados para esta finalidade, o que torna o processo caro para uso em pequena e média escala. Além disso, o

alto custo de manutenção dos equipamentos também torna o processo inviável para pequenas escalas de aplicação.

A presente invenção descreve um novo método de obtenção de leveduras em quantidades suficientes e metabolicamente ativas, a serem usadas no processo de fermentação para a fabricação de cerveja. Mais especificamente, o processo envolve o uso de um sistema bifásico de cultura, onde as células são cultivadas na presença simultânea de um meio de cultura sólido e de um meio de cultura líquido.

A biomassa de leveduras cervejeiras obtidas pela cultura bifásica apresenta características bioquímicas e fisiológicas superiores daquelas comumente observadas na produção convencional de biomassa de leveduras. Observa-se que as células são metabolicamente mais ativas e são capazes de atenuar fortemente os mostos, uma característica que demonstra uma alta qualidade metabólica das leveduras obtidas por este processo. Além disso, o processo aqui descrito gera quantidades mais do que suficientes de biomassa de leveduras ativas para a produção de cervejas especiais em um curto espaço de tempo. Os custos de produção são relativamente baixos, visto que a tecnologia empregada é a mesma usada em laboratórios convencionais de microbiologia e os reagentes necessários para a formulação dos meios de cultura são fáceis de obter e de custo baixo.

A busca na literatura científica e patentária apontou alguns documentos relevantes para a presente invenção, os quais serão descritos a seguir.

O documento US 3, 577, 319 descreve um processo de cultivo em meio bifásico de *Bordetella pertussis* para a produção de vacinas. Os organismos obtidos de uma cultura prévia crescem em uma cultura bifásica composta de um meio sólido de Agar de carvão vegetal e um meio líquido. Após um crescimento satisfatório a parte líquida é usada para inocular o caldo em grandes tanques. Depois de um crescimento adequado nos tanques, os organismos são mortos, separados do caldo e, então, suspensos em uma solução salina (vacina). A presente invenção difere deste documento por tratar da obtenção de leveduras da linhagem NCYC 1087 e não de *Bordetella*

pertussis.

O documento US 4, 952, 510 descreve um aparato para cultura bifásica que emprega múltiplos meios de nutrientes sólidos em um único vaso e um container fechado que tem uma abertura definida em uma das superfícies para introdução do material no container. Pelo menos umas das superfícies do container inclui um lado plano e transparente que permite a visualização dos meios sólido e líquido no interior do container. Uma divisão dentro do container separa o volume do interior em porções superiores e inferiores e uma segunda divisão separa as partes superiores em pluralidade de volumes comportamentais. A presente invenção difere deste documento por não se tratar de um aparato e sim de um processo de produção compreendendo meio de cultura bifásico, fato não descrito e nem sugerido no referido documento.

O documento CN 101691544 descreve uma cepa de levedura de cerveja e sua aplicação na fermentação da cerveja. O documento fornece uma cepa, *Saccharomyces cerisiae* Z5 com número de preservação da CGMCC nº 3218, o método de reprodução desta cepa compreende: i) Preparação de uma estirpe original; ii) ativação em um tubo de ensaio; iii) implantação de íons mutagênicos; iv) laser mutagênico; v) triagem em placa de Agar primária; vi) fermentação secundária; vii) teste de estabilidade e teste piloto. A presente invenção difere desta por não se tratar em uma mutação em leveduras, mas, sim, de um processo de produção de leveduras para fabricação de bebidas fermentadas.

Do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos da presente invenção, de forma que a solução aqui proposta possui novidade e atividade inventiva frente ao estado da técnica.

Sumário da Invenção

Em um aspecto, a presente invenção descreve um novo método de obtenção de leveduras em quantidades suficientes e metabolicamente ativas, a serem usadas no processo de fermentação, especialmente para a fabricação

de cerveja. Mais especificamente, o processo envolve o uso de um sistema bifásico de cultura, onde as células são cultivadas na presença simultânea de um meio de cultura sólido e de um meio de cultura líquido. As principais vantagens obtidas por este método são que a biomassa de leveduras
5
cervejeiras obtidas pela cultura bifásica apresenta características bioquímicas e fisiológicas superiores daquelas comumente observadas na produção convencional de biomassa de leveduras. Observa-se que as células são metabolicamente mais ativas e são capazes de atenuar fortemente os mostos, uma característica que demonstra uma alta qualidade metabólica das
10 leveduras obtidas por este processo. Além disso, o processo aqui descrito gera quantidades mais do que suficientes de biomassa de leveduras ativas para a produção de cervejas especiais em um curto espaço de tempo. Os custos de produção são relativamente baixos, visto que a tecnologia empregada é a mesma usada em laboratórios convencionais de microbiologia e os reagentes
15 necessários para a formulação dos meios de cultura são fáceis de obter e de custo baixo.

É, portanto, um objeto da presente invenção o método de produção de leveduras para fabricação de bebidas fermentadas compreendendo meio de cultura bifásico.

20 Em um aspecto preferencial este meio é composto de:

- a. Meio líquido: o meio empregado é o YEPD, contendo 10 g de extrato de levedura, 20 g de peptona bacteriológica e 20 g de extrato seco de malte.
- b. Meio sólido: emprega-se a mesma formulação descrita
25 anteriormente com a adição de 20 g de bacto-agar.

Em um aspecto preferencial o método consiste de:

- a. autoclavar a uma temperatura de 120 °C e 1 atm de pressão, um frasco de erlenmeyer;
- b. Preencher o erlenmeyer com YEPD sólido;
- 30 c. Gelificar o YEPD sólido;
- d. Cobrir o meio sólido com meio YEPD líquido na proporção de 4:1;

- e. Realizar um pré-inóculo da linhagem (leveduras da linhagem NCYC 1087) desejada em meio YEPD líquido, o qual é cultivado por 3 d a 25 °C;
- f. Usar cerca de 2 mL desta pré-cultura para inocular 20 mL da porção líquida de uma cultura bifásica (volume total de 100 mL), seguido da incubação da mesma por 3 d a 25 °C;
- g. Após este período de incubação, inocular os 20 mL da cultura bifásica em 200 mL da porção líquida de uma cultura bifásica, seguido novamente de uma incubação a 3 d a 25 °C;
- h. Recolher as células por centrifugação a 10 °C (2.500 rpm, 5 min);
- i. Lavar as células recolhidas com água destilada;
- j. Manter a cultura superconcentrada resfriada a 4°C até o seu uso.

É um objeto adicional da presente invenção qualquer bebida que seja produzida utilizando leveduras obtidas pelo método da presente invenção.

Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados pelos versados na arte e pelas empresas com interesses no segmento, e serão descritos em detalhes suficientes para sua reprodução na descrição a seguir.

Breve Descrição Das Figuras

Figura 1. Descrição da cultura bifásica (A) e do escalonamento das culturas para a produção de leveduras cervejeiras (B).

Descrição Detalhada da Invenção

Os exemplos aqui mostrados têm o intuito somente de exemplificar uma das inúmeras maneiras de se realizar a invenção, contudo, sem limitar o escopo da mesma.

Bebidas Fermentadas

A presente invenção compreende quaisquer bebidas que necessitem da etapa de fermentação em seu processo de produção como, por exemplo, mas não se restringindo a, cerveja.

Cerveja

A cerveja é uma bebida produzida a partir da fermentação de cereais,

principalmente a cevada maltada, e acredita-se que tenha sido uma das primeiras bebidas alcoólicas a serem desenvolvidas pelo ser humano

Fermentação

A Fermentação alcoólica é um processo biológico no qual açúcares
5 como a glicose, frutose e sacarose são convertidos em energia celular com
produção de etanol e dióxido de carbono como resíduos metabólicos. Como
este processo pode ser realizado sem a presença de oxigênio é considerado
um processo anaeróbico. Praticamente todos os organismos vivos podem
utilizar a glicose para produção da energia necessária para seus processos
10 metabólicos. Neste processo, chamado glicólise, a glicose e alguns outros
açúcares são transformados em outras substâncias, com liberação de energia.
O que determina quais substâncias serão produzidas depende do tipo de
microorganismos e o meio onde vivem. As leveduras de cervejaria e padaria e
todos os outros organismos que promovem a fermentação alcoólica, incluindo
15 algumas plantas, fermentam a glicose em etanol e CO₂, de forma que, neste
processo, toda massa de glicose está contida nos produtos e não é utilizada
outra substância como "matéria prima" (como oxigênio, nitrato, íons férricos,
etc.).

Levedura de Cerveja

20 *A levedura de bebidas alcoólicas é um fermento natural utilizado na
fermentação do mosto (uma mistura de açúcares, água e lúpulo) para produzir
cerveja. As leveduras de bebidas alcoólicas são do gênero Saccharomyces,
sendo a principal a espécie Saccharomyces cerevisiae. As células de levedura
são uma fonte de alto teor protéico e também de vitaminas do complexo B.*

25 Meio de cultura bifásico

Sistema bifásico de cultura é aquele onde as células são cultivadas na
presença simultânea de um meio de cultura sólido e de um meio de cultura
líquido. Este meio é composto de:

- a. Meio líquido: o meio empregado é o YEPD, contendo 10 g
30 de extrato de levedura, 20 g de peptona bacteriológica e 20 g de
extrato seco de malte.

b. Meio sólido: emprega-se a mesma formulação descrita anteriormente com a adição de 20 g de bacto-agar.

Meio de Cultura YEPD

O meio de cultura YEPD é constituído de:

- 5 • Extrato de levedura 1% (p/v)
- Peptona 2% (p/v)
- Glucose 2% (p/v)

Método de inoculação e obtenção das leveduras

O método consiste de:

- 10 a. autoclavar a uma temperatura de 120 °C e 1 atm de pressão, um frasco de erlenmeyer;
- b. Preencher o erlenmeyer com YEPD sólido;
- c. Gelificar o YEPD sólido;
- d. Cobrir o meio sólido com meio YEPD líquido na proporção de 4:1;
- 15 e. Realizar um pré-inóculo da linhagem (leveduras da linhagem NCYC 1087) desejada em meio YEPD líquido, o qual é cultivado por 3 d a 25 °C;
- f. Usar cerca de 2 mL desta pré-cultura para inocular 20 mL da porção líquida de uma cultura bifásica (volume total de 100 mL),
20 seguido da incubação da mesma por 3 d a 25 °C;
- g. Após este período de incubação, inocular os 20 mL da cultura bifásica em 200 mL da porção líquida de uma cultura bifásica, seguido novamente de uma incubação a 3 d a 25 °C;
- h. Recolher as células por centrifugação a 10 °C (2.500 rpm, 5 min);
- 25 i. Lavar as células recolhidas com água destilada;
- j. Manter a cultura superconcentrada resfriada a 4°C até o seu uso.

Exemplo 1. Realização Preferencial

Na cultura bifásica de leveduras cervejeiras, um recipiente contendo um
30 meio de cultura sólido e um líquido esterilizado é empregado (Figura 1A). Neste caso, o meio empregado é o YEPD, contendo 10 g de extrato de levedura, 20 g

de peptona bacteriológica e 20 g de extrato seco de malte. Para o meio sólido, emprega-se a mesma formulação descrita anteriormente com a adição de 20 g de bacto-agar. Após autoclavado a uma temperatura de 120 °C e 1 atm de pressão, o frasco de erlenmeyer previamente esterilizado é preenchido com meio YEPD sólido e, após a sua gelificação, o mesmo é coberto com meio YEPD líquido na proporção de 4:1 (YEPD sólido: YEPD líquido; Figura 1A). Uma vez preparada a cultura bifásica, dá-se início a cultura das linhagens de leveduras cervejeiras, realizando-se um pré-inóculo da linhagem desejada em meio YEPD líquido, o qual é cultivado por 3 d a 25 °C. Cerca de 2 mL desta pré-cultura são usado para inocular 20 mL da porção líquida de uma cultura bifásica (volume total de 100 mL), seguido da incubação da mesma por 3 d a 25 °C. Após este período de incubação, os 20 mL da cultura bifásica são inoculados em 200 mL da porção líquida de uma cultura bifásica, seguido novamente de uma incubação a 3 d a 25 °C (Figura 1B). Após o período de cultivo, as células são recolhidas por centrifugação a 10 °C (2.500 rpm, 5 min), lavadas 1 × com água destilada estéril e coletadas em um volume final de 100 mL em água destilada estéril. A cultura superconcentrada é mantida resfriada a 4 °C até o seu uso.

Atualmente, comparou-se o rendimento de duas linhagens de leveduras cervejeiras (NCYC 1087 e NCYC 1332) por meio do cultivo em meio líquido rico e em cultura bifásica (empregando meio de cultura rico sólido e líquido). Dados de rendimento de biomassa indicaram uma quantidade duas a dez vezes maiores de células em cultura bifásica quando comparada com a cultura líquida. Em ambos os casos, as culturas foram mantidas em condições controladas de crescimento (25 °C, 200 rpm de agitação constante) e o rendimento, então, determinado por espectrofotometria a 600 nm. Também foi testado o desempenho de uma cultura de leveduras da linhagem NCYC 1087 (volume de 600 mL de cultura) na fabricação artesanal de cerveja em um mosto de gravidade inicial (*start gravity*; SG) de 1,050. Os resultados indicaram uma fermentação adequada do mosto a uma temperatura de 16 °C durante 16 dias, seguido de uma fase de *cold crash* a 2°C por 5 dias, totalizando 21 dias

de fermentação. A cerveja resultante apresentou uma gravidade final (*final gravity*; FG) de 1, 010 (álcool por volume de cerveja igual a 5,2%). Os dados indicaram uma atenuação aparente do mosto de 79,2% e uma atenuação real de 64,9%, com uma desempenho igual ou superior as das melhores linhagens de leveduras cervejeiras produzidas em condições ideais de fermentação em batelada (a NCYC 1087 é similar a linhagem WLP037, onde esta possui uma atenuação aparente de 68-72%).

Neste sentido, será também avaliado o desempenho da linhagem NCYC 1332 em condições de fermentação de mostos com alta SG durante o período de 21 dias a 16 °C. Outros dados, como viabilidade celular, determinação da taxa de floculação, tempo de envelhecimento cronológico também serão obtidos e comparados com os das diferentes linhagens de leveduras cervejeiras disponíveis comercialmente.

Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes, abrangidos no escopo das reivindicações anexas.

Reivindicações**PROCESSO DE OBTENÇÃO DE LEVEDURAS PARA FABRICAÇÃO DE BEBIDAS
FERMENTADAS**

- 5
1. Processo de produção de leveduras para fabricação de bebidas fermentadas caracterizado por compreender a etapa de cultura de leveduras em meio de cultura bifásico.
 2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela bebida fermentadas ser cerveja.
 - 10 3. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo meio compreender:
 - a. Meio líquido: o meio empregado é o YEPD, contendo 10 g de extrato de levedura, 20 g de peptona bacteriológica e 20 g de extrato seco de malte.
 - 15 b. Meio sólido: emprega-se a mesma formulação descrita anteriormente com a adição de 20 g de bacto-agar.
 4. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo processo adicionalmente compreender as etapas de:
 - a. autoclavar a uma temperatura de 120 °C e 1 atm de pressão, um
20 frasco de erlenmeyer;
 - b. Preencher o erlenmeyer com YEPD sólido;
 - c. Gelificar o YEPD sólido;
 - d. Cobrir o meio sólido com meio YEPD líquido na proporção de 4:1;
 - e. Realizar um pré-inóculo da linhagem (leveduras da linhagem
25 NCYC 1087) desejada em meio YEPD líquido, o qual é cultivado por 3 d a 25 °C;
 - f. Usar cerca de 2 mL desta pré-cultura para inocular 20 mL da porção líquida de uma cultura bifásica (volume total de 100 mL), seguido da incubação da mesma por 3 d a 25 °C;
 - 30 g. Após este período de incubação, inocular os 20 mL da cultura

bifásica em 200 mL da porção líquida de uma cultura bifásica, seguido novamente de uma incubação a 3 d a 25 °C;

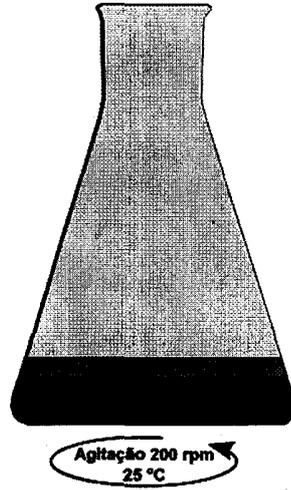
- h. Recolher as células por centrifugação a 10 °C (2.500 rpm, 5 min);
 - i. Lavar as células recolhidas com água destilada;
 - 5 j. Manter a cultura superconcentrada resfriada a 4°C até o seu uso.
5. Bebida fermentada caracterizada por ser obtida de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4.

Figuras

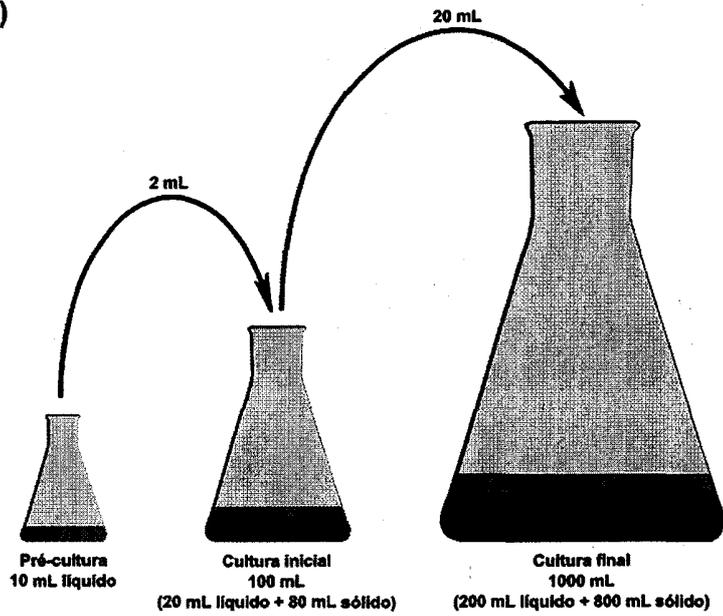
Figura 1:

5
10
15
20
25
30
35

(A)



(B)



Resumo**PROCESSO DE OBTENÇÃO DE LEVEDURAS PARA FABRICAÇÃO DE BEBIDAS
FERMENTADAS**

5 A presente invenção descreve um novo método de obtenção de leveduras em quantidades suficientes e metabolicamente ativas, a serem usadas no processo de fermentação para a fabricação de cerveja. Mais especificamente, o processo envolve o uso de um sistema bifásico de cultura, onde as células são cultivadas na presença simultânea de um meio de cultura
10 sólido e de um meio de cultura líquido.