

## CORRELAÇÃO ENTRE A REDUÇÃO DA CARGA MICROBIOLÓGICA E A INATIVAÇÃO DA ENZIMA INVERTASE NA ETAPA DE PASTEURIZAÇÃO DA CERVEJA

### **CORRELATION BETWEEN MICROBIAL LOAD DECREASE AND INVERTASE ENZYME INACTIVATION, DURING THE BEER PASTEURIZATION STEP**

Rosenilda Santos De Souza<sup>1</sup>  
Diego Matos Favero<sup>2</sup>

**Resumo:** A cerveja possui características desfavoráveis à multiplicação de vários microrganismos, devido a fatores que incluem presença de etanol, elevada concentração de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>, baixo valor de pH, entre outros. Entretanto, alguns microrganismos denominados deteriorantes multiplicam-se nessas condições, ocasionando mudanças sensoriais, aumento da turbidez, interferindo na qualidade final do produto. Dentre os microrganismos deteriorantes, os mais relatados foram os Gram-positivos dos gêneros *Lactobacillus* e *Pediococcus*, os Gram-negativos do gênero *Pectinatus* e *Megasphaera* e leveduras selvagens. O presente trabalho tem por objetivo propor uma nova metodologia como forma de avaliação da efetividade da pasteurização. Para isso, avaliou-se a correlação entre o método de inativação enzimática e o método tradicional de contagem de microrganismos em placas, quando a cerveja é submetida a diferentes binômios de tempo/temperatura no processo de pasteurização. A metodologia consistiu na pasteurização a 65°C de amostra de cerveja não pasteurizada realizada em tempos de 0, 1, 3, 5 e 10 minutos. A atividade enzimática foi verificada por meio da quantificação do teor de glicose resultante, após reação da enzima própria da cerveja com a sacarose intencionalmente adicionada. A quantificação de microrganismos deu-se por contagens de colônias visíveis em ágar PCA incubado a 35°C, em anaerobiose/microaerofilia durante 7 dias. Realizou-se coloração de Gram para verificar os tipos de microrganismos existentes nas amostras. Os dados da pesquisa confirmaram a correlação entre a análise enzimática e microbiológica, demonstrando a inativação total da invertase e a não multiplicação de microrganismos nos tempos de pasteurização de 5 e 10 minutos. Observou-se a presença de bactérias Gram-positivas, possivelmente dos gêneros *Lactobacillus* e *Pediococcus*, Gram-negativas, fungos filamentosos e leveduras. Concluiu-se que o melhor tempo determinado para uma pasteurização eficiente a 65°C é a de 5 minutos, a qual foi considerada a mais indicada pelo fato de menor exposição do produto a altas temperaturas, minimizando riscos de alterações no produto final. Também concluiu-se que a metodologia de verificação da eficiência da pasteurização através da análise da atividade enzimática mostrou-se apropriada nos parâmetros deste estudo.

<sup>1</sup>Graduanda em Bacharelado em Farmácia, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Campus Palmas-PR – IFPR, rosantos\_souza@hotmail.com.

<sup>2</sup>Mestre em Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal do Paraná. Prof. Efetivo do Instituto Federal do Paraná, Campus Palmas., diego.favero@ifpr.edu.br.

**Palavras-chave:** Cerveja. Microorganismos deteriorantes. Pasteurização. Atividade enzimática. Invertase.

**Abstract:** Beer presents characteristics that are unfavorable to the multiplication of several microorganisms, due to factors such as the presence of ethanol, the high O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> concentration, the low pH value, among others. However, some microorganisms named spoilage microorganisms grow under these conditions, causing sensory changes and increase in turbidity, and thereby impairing final product quality. Among spoilage microorganisms the most reported are the Gram positive of the genera *Lactobacillus* and *Pediococcus* and the Gram negative of the genera *Pectinatus* and *Megasphaera*, along with wild yeasts. The present work aims at proposing a new method to evaluate the effectiveness of pasteurization. In this sense, the correlation between the enzymatic inactivation method and the typical microbial plate count method was evaluated as beer was subjected to various time/temperature conditions during the pasteurization process. The method comprised pasteurization of beer at 65 °C during 0, 1, 3, 5 and 10 minutes. The enzymatic activity was assessed by measuring the concentration of remaining glucose after the reaction between the enzyme contained in beer and the intentionally added sucrose. The microbiological count was made by means of the count of visible colonies in PCA agar incubated at 35 °C under anaerobic/microaerophilic conditions for seven days. The Gram staining technique was used to identify the types of microorganisms contained in the samples. The data generated in this research confirm the correlation between enzymatic and microbiological assays, demonstrating the total inactivation of invertase and the absence of microbial growth after pasteurization during 5 and 10 minutes. Gram positive bacteria, probably of the genera *Lactobacillus* and *Pediococcus*, along with Gram negative bacteria, filamentous fungi and yeasts were detected. It can be concluded that the optimal time for an effective pasteurization is 5 minutes, as it exposed less the product to high temperatures thereby minimizing changes in the final product. Additionally, the assessment of pasteurization effectiveness based on the measurement of enzymatic activity showed appropriate for the experimental conditions tested.

**Keywords:** Beer. Spoilage microorganisms. Pasteurization. Enzymatic activity. Invertase.

## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente o Brasil vem sendo reconhecido como o terceiro maior produtor mundial de cerveja, segundo a publicação no ano de 2015 pela Associação Brasileira da Indústria da Cerveja (CERVBRASIL, 2015).

O processo produtivo da cerveja se inicia com a etapa denominada mosturação, onde ocorre a adição de água ao malte e adjuntos já moídos com a finalidade de promover a gelificação e posterior hidrólise do amido e açúcares. Normalmente os adjuntos são produtos do beneficiamento de cereais ou de outros vegetais ricos em carboidratos (AQUARONE et. al., 1983).

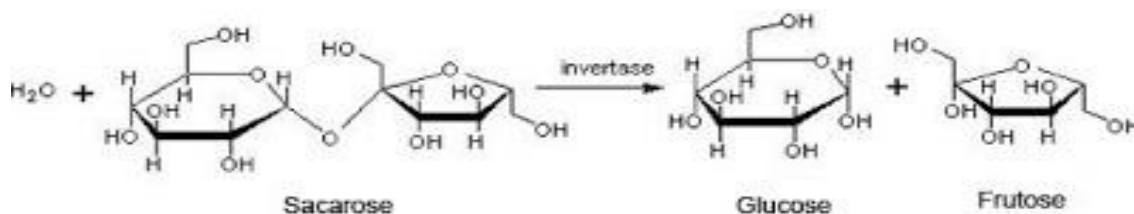
A mistura é então cozida e, durante o processo, o amido do malte é transformado em açúcar, resultando em um líquido turvo e grosso, chamado de mosto. O mosto é filtrado e posteriormente fervido. Nesta etapa é adicionado o lúpulo, responsável pelo sabor amargo da cerveja (REBELLO, 2009).

Na sequência, ocorre o resfriamento do mosto e posteriormente inicia-se a fermentação. O processo de fermentação consiste na conversão de açúcares fermentescíveis, processada pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, em etanol e gás carbônico, sob condições anaeróbicas. As leveduras biossintetizam enzimas capazes de realizar uma digestão extracelular dos carboidratos fermentescíveis, e uma dessas enzimas liberadas é a invertase ou beta-fructofuranosidase (EC. 3.2.1.26), responsável pela hidrólise da sacarose nos seus monômeros constituintes, a glicose e a frutose, conforme Figura 1. A invertase, que possui uma elevada atividade no intervalo de pH 3,5-5,5, também apresenta alta estabilidade térmica, possuindo maior atividade em temperaturas de até 60°C. A partir desta temperatura, os autores constataram redução brusca da atividade enzimática, devido sua desnaturação (DEUNER, 2005; MARQUEZ, 2007).

Após a fermentação, a cerveja é maturada em baixas temperaturas. Nesta etapa ocorre uma lenta fermentação complementar, ocasionando modificações de aroma e sabor, proporcionando a clarificação por precipitação

de leveduras e proteínas, assim como de sólidos solúveis. Além destas, ocorrem alterações químicas que auxiliam a clarificação e melhoram o aroma e sabor. Ao iniciar a maturação, a maior parte dos açúcares foi metabolizada a álcool etílico, CO<sub>2</sub>, glicerol, ácido acético e alcoóis superiores. Este processo dura em média 14 dias, contando com os 7 dias da fermentação (MELNIKOV, 2007).

**Figura 1.** Reação de inversão da sacarose ocasionada pela ação da enzima invertase (Sacarose)



Na filtração, o líquido passa através da camada de cascas do malte depositadas no fundo do recipiente de mosturação, constituindo o mosto primário, continuando a dextrinização do amido. Uma vez drenado o mosto primário, a camada de cascas é aspergida por várias vezes com água a 75°C, de modo que, quando o resíduo se apresenta com menos de 1% de extratos solúveis, é considerado como esgotado. Após 14 dias, antes da etapa de engarrafamento, faz-se uma carbonatação adicional. A cerveja é então pasteurizada (AQUARONE et. al., 1983).

A pasteurização é um processo térmico de tratamento que provê ao produto sua durabilidade dentro dos padrões adequados, promovendo ações com impacto direto nas propriedades sensoriais e estabilidade química da cerveja. A cerveja já envasada passa pelo interior de túneis pasteurizadores atingindo alta temperatura de 60°C e mantida nessa temperatura com objetivo de garantir a morte de microrganismos deteriorantes. Em seguida, é submetida à baixa temperatura, sofrendo um drástico resfriamento. E finalmente as garrafas estão prontas para etiquetagem, empacotamento e armazenagem (MEGA et. al., 2011).

Durante séculos, acredita-se que a cerveja é uma bebida considerada com uma estabilidade microbiológica singular, devido a diversos fatores contribuintes para que o produto seja um meio desfavorável para a multiplicação de vários microrganismos. Esses fatores incluem a presença de etanol, compostos do lúpulo, elevada concentração de dióxido de carbono, baixo valor de pH e menor concentração de oxigênio. Porém, alguns microrganismos denominados deteriorantes ainda conseguem se multiplicar diante dessas condições, causando alterações como aumento da turbidez e desagradáveis mudanças sensoriais, afetando a qualidade do produto final. Alguns microrganismos têm sido descritos como deteriorantes da cerveja, incluindo bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras selvagens. Dentre as bactérias Gram-positivas, destacam-se as ácido-lácticas pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Pediococcus*. E dentre as Gram-negativas, encontram-se as dos gêneros *Pectinatus* e *Megasphaera* (DRAGONE et al., 2007).

Dentro do grupo das bactérias Gram-negativas, as anaeróbias estritas vêm adquirindo uma importância crescente devido ao aperfeiçoamento das técnicas de manipulação e engarrafamento da cerveja, que tem reduzido significativamente o conteúdo de oxigênio no produto final, e também devido ao aumento da produção de cervejas com baixa concentração de etanol e de lúpulo (DRAGONE et al., 2007).

A detecção de microrganismos contaminantes na cerveja é realizada através da análise do crescimento em meios de cultura apropriados. Apesar desta metodologia nem sempre proporcionar especificidade e sensibilidade, o uso de meios seletivos e incubação continuam sendo os mais utilizados pelas cervejarias. Contudo, é importante salientar que outros métodos estão sendo utilizados como forma de complementação ou substituição, mostrando-se vantajosos por se tratarem de métodos mais rápidos e específicos, independentes da proliferação. Dentre esses métodos, destacam-se: Impedância/condutância, Bioluminescência, Microscopia de epifluorescência

direta (DEFT), Citometria de fluxo e Reação em cadeia de polimerase (PCR) (DRAGONE et al., 2007).

O presente trabalho tem por objetivo propor uma nova metodologia como forma de avaliação da efetividade da pasteurização. Para isso, avaliou-se a correlação entre o método de inativação enzimática e o método tradicional de contagem de microrganismos em placas, quando a cerveja é submetida a diferentes binômios de tempo/temperatura no processo de pasteurização.

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

Para verificar a correlação entre a atividade enzimática e a atividade microbiológica da amostra pasteurizada sob diferentes tempos, as seguintes metodologias foram utilizadas:

### **2.1 Pasteurização da amostra**

No processo de pasteurização utilizou-se amostra de chope tipo Pilsen puro malte, refrigerado, de marca conhecida na região de Palmas/PR, coletado diretamente da chopeira. Pipetou-se 10 mL em cada tubo esterilizado, vedou-se e os mesmos foram identificados com o tempo em minutos, determinado para cada experimento: Tubo 1 (0'), tubo 2 (1'), tubo 3 (3'), tubo 4 (5'), tubo 5 (10'). Um processo de pasteurização foi montado utilizando uma panela com água sob aquecimento de uma manta, monitorando a temperatura. Após a água atingir a temperatura desejada de 65°C, os tubos vedados foram mergulhados e aguardou-se o término do tempo para cada tubo, retirando-os sucessivamente e resfriando-os em água corrente. Não houve réplicas do procedimento para os tempos de pasteurização.

### **2.2 Verificação da Atividade Enzimática**

Para verificação da atividade enzimática da amostra pasteurizada em diferentes tempos, foi proposta metodologia adaptada de (MOURA, PINTO, RODRIGUES, 2007) onde foi alterada a forma de quantificação de glicose, sendo o método ADNS utilizado pelos autores, enquanto neste trabalho foi utilizado aparelho medidor de glicemia.

Consistiu em adicionar 0,25 g de sacarose P.A. em 5 ml de cada amostra pasteurizada, homogeneizando até a completa dissolução. Após dissolução, as amostras foram incubadas em estufa a 35°C por 30 minutos. A atividade da enzima invertase foi medida conforme sua eficiência na quebra da sacarose adicionada, resultando em glicose e frutose.

Como meio de verificação da quantidade de glicose da amostra, utilizou-se um aparelho medidor de glicemia (ACCU-CHEK). Ao aparelho foi conectada uma fita de medição, depositada sobre ela uma gota da respectiva amostra, pasteurizada sob diferentes temperaturas, e registrados os resultados.

### **2.3 Verificação do crescimento Microbiológico**

Para a determinação de microrganismos mesófilos anaeróbios, utilizou-se a metodologia de Silva et al., (2007). O meio de cultura utilizado foi o Plate Count Ágar (PCA) ou Ágar Padrão de Contagem, e o sistema de semeadura em superfície.

A metodologia consistiu em realizar diluições seriadas para cada amostra submetida a diferentes tempos de pasteurização, pipetando 1 mL da amostra e homogeneizando nos tubos com 9 mL de água peptonada estéril. Retirou-se 0,1 mL da amostra diluída, a qual foi inoculada ao meio PCA, identificando-as em diferentes concentrações. Depositaram-se as placas invertidas em jarros de anaerobiose, sendo posteriormente incubadas na estufa à temperatura de 35°C por uma semana.

Transcorrido o tempo de incubação, fez-se a contagem do número de colônias visíveis nas placas, verificando-se a multiplicação do número de

colônias pelo respectivo fator de diluição. Os resultados foram expressos em Unidades Formadoras de Colônias por mililitros de amostra (UFC/mL).

## 2.4 Coloração de Gram e morfologia das colônias

Para a metodologia de Coloração de Gram, utilizou-se a metodologia de Silva et al., (2007). Separou-se 3 placas apresentando diferentes colônias, foi realizado esfregaço de colônia com aspecto amarelo irregular, de tamanho médio e translúcida, com bordas contínuas e pouca aderência ao meio de cultura, aspecto algodinoso, formas circulares com margem inteira, irregulares com margem ondulada e fusiformes, apresentando elevação plana, elevada e convexa.

Identificaram-se as colônias e foram realizados esfregaço em lâminas e coloração de Gram em cada uma, pois supõem-se que formas e aspectos diferentes das colônias sugerem gêneros/espécies diferentes de microrganismos.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A velocidade da reação enzimática depende de diversos fatores, entre os quais o pH e a temperatura do meio em que se dá a reação. Portanto, com o aumento da temperatura aumenta-se a constante de equilíbrio, e, por conseguinte, a velocidade da reação, até sua temperatura de desnaturação (DEUNER, 2005). A invertase tem uma elevada atividade no intervalo de pH 3.5-5.5, com um pH ótimo em 4.5, e um máximo de atividade a aproximadamente 60°C (MARQUEZ, 2007).

Com o aumento da temperatura aumenta a taxa de todas as reações químicas, incluindo as enzimáticas (DEUNER, 2005). No entanto, a partir de um determinado valor de temperatura, a enzima inicia um processo de desnaturação, diminuindo a sua atividade.



A partir dos resultados mostrados na Tabela 1, pode-se observar uma correlação entre a atividade enzimática medida e a quantidade de microrganismos. Na amostra não pasteurizada, observa-se alta contagem microbiológica e elevada atividade enzimática. As amostras pasteurizadas de 1 e 3 minutos demonstraram uma menor contagem microbiológica quando comparadas ao produto não pasteurizado, bem como uma drástica redução da atividade enzimática. Já as amostras pasteurizadas por 5 e 10 minutos resultaram em não multiplicação microbiológica e nem evidência de atividade enzimática, sendo os dois tempos eficientes para o propósito da pasteurização. Portanto, pode-se afirmar que o melhor tempo de pasteurização, segundo o nosso experimento, é o de 5 minutos, promovendo assim a diminuição das modificações sensoriais de sabor, bem como o menor custo de manutenção do método, a fim de garantir um produto de boa qualidade ao consumidor.

**Tabela 1** - Correlação entre a atividade enzimática e a contagem microbiológica da cerveja pasteurizada em diferentes tempos

	0'	1'	3'	5'	10'
<b>Atividade enzimática</b> (glicose mg/dl)	436	13	10	<10	<10
<b>Contagem microbiológica</b> (UFC/mL)	2,78x10 <sup>4</sup>	2,0x10 <sup>2</sup>	1,4x10 <sup>2</sup>	<10 Est.	<10 Est.

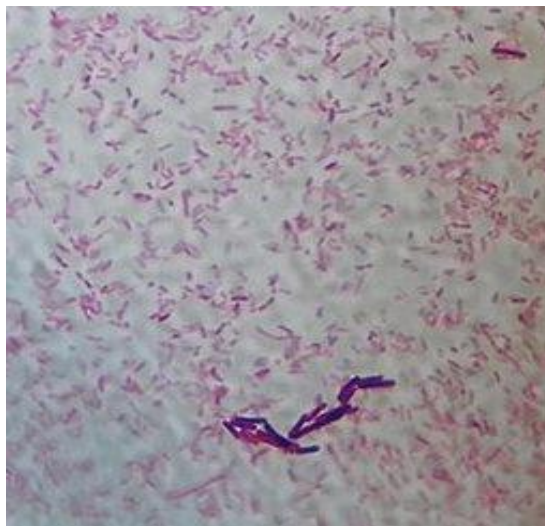
Durante a fermentação do mosto cervejeiro, o pH do meio é reduzido de aproximadamente 5,3 para cerca de 4,1, já as concentrações de açúcares, aminoácidos e vitaminas diminuem e a concentração de etanol produzido aumenta, podendo atingir de 3,8 a 5,1% (v/v). Essas características fazem com que a cerveja se torne um meio adequado para o desenvolvimento de microrganismos específicos. As bactérias encontradas na cerveja podem ser classificadas de acordo com sua forma, presença ou não de flagelos, aspectos estruturais e características bioquímicas (DRAGONE et al., 2007).

Algumas colônias verificadas nas análises microbiológicas do produto foram submetidas à coloração de Gram e apresentaram bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Em relação às Gram-negativas, visualizou-se espécies em forma de bacilos alongados, bacilos curtos (Figura 2). Já as Gram-positivas apresentaram formas de cocos e bacilos alongados e cocos, Figuras 3 e 4, respectivamente. Também pode-se visualizar leveduras na forma oval, Figura 4, bem como fungos filamentosos, Figura 5.

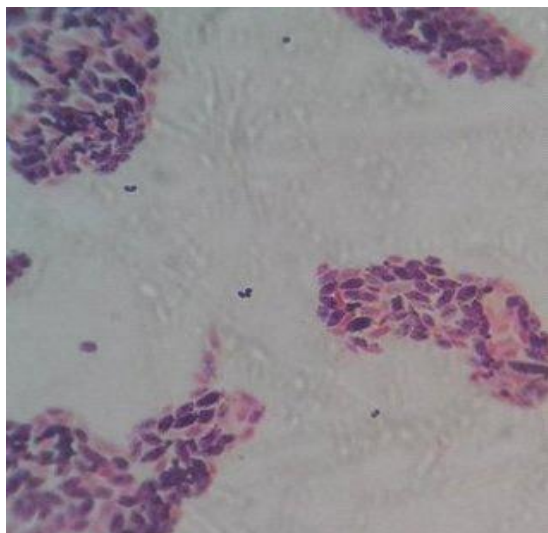
**Figura 2.** Bacilos curtos e alongados Gram-negativos



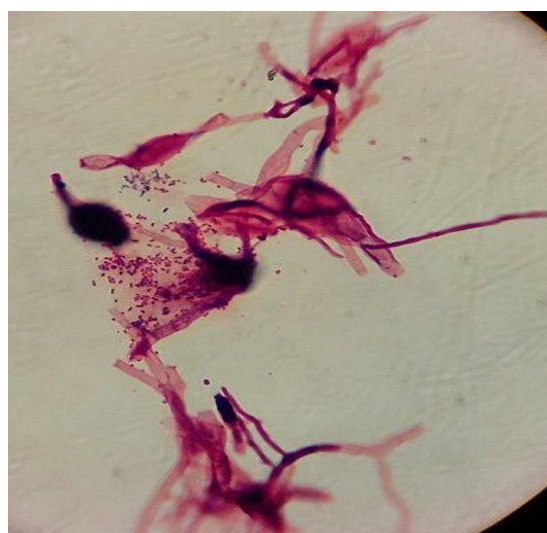
**Figura 3.** Bacilos longos Gram-positivos



**Figura 4.** Cocos isolados de Gram-positivos e leveduras com formato oval



**Figura 5.** Fungo filamentososo



Dragone et al., (2007), descreve em sua pesquisa, relacionada aos principais microrganismos deteriorantes da cerveja, a presença de bactérias Gram-positivas previamente identificadas, tratando-se de bactérias ácido lácticas pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Pediococcus*, sendo microrganismos imóveis com complexos aspectos nutricionais que favorecem sua multiplicação em condições de microaerofilia e anaerobiose.

Em condições de deterioração na cerveja, sabe-se que as bactérias ácidas lácticas causam turbidez, acidez e odores desagradáveis devido à produção de metabólitos com característica doce, amanteigada ou aglutinosa, tornando a cerveja viscosa (DRAGONE et al., 2007).

Os *Lactobacillus* são microrganismos pleomórficos, variando sua forma de bacilos longos e delgados até pequenos cocobacilos. São bactérias heterofermentativas estritas que apresentam crescimento ótimo a 30°C, podendo causar superatenuação na cerveja pela sua capacidade de fermentar dextrinas e amido (DRAGONE et al., 2007). Segundo Silva et al., (2007), alguns *Lactobacillus* podem ser homofermentativos, produzindo mais de 85%

de ácido láctico a partir da glicose, ou heterofermentativo, como citado acima, produzindo ácido láctico, CO<sub>2</sub>, etanol e/ou ácido acético. A temperatura de multiplicação varia entre 15 e 45°C, e a ótima está entre 30 e 40°C, dependendo da espécie.

Conforme características morfológicas e de aspectos de temperatura e condição de baixa concentração de oxigênio, supõe-se que os bacilos alongados, visíveis na Figura 3 (seta no meio), podem ser os *Lactobacilos* descritos por Dragone et al., (2007), como contaminante da amostra.

Outra bactéria Gram-positiva que possivelmente pode ser observada na amostra, considerando as suas características, é a do gênero *Pediococcus*, as quais foram descritas por Dragone et al., (2007) e Whiting (1992) em seus estudos. Trata-se de bactéria homofermentativa que se multiplica em pares ou tétrades e normalmente são encontradas em baixo número em vários tipos de alimentos. São agentes deteriorantes de bebidas alcoólicas, principalmente de cervejas, onde necessitam de requerimento complexo de carboidratos fermentescíveis para um ótimo crescimento, são acidófilos e crescem em baixa concentração de O<sub>2</sub> (LOPES, 2013). Essa bactéria multiplica-se bem durante a fermentação, na maturação e no produto final. A deterioração causada por *Pediococcus* provoca aumento de acidez e turbidez, sabores e aromas desagradáveis da cerveja, devido à formação de diacetil. Silva et al., (2007), relata que a temperatura ótima de crescimento varia entre 25 e 40°C, mas não se multiplicam a temperaturas menores que 10°C, com exceções. Suhre, (2014) relata em seu estudo que o odor desagradável mais importante relacionado à contaminação por bactérias do gênero *Lactobacillus* e *Pediococcus* na cerveja é o de manteiga, atribuído pela presença de diacetil.

Conforme características morfológicas, temperaturas de multiplicação e baixa concentração de O<sub>2</sub>, supõe-se que os pequenos cocos, visíveis na Figura 4 (seta no meio), podem ser os *Pediococcus* descritos por Dragone (2007); Whiting (1992) e Lopes (2013), como contaminante da amostra.

Além das bactérias Gram-positivas, também foram observadas bactérias

Gram-negativas na amostra. Baseando-se nas características relatadas no estudo de Dragone et al., (2007), os principais gêneros Gram-negativos contaminantes da cerveja são: *Pectinatus* e *Megasphaera*. *Pectinatus* são bacilos anaeróbios, móveis não formadores de esporos e possuem flagelos laterais, podendo se multiplicar a temperaturas de 15 a 40°C. O principal efeito de deterioração causada por esses bacilos é uma forte turbidez e um repulsivo odor forte de “ovo podre”, resultante de diferentes ácidos graxos, sulfeto de hidrogênio e metil mercaptano. Como não foram observadas bactérias Gram-negativas que apresentam flagelos entre as colônias analisadas, acredita-se que este gênero não estava presente na amostra analisada. O gênero *Megasphaera* é do tipo cocos imóveis e anaeróbios estritos. A sua multiplicação ocorre a temperaturas entre 15 e 37°C. A contaminação provoca odor fecal na cerveja (DRAGONE et al., 2007).

Bolores e leveduras também foram observados na amostra. Segundo Silva et al., (2007), vários bolores crescem com pH abaixo de 2,0 e diversas leveduras abaixo de 5,0. A temperatura ótima de crescimento da maioria dos fungos encontra-se na faixa de 25 a 28°C. Os bolores deteriorantes de alimentos exigem oxigênio para multiplicação, porém são eficientes em utilizar quantidades mínimas de O<sub>2</sub> dissolvido no substrato. Dentre as colônias observadas, verificou-se a ocorrência de um bolor, conforme Figura 5. Os bolores são facilmente encontrados em qualquer superfície, pois seus esporos são carregados pelo ar. De acordo com Nogueira e Oliveira (2006), alguns gêneros de bolor produzem micotoxinas patogênicas para o homem. Essas micotoxinas são metabólitos secundários dos fungos que exercem reações hepatotóxicas, nefrotóxicas, mutagênicas e carcinogênicas. A gravidade de seus efeitos depende do grau e do tempo de exposição, idade e estado nutricional do indivíduo, entre outros. Entre as diversas toxinas, a Ocratoxina A (OTA) é produzida pelos fungos em condições ambientais distintas. Em ambientes com baixas temperaturas, a OTA é produzida essencialmente por fungos do gênero *Penicillium*, enquanto que em temperaturas mais elevadas é

produzida pelo gênero *Aspergillus*. O autor relata a detecção de OTA em diversos alimentos analisados, inclusive na cerveja, representando 5% de contaminação, segundo dados em sua pesquisa.

Leveduras denominadas “selvagens” são capazes de multiplicarem-se na ausência completa de O<sub>2</sub> e em diferentes concentrações de CO<sub>2</sub>, tornando-se deteriorantes comuns em alimentos engarrafados. O gênero *Brettanomyces* pode ser encontrado em diferentes ambientes, inclusive em bebidas engarrafadas, tendo a capacidade de sobreviver por longos períodos de tempo. A morfologia pode variar de oval a longas células, e quando cultivada em meios ricos de glicose produz grandes quantidades de ácido acético (CARVALHO, 2006). Segundo Suhre (2014), essas leveduras podem causar inúmeras alterações, como a formação de película na superfície da cerveja, produção de turbidez, desenvolvimento de odor, sabores estranhos e fermentação com desvio de atenuação. Baseando-se nas características descritas pelos autores e comparando com a Figura 4 (seta acima), acredita-se ter encontrado essa levedura em nossa amostra.

A maioria das indústrias cervejeiras caracteriza a presença da *Bretanomyces* como contaminante, devido às inúmeras alterações já descritas acima, porém alguns estilos cervejeiros belga apreciam tradicionalmente pela elevada produção de compostos aromáticos (ésteres, fenólicos e aglicona), que incorporam um forte odor e sabor na cerveja (CARVALHO, 2006).

#### 4 CONCLUSÃO

Na amostra não pasteurizada, observou-se uma alta contagem de microrganismos e elevada atividade enzimática. A amostra pasteurizada nos tempos de 1 e 3 minutos demonstrou menor desenvolvimento microbiológico e importante redução da atividade enzimática em comparação à amostra não pasteurizada.

Porém, foram nos tempos de 5 e 10 minutos que efetivamente

observou-se inativação completa da enzima invertase, bem como eliminação dos microrganismos.

Considerando a importância de que o tempo de pasteurização da cerveja seja o menor possível, a fim de minimizar as alterações sensoriais desagradáveis no produto (SIQUEIRA, BOLINI e MACEDO, 2008), concluiu-se que 5 minutos a 65°C é eficiente para que o produto se torne estável microbiologicamente.

Segundo os parâmetros estudados neste trabalho, observou-se que há correlação positiva entre a análise de microrganismos totais a 35°C e a análise de inativação da enzima invertase.

## REFERÊNCIAS

Associação Brasileira da Indústria da Cerveja - CERVBRASIL. Produção mundial da cerveja. **Anuário**. p. 16 e 17, 2015. Disponível em: <[http://www.cervbrasil.org.br/arquivos/ANUARIO\\_CB\\_2015\\_WEB.pdf](http://www.cervbrasil.org.br/arquivos/ANUARIO_CB_2015_WEB.pdf)>. Acesso em: jan. 2016.

AQUARONE, E.; LIMA, A. U.; BORZANE, W. **Alimentos e bebidas produzidos por fermentação**. São Paulo: Blucher, 1993. P. 243.

CARVALHO, G. B. M.; BENTO, C. V.; SILVA, J. B. A. Elementos biotecnológicos fundamentais no processo cervejeiro: 1º parte. **Revista Analytica**, São Paulo, n. 25, out/nov. 2006.

DEUNER, S.; FERREIRA, L. S.; BACARIN, M. A.; BERVALD, C. M. P.; ZANATTA, E. R. Caracterização parcial da invertase ácida solúvel em tubérculos de batata: Energia de Ativação e efeito de inibidores. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 11, n. 1, p. 45-50, jan./mar., 2005.

DRAGONE, G.; MUSSATO, S. I.; NOGUEIRA, A. D.; SILVA, J. B. A. Revisão: Produção de Cerveja: Microrganismos Deteriorantes e Métodos de Detecção. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 10, n. 4, p. 240-251, out./dez. 2007.

LOPES, A. R.; **Prospecção de bactérias lácticas em matriz ambiental**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Rio Claro, 2013.

Manual-accu-chek-active. Roche diagnostics. 2013, Germany. Disponível em: <<https://www.accuchek.com.br/multimedia/documents/guiaedeprodutos/manual-accu-chek-active-novo.pdf>>. Acesso em: jan. 2016.

MARQUEZ, L. D. S. **Produção de açúcar invertido pelo uso de invertase imobilizada em resinas**. 124 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia/MG, 2007.

MEGA, J. K.; NEVES, E.; ANDRADE, C. J. A produção de cerveja no Brasil. **Revista CITINO**. v. 1, n. 1, p. 34-42, 2011.

MELNIKOV, G. M. D. **Fermentação primária para produção de cervejas de altas densidades por processo contínuo utilizando leveduras imobilizadas em bagaço de malte**. 143 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

MOURA, C. L. A.; PINTO, G. A. S.; RODRIGUES, S. **Determinação da atividade de invertase em extratos enzimáticos**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007.

NOGUEIRA, S.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Prevalência de ocratoxina A em alimentos e consequentes problemas de segurança alimentar. **Alimentação Humana**. V. 12, n. 2, 2006.

REBELLO, F. F. P. Produção da cerveja. **Revista Agroambiental**. v. 1, n. 3, p. 45-155, 2009.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Varela, 2007. P. 536.

SIQUEIRA, P. B.; BOLINI, H. M. A.; MACEDO, G. A. O processo de fabricação de cerveja e seus efeitos na presença de polifenóis. **Alimentos e Nutrição, Araraquara**. V. 19, n. 4, p. 491-498, out./dez. 2008.

SUHRE, T.; **Controle de Qualidade em microcervejarias: avaliação da viabilidade, vitalidade e contaminantes em leveduras cervejeiras**. Monografia (Bacharelado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

WHITING, M.; CRICHLLOW, M.; INGLEDEW, W. M.; ZIOLA B. Detection of *Pediococcus* spp. in Brewing Yeast by a Rapid Immunoassay. **Applied and**



**Environmental Microbiology.** V. 58, n. 2, p. 713-716, 1992.

Enviado em: 17 fev. 2017

Aceito em: 27 jun. 2017

Editora responsável: Michele Rosset