



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade De Engenharia De Alimentos

MARCELA CAPUZZO ALVAREZ

AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE *Bacillus thuringiensis* AO  
LONGO DAS ETAPAS DO PROCESSO CERVEJEIRO

CAMPINAS

2021

MARCELA CAPUZZO ALVAREZ

AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DE *Bacillus thuringiensis* AO  
LONGO DAS ETAPAS DO PROCESSO CERVEJEIRO

Dissertação apresentada à  
Faculdade de Engenharia de  
alimentos da Universidade de  
Campinas como parte dos  
requisitos exigidos para obtenção  
do título de Mestra em Ciência de  
Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Anderson De Souza Sant'Ana

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À  
VERSÃO PRELIMINAR DISSERTAÇÃO  
DEFENDIDA PELA ALUNA MARCELA  
CAPUZZO ALVAREZ ORIENTADA PELO  
PROF. DR. ANDERSON DE SOUZA SANT'ANA

CAMPINAS

2021

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos  
Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

AL86a Alvarez, Marcela Capuzzo, 1991-  
Avaliação do comportamento de *Bacillus thuringiensis* ao longo das etapas do processo cervejeiro / Marcela Capuzzo Alvarez. – Campinas, SP : [s.n.], 2021.

Orientador: Anderson de Souza Sant'Ana.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Cerveja. 2. bactérias esporuladas. 3. Bebidas alcoólicas. 4. Processamento. 5. Deterioração. I. Sant'Ana, Anderson de Souza. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Evaluation of *Bacillus thuringiensis* behavior along the stages of brewing

**Palavras-chave em inglês:**

Beer

Sporulated bacteria

Alcoholic beverages

Processing

Deterioration

**Área de concentração:** Ciência de Alimentos

**Titulação:** Mestra em Ciência de Alimentos

**Banca examinadora:**

Anderson de Souza Sant'Ana [Orientador]

Marciane Magnani

Wilmer Edgard Luera Peña

**Data de defesa:** 11-02-2021

**Programa de Pós-Graduação:** Ciência de Alimentos

**Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)**

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-7111-406X>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/1220503115081548>

## BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Anderson de Souza Sant'Ana (FEA/Unicamp) – Orientador

---

Prof. Dr. Wilmer Edgard Luera Peña (DTA/UFV) – Membro Titular

---

Profa. Dra. Marciane Magnani (UFPB) – Membro Titular

A ATA da Defesa assinada pelos membros da Comissão Examinadora consta  
no processo de vida acadêmica do aluno

## **Agradecimentos**

Agradeço a todos que estiveram presentes durante a realização deste projeto. Aos meus pais, Eugênio e Milêne, que abriram todos os caminhos possíveis para que eu chegasse aqui. Aos meus tios avós Jaci e Dagmar, que me acolheram em Campinas e disponibilizaram tudo que eu precisava para percorrer esse caminho; aos meus primos Andiara, Raquel, Bárbara e Lucca, que me mantiveram sã durante esse processo nada fácil, e foram as melhores companhias que eu poderia ter. Ao meu esposo, que nunca me deixou desistir nos momentos difíceis e foi a principal base para conseguir completar essa etapa. A vocês este trabalho é dedicado com amor, pois sem vocês nada disso seria possível!

Agradeço ao LMQA e colegas de laboratório, à Unicamp e ao Conselho Nacional de Pesquisa. Os autores agradecem o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil - Código de financiamento: 001

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Pesquisa – CnPq, processo nº 160647/2017-7.

## Resumo

A contaminação da cerveja por microrganismos esporulados não está bem documentada. Um total de 260 bactérias esporuladas, pertencentes principalmente ao gênero *Bacillus*, foram isoladas de cervejas Lager e sem álcool, sendo relatada a presença/ausência de genes resistentes ao lúpulo dessas bactérias. No presente trabalho foi avaliado o comportamento de três cepas de *Bacillus thuringiensis* (C:002, C:118 e C:206), que continham pelo menos um gene de resistência frente a três lúpulos (Saaz, Cascade e Magnum), em três concentrações diferentes (30, 45 e 60g/ 20 litros), por análise de halo de inibição. As cepas também foram inoculadas em cervejas com diferentes pHs, avaliando-se de seu comportamento ao final de sete dias. As principais etapas do processamento da cerveja, que são a brassagem, a fermentação e a maturação, foram simuladas em laboratório avaliando-se o comportamento das cepas ao longo de cada uma destas etapas de processo. Os dados indicaram que as cepas apresentam comportamento diferenciado em função da operação unitária empregada, sendo a a brassagem a etapa mais drástica e que culminou no maior número de reduções decimais. Os dados indicaram que em valores de pH > 5,7 há possibilidade de algumas cepas se multiplicarem na cerveja. Em conjunto, os resultados deste estudo indicam que as bactérias esporuladas podem sobreviver às etapas de fabricação de cerveja e que, dependendo da composição do produto final, podem fornecer condições para a germinação e crescimento pós-germinativo de bactérias esporuladas, tais como *B. thuringiensis*.

**Palavras-chave:** cerveja, bactérias esporuladas, bebidas alcólicas, processamento, deterioração.

## Abstract

Contamination of beer by sporulated microorganisms is not well documented. A total of 260 sporulated bacteria, mainly belonging to the genus *Bacillus*, were isolated from Lager beers and without alcohol, and in part of the isolates, the presence / absence of hop-resistant genes was reported. In the present work, the behavior of three strains of *Bacillus thuringiensis* (C: 002, C: 118 and C: 206) was evaluated, which contained at least one hop resistance gene against three hops (Saaz, Cascade and Magnum), in three different concentrations, by inhibition halo analysis. The strains were also inoculated in beers with different pHs, followed by an evaluation of their behavior after seven days. The main stages of beer processing, which are brewing, fermentation and maturation, were simulated in the laboratory, evaluating the behavior of the strains along each of these process steps. The data indicated that the strains show a different behavior due to the unitary operation employed, with the mashing being the most drastic step and culminating in the largest number of decimal reductions. The data indicated that at pH values > 5.7 it is possible for some strains to multiply in beer. Together, the results of this study indicate that sporulated bacteria can survive the brewing steps and that, depending on the composition of the final product, they can provide conditions for the germination and post-germinative growth of sporulated bacteria, such as *B. thuringiensis* .

**Keywords:** beer, sporulated bacteria, alcoholic beverages, processing, deterioration.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 Definição	12
2.2 Matérias-primas	13
2.2.1 Água	13
2.2.2 Malte	14
2.2.3 Lúpulo	15
2.2.4 Levedura	16
2.2.5 Adjuntos	17
2.3 Processamento	18
2.3.1 Maltagem	19
2.3.2 Brassagem	19
2.3.3 Fervura	20
2.3.4 Fermentação	21
2.3.5 Maturação	22
2.3.6 Filtração	22
2.3.7 Envase e Pasteurização	23
2.4 Contaminações microbiológicas da cerveja	23
2.4.1 Bactérias Gram-Positivas	24
2.4.2 Bactérias Gram-Negativas	25
2.4.3 Leveduras selvagens	26
2.4.4 Microrganismos esporulados	26
2.4.5 Resistência ao lúpulo	28
3 OBJETIVOS	29
3.1 Objetivo geral	29
3.2 Objetivos específicos	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 Microrganismos e preparo das suspensões	29
4.2 Avaliação do comportamento de cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i> ao longo do processo de fabricação de cerveja	30

4.2.1 Brassagem	30
4.2.2 Fermentação	31
4.2.3 Maturação	31
4.3 Avaliação do comportamento de <i>Bacillus thuringiensis</i> em cervejas com diferentes pHs	32
4.4 Avaliação do comportamento dos <i>Bacillus thuringiensis</i> em cervejas com diferentes lúpulos	33
4.5 Análises estatísticas	33
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1 Avaliação do comportamento de cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i> ao longo do processo de fabricação de cerveja	34
5.1.1 Brassagem	34
Tabela 1: Contagens de <i>B. thuringiensis</i> (cepas 002, 118 e 206) ao longo do processo de brassagem <sup>1</sup> .	35
5.1.2 Fermentação	36
Tabela 2: Teste Scott-Knott para diferentes tempos e cepas (A) e diferença entre células vegetativas e esporos (B) durante fermentação	38
5.1.3 Maturação	38
Tabela 3: Contagens de células vegetativas e esporos de três diferentes cepas de <i>B. thuringiensis</i> durante maturação da cerveja.	39
5.2 Avaliação do comportamento dos <i>Bacillus thuringiensis</i> em cervejas com diferentes pH	40
Tabela 4: Contagem de três cepas de <i>B. thuringiensis</i> em cervejas com valores de pH alterados – após a inoculação (N0) e após 7 dias (NF) de estocagem.	41
5.3 Avaliação do comportamento dos <i>Bacillus thuringiensis</i> em cervejas com diferentes lúpulos	41
Tabela 5: Halo de inibição (mm <sup>3</sup> ) de três cepas de <i>B. Thuringiensis</i> por soluções contendo diferentes quantidades (30, 45 , 60g / 20 L) e tipos de lúpulo (A, B, C). As soluções foram submetidas ou não à fervura (F) por 60 minutos.	42
6 CONCLUSÕES	43
7 REFERÊNCIAS	44

## 1 INTRODUÇÃO

A cerveja é uma bebida que possui alta estabilidade microbiológica devido a fatores que desfavorecem a sobrevivência de vários microrganismos, como por exemplo: presença de etanol (0,6 a 12,3% v/v), alta concentração de dióxido de carbono (aproximadamente 0,5% p/p), presença de compostos antimicrobianos do lúpulo, baixa concentração de oxigênio (<0,1 ppm) e baixo pH (3,8 a 4,7). Mesmo possuindo tais características, alguns microrganismos ainda conseguem sobreviver e se multiplicar causando a deterioração do produto (Suzuki et al. 2006; Sakamoto and Konings 2003). Estes microrganismos podem ser carreados pelo malte, podem ser oriundos de uma contaminação por leveduras selvagens (que são outras espécies/cepas de leveduras que não a cepa cervejeira) presentes no inóculo de levedura cervejeira que será usado no processo, além de também ter a possibilidade de estarem presentes na área de processamento, contaminando assim o produto em algum momento da fabricação. Além da deterioração, alguns problemas podem ser causados durante o processamento, como por exemplo: o consumo do açúcar por leveduras selvagens; floculação precoce do fermento; formação de goma; inibição e/ou redução da viabilidade das leveduras, o que compromete o rendimento e a produtividade da fermentação (Althertum et al. 1984; Yokoya 1991).

Apesar de ser uma bebida com grande estabilidade microbiológica, conforme descrito acima, cervejas com valores elevados de pH, baixo etanol e baixas concentrações de CO<sub>2</sub>, e aquelas adicionadas de açúcar são mais propensas ao crescimento microbiano (Fernandez 1995). A contaminação da cerveja pode causar prejuízos econômicos devido a retirada de produtos do mercado, necessidade de descarte, pode colocar em risco a saúde do consumidor (caso haja contaminação por patógenos), e ainda tem como consequência a perda da confiança do cliente.

A contaminação da cerveja por microrganismos esporulados não está bem documentada. Os esporos bacterianos são resistentes a operações unitárias empregadas no processamento e podem persistir nos alimentos,

ambiente e superfícies de processamento por longos períodos. Os esporos podem germinar sob condições variadas de temperatura, pH e atividade de água, potencialmente resultando em toxiinfecções alimentares ou deterioração dos alimentos (Carlin 2011). A elevada resistência dos esporos, juntamente com seu grande poder de adesão, tornam os microrganismos esporulados um grande desafio para a indústria de alimentos. Alguns patógenos com capacidade de esporular tais como *Bacillus cereus*, são hidrofóbicos, podendo se aderir a diversos tipos de materiais e superfícies, resistindo a processos de higienização (Gomes 2013).

Munford et al. (2017), isolou e identificou 260 bactérias esporuladas de cervejas Lager e sem álcool, pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus*, *Lysinibacillus*, *Cohnella*, *Rummeliibacillus*, *Alicyclobacillus* e *Anoxybacillus*. Além disso, estes autores relataram que alguns isolados carreavam genes de resistência ao lúpulo. O lúpulo contém iso-alfa-ácidos e suas formas isomerizadas que correspondem aos compostos que garantem a estabilidade microbiológica da cerveja (Caballero et al. 2009). A resistência ao lúpulo pode ser causada por contato prolongado das bactérias aos compostos do lúpulo, resultando assim em uma resistência aos seus compostos antibacterianos. Haakensen e Ziola (2008) identificaram bactérias esporuladas capazes de deteriorar cerveja e que carreavam genes de resistência ao lúpulo, evidenciando assim que tais microrganismos representam risco de deterioração em diversos tipos de cerveja. Sabe-se que a principal fonte de microrganismos esporulados é o solo e que matérias-primas possuem frequentemente contagens elevadas de esporos (Carlin, 2011). Considerando-se que as matérias-primas usadas para fabricação da cerveja podem contaminar-se por bactérias esporuladas e que estas bactérias podem sobreviver e até deteriorar o produto final sob determinadas condições, fica evidente a importância de se estudar o seu comportamento ao longo de algumas etapas do processamento desta bebida.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Definição

A fermentação de cereais é o primeiro processo biotecnológico utilizado pelo homem. O processo fermentativo de fabricação da cerveja teve seu início na Mesopotâmia em 6.000 antes de Cristo (a.C), sendo utilizada não só como parte da dieta mas também como artigo medicinal e cosmético (Aquarone et al. 1983). Alguns estudiosos arriscam datar o nascimento da cerveja por volta de 8.000 a.C, e alguns afirmam ter acontecido na Suméria (Hornsey 2003; Fernandes 2012). A produção foi se aperfeiçoando e hoje em dia a cerveja é a bebida alcoólica mais consumida no mundo, devido a fatores como prazer, paladar, lazer e sociabilidade (Fernandes, 2012).

A legislação brasileira define cerveja como: "*a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto cervejeiro oriundo do malte de cevada e água potável, por ação da levedura, com adição de lúpulo*" (Brasil, 1997). Em alguns países é permitido o uso de algumas matérias-primas como arroz, trigo ou milho como adjuntos, para corrigir propriedades que não foram alcançadas, principalmente como fonte extra de carboidratos, e reduzir custos (D'Avilla, et al. 2012).

A produção de cerveja sempre foi considerada uma arte, e em algumas culturas a bebida é considerada um líquido sagrado. Ela é valorizada tanto pelas suas propriedades físico-químicas (qualidade), quanto pelo seu emaranhamento religioso, cultural e tradicional (Meussdoerffer 2009). O processo de fabricação da cerveja não muda há milênios. Hoje em dia utilizamos as mesmas operações unitárias que eram utilizadas na Idade Média, pois a natureza da cerveja vem justamente das matérias-primas e de processos clássicos (Bamforth 2000).

No Brasil, a cerveja fora trazida pela companhia das Índias Orientais, no século XVIII, pelos holandeses e passou a ser conhecida, mas não tão consumida, ficando bem atrás da cachaça que era a bebida mais popular na época. Em 1888 surgiram as duas grandes cervejarias que fariam história no

Brasil: A Companhia (Cia.) Cervejaria Brahma e a Cia. Antarctica Paulista. Em 1999 com a fusão das Cia. Brahma e Antarctica, surge a Ambev – Companhia de bebidas das Américas. A criação da Ambev e a sua posterior fusão com a empresa belga Interbrew foram os dois fatos mais marcantes da história da cerveja brasileira. Com o nome InBev, a nova empresa mundial tornou-se a maior produtora do mundo de cerveja (Venturini-Filho 2016).

O Brasil é o terceiro maior produtor de cerveja do mundo, produzindo 14 bilhões de litros em 2017, e 27º em relação ao consumo *per capita*. Essa produção gerou um faturamento de 107 bilhões de reais nesse ano (CERVBRASIL, 2018).

As cervejas são divididas em dois grandes grupos: Lager e Ale. A primeira e mais comum, é fabricada em fermentação profunda (baixa), e dentro deste grupo destacam-se as Pilsen (sabor suave, cor clara e teor alcoólico entre 4 e 5%), Viena (amargor característico do malte, cor acobreada clara, teor alcoólico entre 4,5 e 5,5%), Dunkel (sabor e aroma doces, coloração varia do cobre ao castanho-escuro, teor alcoólico entre 4 e 6%) e Boch (adocicada, coloração varia de cobre claro a castanho, teor alcoólico entre 6,3 e 7,2%). Seu processo fermentativo ocorre lentamente e dura em torno de 6 a 10 dias, na temperatura de 7 a 12°C. Após a fermentação a cerveja "descansa" a 0° C durante o período de 15 a 20 dias (Delos 1994).

As Ale são produzidas em fermentação superficial ou "alta", onde se destacam as Porter (escura, encorpada, sabor acentuado de malte, adocicada, cerca de 5% de álcool) e as Stout (menos escura e mais amarga que as Porter, teor alcoólico entre 5 e 6,5%). A fermentação deste tipo de cerveja ocorre entre 20 e 25°C, no período de 2 a 5 dias, e são armazenadas entre 4,5 e 8°C (Delos 1994).

## **2.2 Matérias-primas**

As matérias-primas essenciais para a produção de cerveja são:

### **2.2.1 Água**

Correspondendo a em média 95% do produto final, a água é a matéria-prima mais importante na produção da cerveja e possui características

determinantes para a qualidade da bebida (Pombeiro 2008). Aquarone et al. (1983) define a água ideal como: não clorada, potável, pH entre 6,5 e 7,0; menos de 100 mg/litro de carbonato de cálcio ou magnésio; traços de magnésio na forma de sulfatos; 250 a 500 mg/litro de sulfato de cálcio; 200 a 300 mg/litro de cloreto de sódio e menos de 1 mg/litro de ferro. A água utilizada nas cervejarias geralmente passa por um tratamento para entrar nos padrões físico-químicos e microbiológicos necessários. Águas de baixa qualidade podem ter um custo de tratamento final muito alto, inviabilizando o negócio (Briggs et al. 2004).

Alguns sais desempenham um papel único na cerveja, como exemplo o cálcio que protege a enzima amilase da desativação térmica durante a hidrólise do amido bem como precipita o oxalato ( $\text{CaC}_2\text{O}_4$ ), evitando assim a posterior turvação da bebida (Bamfoth 2003). O magnésio, que é essencial ao funcionamento de certas enzimas da levedura, pode conferir amargor à bebida quando em níveis mais elevados que  $30 \text{ mg L}^{-1}$ . O zinco ativa a síntese de proteínas, o que estimula o crescimento das leveduras (ativando a fermentação). Já os cloretos de cálcio e magnésio conferem um paladar mais encorpado a cerveja, porém se a concentração estiver mais alta que  $100 \text{ mg L}^{-1}$  pode ocorrer corrosão dos equipamentos da linha de produção (Reinold 1997).

### **2.2.2 Malte**

Malte é um termo técnico que define a matéria-prima resultante da germinação de qualquer cereal sob condições controladas (Kunze 1997). Ele é a base do sabor de toda cerveja. O processo de fabricação do malte chama-se maltagem e consiste no umedecimento e posterior germinação dos grãos, visando a sacarificação dos amidos para melhor assimilação das leveduras. O cereal mais utilizado é a cevada devido ao seu alto teor de amido e sua capacidade enzimática, mas em alguns países é permitida a utilização de adjuntos, que são fontes alternativas de carboidratos (Fernandes 2012). Os adjuntos são escolhidos para aumentar a eficiência da brasagem, contribuindo como fonte de carboidrato para a levedura. Podem ser qualquer outro cereal como arroz, sorgo, trigo, entre outros. O Brasil produz apenas maltes base

(mais usados em Pilsen, cervejas claras), tendo apenas quatro espécies destes que se adaptaram ao clima.

Malte base é aquele que, após germinação, é apenas secado à temperatura de 65°C, sem coloração escura, sabores ou aromas marcantes. É a fonte de enzimas para a mostura. Já os denominados maltes especiais, passam por temperaturas mais altas para obtenção de cor e aroma e já não possuem enzimas, pois elas desnaturam na temperatura de 78°C.

### **2.2.3 Lúpulo**

O lúpulo é o responsável por conferir aroma e amargor a cerveja, além de possuir propriedades antibacterianas e de estabilização da espuma. As flores das plantas femininas de *Humulus lupulus* possuem grânulos de lupulina, material resinoso rico em óleos essenciais, resinas amargas e polifenóis (Fernandes 2012). A definição para lúpulo comercial, de acordo com o decreto 6.871 de 2009, compreende os cones das inflorescências em sua forma natural ou industrializada, aptos para o consumo humano.

O lúpulo possui substâncias que podem ajudar na saúde, o que é comprovado por grandes trabalhos científicos desde praticamente o início dos estudos acadêmicos sobre a planta. Os flavonóides, algumas destas substâncias, estão muito presentes no lúpulo. Os de maior destaque são: xanthohumol, isoxanthohumol, quercitina, kaempferol e resveratrol. (Vanhoecke et al. 2005), que podem ter efeito sedativo, diurético e propriedades antibacterianas. Ele também afeta positivamente o sistema nervoso, combatendo a tensão, diminuindo a ansiedade e melhorando o bem-estar, além de ser usado no tratamento de sintomas da menopausa. Há ainda, estudos relacionando o lúpulo no combate a obesidade, uma vez que ele inibiria a ação de enzimas digestivas como a  $\alpha$ -amilase,  $\alpha$ -glicosidase, lipase e tripsina (Marques et al. 2014), reduzindo a absorção de carboidratos e lipídeos.

O Brasil começou a desenvolver sua produção de lúpulo com grande dificuldade já que não possuímos o clima e as características essenciais do solo para tal. Uma das razões pelas quais apenas algumas regiões cultivam o lúpulo, é que ele precisa de 13 horas de luz solar para florescer, por isso no

Brasil o cultivo é difícil (mas não inviável), já que o nosso país não se encontra na latitude que oferece esse tempo de luz solar. Outro fator importante para o cultivo é o clima, devido às exigências de certos controles de temperatura e umidade (Bamfoth 2003).

O lúpulo é um dos insumos mais caros na produção da cerveja. Eles se diferem em lúpulos de amargor, aroma e de amargor e aroma (Eßlinger 2009). Os de aroma possuem compostos aromáticos finos, como farneseno e cariofileno, o que resulta em características sensoriais singulares no produto final. Seus óleos essenciais possuem alta complexidade, com mais de 300 componentes aromáticos presentes, na maioria hidrocarbonetos e terpenos, e possuem de 2,4 a 5% de  $\alpha$ -ácidos (Fergus 2006; Bamfoth 2009). Já os de amargor possuem alta quantidade de  $\alpha$ -ácidos, de 10 a 15%, onde são encontrados os compostos de amargor cohumulona, humulona e adhumulona. São extraídos da resina do lúpulo, assim como os  $\beta$ -ácidos (Kunze 2011).

O lúpulo atualmente quase não é utilizado *in natura*, é adicionado em forma de *pellet*, em pó (*cry hops*), flor desidratada ou extratos aquosos de óleos essenciais ou  $\alpha$ -ácidos derivados do lúpulo. Há várias formas de adição do lúpulo na bebida, podendo ser adicionados de uma só vez, ou em vários momentos da etapa da fervura, dependendo das características desejadas na cerveja, atribuindo assim sabor, aroma e também propriedades antimicrobianas (Jaskula et al. 2008). Por exemplo, os lúpulos de aroma geralmente são adicionados no final da etapa de fervura, evitando a perda de óleos essenciais que por sua vez são voláteis (Kunze 2011).

#### **2.2.4 Levedura**

São os microrganismos responsáveis pelo processo fermentativo, no qual o consumo de glicose do mosto (malte + água) pela levedura gera  $\text{CO}_2$  e álcool etílico característicos da cerveja. Geralmente as fermentações têm início com cepas de leveduras puras mantidas em meio de cultura sólido ou células liofilizadas, selecionadas para o processamento específico da cervejaria (Kalnin 1999).

A espécie mais comum utilizada na maioria dos estilos de cerveja é a *Saccharomyces cerevisiae*, mas outras espécies são utilizadas para a elaboração de alguns estilos especiais, por exemplo, *Brettanomyces bruxellensis* para a produção de cervejas mais amargas e *Wickerhamomyces anomalus* para produção de cervejas funcionais e de baixo teor alcoólico (Basso et al. 2016).

Duas estirpes ou cepas diferentes de levedura são responsáveis pelos dois tipos diferentes de fermentação, a alta e a baixa. Tradicionalmente as leveduras Ales são descritas como de “alta fermentação”, pois elevam-se à superfície no final da fermentação e formam uma película flutuante de biomassa. Já as Lager são denominadas de “baixa fermentação”, porque floculam no final da fermentação e formam uma fase sedimentada de biomassa (Carvalho et al. 2006). A linhagem utilizada para Ales é a *Saccharomyces cerevisiae*, que são as mais diversas entre as leveduras e já foram isoladas em várias regiões do mundo, também conhecidas por promover uma “fermentação top” (Bokulich and Bamforth 2013). As leveduras de alta fermentação também podem influenciar, produzindo mais ésteres do que álcoois superiores em relação às leveduras de baixa fermentação.

A diferença sensorial entre os estilos de cerveja é marcada pelo tipo de fermentação utilizado na produção. As leveduras de alta fermentação produzem um aroma mais frutado, aromático e picante, enquanto as leveduras de baixa fermentação produzem um buquê aromático mais leve, menos florado, mais suave. O processo de fermentação também ocorre diferente entre elas: as leveduras de alta fermentação trabalham a uma temperatura entre 20 e 25 °C por cerca de 2 a 5 dias de fermentação, ao passo que, as de baixa fermentação necessitam de temperaturas mais baixas, por volta de 7 a 12 °C e o tempo de fermentação dura entre 6 e 10 dias (Kling 2006).

### **2.2.5 Adjuntos**

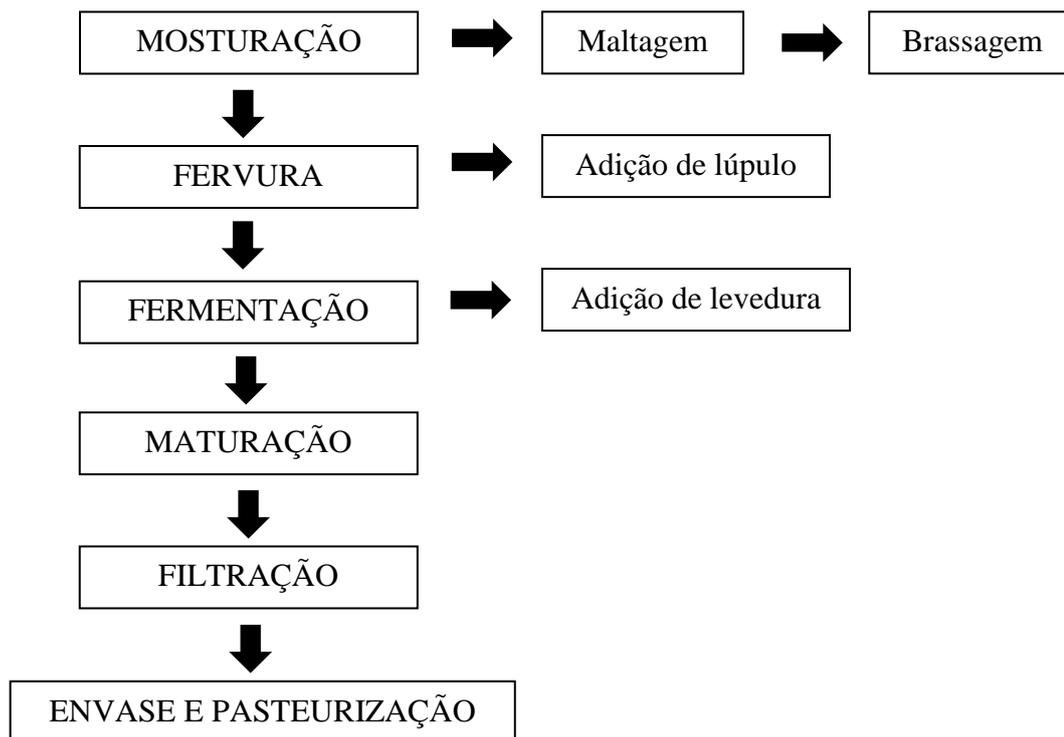
Os adjuntos são utilizados como fonte de carboidrato complementar, substituintes do malte para corrigir corpo e álcool, dar equilíbrio, proporcionar estabilidade física, e, principalmente, reduzir custo de produção (Fernandes 2012). O principal adjunto usado no Brasil é o milho, mas outros cereais podem

ser utilizados como o arroz, trigo e sorgo, e também extratos de cereais ou outros açúcares (Bannwart 2015). A legislação brasileira permite o uso de adjuntos na formulação da cerveja em relação ao extrato primitivo de acordo com o tipo (coloração) da cerveja. De acordo com a legislação, extrato primitivo ou original é o extrato do mosto de malte de origem da cerveja, que por sua vez é definido como o resultante da desidratação do mosto de malte até o estado sólido, ou pastoso, devendo, quando reconstituído, apresentar as propriedades do mosto de malte. Assim, a quantidade permitida de adjuntos em relação ao extrato primitivo, não poderá ser superior a 15% na cerveja clara (a que tiver cor correspondente a menos de vinte unidades EBC (European Brewery Convention)), 50% na cerveja escura (vinte ou mais EBC) e 10% na cerveja extra (Brasil 1997).

Países como Alemanha e Bélgica, onde a tradição cervejeira é forte, obedecem à "Lei de Pureza da Cerveja" (Reinheitsgebot), estabelecida em 1516 na cidade alemã de Baviera. A lei proíbe adição de qualquer matéria-prima que não seja cevada, lúpulo e água (Kunze 1997). Cervejarias artesanais geralmente seguem a lei de pureza. Frederico Ming, mestre-cervejeiro da Cervejaria Capitu, cervejaria artesanal situada no estado de São Paulo, afirma que os adjuntos, se corretamente tratados, são positivos na elaboração da cerveja e que o não uso pelas cervejarias artesanais é uma questão de preconceito, já que os monges Trapistas usavam açúcar na elaboração de suas cervejas, e uma série de diferentes características organolépticas podem ser exploradas com essas diferentes matérias-primas. Além disso, os adjuntos possuem menor risco de contaminação e maior controle no processo.

### **2.3 Processamento**

O processo de fabricação da cerveja pode ser dividido basicamente nas seguintes etapas:



### 2.3.1 Maltagem

O processo de transformação dos grãos de cevada em malte pode ser explicado em três fases: maceração, germinação e secagem. Os grãos após serem limpos e selecionados são colocados em tanques e imersos com água, adquirindo a umidade necessária para iniciar a germinação (40-42%). Logo após são depositados em caixas de germinação sob condições controladas de temperatura, umidade e oxigênio durante o período de 4 a 6 dias. O objetivo da germinação é liberar as enzimas necessárias para degradação das proteínas e amidos, formando assim o alimento para a levedura. Para inativar as enzimas é feito o processo de secagem em rampa ou de torrefação e a germinação é interrompida. Após secagem o malte é armazenado em silos onde fica estabilizando por no mínimo 3 semanas (Sobral 2006). Diferentes tempos e temperaturas de torrefação resultam em diferentes tipos de cerveja.

### 2.3.2 Brassagem

O malte moído é adicionado de água aquecida e submetida a condições de tempo, temperatura, pH e agitação pré-estabelecidas para que as amilases do malte sejam ativadas e hidrolizem o amido de açúcares simples. A "pasta"

formada é filtrada para separar a parte insolúvel (grãos gastos, cascas do malte e proteínas coaguladas, denominadas “dreche”, que é um excelente alimento para o gado), da parte filtrada (mosto) (Pombeiro 2008).

Sendo o objetivo principal da brassagem sacarificar os açúcares do mosto, logo cada estilo de cerveja necessitará de rampas de temperaturas diferentes, dependendo das enzimas que estarão presentes na mistura. As principais enzimas, presentes em todos os estilos de cerveja, são a  $\alpha$ -amilase e a  $\beta$ -amilase. A primeira atua a  $70\pm 3^\circ\text{C}$ , produzindo açúcares fermentescíveis como a glicose, maltose e maltotriose, e também algumas dextrinas. Já a  $\beta$ -amilase atua na faixa de  $55\text{-}60^\circ\text{C}$ , produzindo maltose (Bamfoth 2003). A  $\beta$ -glucanase, que está presente somente em cervejas de trigo ou cervejas especiais que utilizem algum ingrediente que possua a enzima, tem sua ativação ideal em torno de  $45^\circ\text{C}$ . Algumas receitas mais elaboradas também possuem a rampa de temperatura de  $50^\circ\text{C}$ , chamada de descanso proteico, onde ocorre a desnaturação de proteínas.

A etapa da brassagem também tem grande importância pelo fato de que determinará as principais características do produto final: teor alcoólico, corpo, cor e formação e retenção da espuma. Essas características são determinadas de acordo com a quantidade e tipos de maltes empregados na receita e pelas temperaturas e tempos utilizados na etapa (Kunze 2006).

### **2.3.3 Fervura**

O mosto é transferido para caldeiras onde é fervido e é adicionado o lúpulo. A fervura ocorre em torno de 60 minutos, pois a partir desse tempo a isomerização dos  $\alpha$ -ácidos do lúpulo já não ocorre de forma significativa e conseqüentemente não há aumento no amargor, e após isso o mosto é resfriado para a etapa seguinte de fermentação, que requer baixas temperaturas. O lúpulo pode ser adicionado em vários momentos durante a fervura, para desenvolver aroma e sabor. Ele é adicionado na etapa de fervura para que aconteça a reação de isomerização, a fim de converter  $\alpha$ -ácidos em iso- $\alpha$ -ácidos, o que favorece o amargor da cerveja. Como a fervura também causa perda dos óleos essenciais do lúpulo, pois são altamente voláteis, costuma-se utilizar dois tipos de adição na mesma fervura, uma no início e

outra no fim. Assim os ácidos amargos são isomerizados e a perda dos óleos voláteis que conferem aroma é minimizada (Hardwick 1994).

A fervura é de suma importância para a qualidade final da cerveja e tem como objetivos: esterilização do mosto, solubilização das substâncias amargas e aromáticas do lúpulo, eliminação de substâncias voláteis que conferem sabores desagradáveis, inativação de enzimas, coagulação de complexos proteicos que podem causar turvação no produto final, e formação de alguns compostos responsáveis por cor e sabor (Sobral 2006). Após fervido, o mosto é resfriado para a seguinte etapa, geralmente o resfriamento ocorre por trocador de calor de placas.

#### **2.3.4 Fermentação**

Na primeira etapa da fermentação, as leveduras são inoculadas no mosto aerado em tanques de aço inox para evitar contaminação e perda de CO<sub>2</sub>, onde se reproduzem rapidamente devido à quantidade de O<sub>2</sub> dissolvido no meio. Os tanques possuem um sistema de serpentinas ou camisas de refrigeração para o controle rígido de temperatura que, dependendo do tipo de cerveja, fica em torno de 10 a 15°C para cervejas tipo Lager, e de 17 a 22°C para Ales (Kunze 1997). Após todo o O<sub>2</sub> ser consumido as leveduras começam o processo de conversão dos açúcares em CO<sub>2</sub>, etanol e compostos aromáticos. O processo de fermentação dura de 2 a 10 dias, dependendo do estilo de cerveja a ser produzido. Ao final da fermentação as leveduras floculam e podem ser retiradas, tratadas e armazenadas para novas bateladas de fermentação, enquanto conseguirem fermentar com eficiência o mosto cervejeiro. Este processo é muito comum em cervejarias (Santos et al. 2005).

Vários subprodutos são gerados durante a fermentação, como: álcoois superiores e ésteres, que contribuem para positivamente nas características sensoriais do produto final; e também aldeídos, compostos de enxofre e diacetil que por outro lado são considerados defeito de fabricação. O controle da temperatura e cuidados com a sanitização da área de processamento e com os tanques são importantes nesta etapa, onde o risco de contaminação microbiológica é maior. A temperatura ideal da fermentação está relacionada

com a temperatura de atuação da cepa e também com o estilo de cerveja a ser produzida (White et al. 2010).

### **2.3.5 Maturação**

O mosto fermentado, também chamado de "cerveja verde", ainda possui na sua composição parte de material fermentescível e suspensão de leveduras, passa pela maturação, que é considerada uma fermentação complementar pois o microrganismo continua atuando, só que em velocidade reduzida devido à temperatura de acondicionamento e sua baixa contagem de células. Colóides que causam turvação se precipitam e são eliminados juntamente com substâncias que causam sabor desagradável. Esta etapa é realizada numa baixa faixa de temperatura (0 a 3°C) variando dentro de um período de 15 a 60 dias dependendo da cerveja que estiver sendo produzida. Uma Pilsen, por exemplo, pode permanecer de 15 a 20 dias nesta fase, dependendo da sua receita e do mestre cervejeiro que está produzindo. A maturação ajuda na clarificação da bebida e melhora o sabor. Ao final desta etapa temos a cerveja "madura" ou chope. Algumas cervejas não passam pelo processo de filtração nem pela pasteurização, e quando não passa por esta temos o famoso Chope, que possui sabor mais acentuado, ausência de conservantes, e devido a isso também possui vida útil menor (em torno de 60 dias sob refrigeração) (Aquarone et al. 1983; Santos et al. 2005).

### **2.3.6 Filtração**

Seu principal objetivo é a clarificação do líquido, que pode ser alcançada por sedimentação de gravidade, uso de agentes clarificantes, centrifugação e mais comumente a filtração. Essas técnicas podem ser utilizadas em conjunto ou individualmente (Venturini-Filho 2016).

A filtração é feita para que os complexos proteicos coloides sejam eliminados junto com possíveis contaminantes microbiológicos, inclusive as leveduras. Assim o líquido se torna mais límpido e brilhante. A cerveja maturada é bombeada através de uma membrana ou meio filtrante. Nesta fase a concentração é ajustada, podendo ser adicionada água para diluição, e os valores de CO<sub>2</sub> podem ser ajustados à quantidade desejada para o produto final (Fernandes 2012).

### 2.3.7 Envase e Pasteurização

Após filtrada a cerveja segue para a etapa de envasamento, que pode ser feita em latas, garrafas ou barris. O enchimento é realizado utilizando-se um sistema de contra-pressão com gás carbônico, para que assim seja evitada a formação de espumas e o oxigênio contido nas embalagens seja eliminado. Assim não há perigo de ocorrer oxidação e a contaminação microbiológica é mais difícil de acontecer. A estabilidade microbiológica é garantida com o processo de pasteurização ou através de filtração esterilizante (Fernandes 2012). Existem dois tipos de pasteurização, "*flash*" e "túnel". A primeira consiste em aquecer a cerveja, antes do envasamento, geralmente em um trocador de calor de placas, entre 68 e 72°C durante aproximadamente 50 segundos, e resfriá-la logo após (Kunze 1997). Na pasteurização "túnel" a cerveja já envasada passa por um túnel de esguichos de água a 60°C por aproximadamente 20 minutos (Briggs et al. 2004)

## 2.4 Contaminação microbiológica da cerveja

São inúmeras as fontes de contaminação microbiológica durante o processo cervejeiro, e podem ser divididas em:

- ✓ **Contaminação primária:** ocorre durante as etapas de produção. Para evitar esse tipo de contaminação é importante ter controle das matérias-primas e de seus fornecedores, já que sua carga de contaminantes microbianos pode ser alta, comprometendo todo o processo e pode produzir metabólitos indesejáveis no produto final (Fernandes 2012). Outra fonte deste tipo de contaminação são as próprias leveduras inoculadas para fermentação, que podem estar contaminadas por outros microrganismos, inclusive leveduras indesejáveis para o processo, denominadas leveduras selvagens. Para garantir que isso não aconteça, é feito um tratamento com ácidos (mais comumente ácido fosfórico 5%) para eliminar tais bactérias, e é realizada a renovação regular de cultivos puros para evitar a presença das leveduras selvagens (Fernandes 2012).

- ✓ **Contaminação secundária:** acontece nas fases de enchimento e pasteurização, e correspondem a mais de 50% dos casos de contaminação das cervejas pasteurizadas via pasteurização *flash*. Isso ocorre pois na pasteurização *flash* a bebida é pasteurizada antes de ser envasada, ao contrário da pasteurização "túnel". (Vaughan et al. 2005). São causadas por bactérias ácido lácticas, leveduras selvagens e principalmente anaeróbias estritas. A presença desta última é explicada por Back (1994), sendo favorecida pela presença de bactérias resistentes e adaptadas ao oxigênio, geralmente formadoras de biofilmes, no ambiente de processamento. O autor explica que essa contaminação acontece de forma sequencial, quando bactérias acéticas e/ou enterobactérias são veiculadas pelo ar e se aderem as superfícies iniciando a produção de biofilme. Esses microrganismos não são relatados como deteriorantes da cerveja, mas no momento que se organizam em biofilmes, produzem uma matriz de polissacarídeos que dão proteção e condições de proliferação para microrganismos deteriorantes (Back 1994).

#### 2.4.1 Bactérias Gram-Positivas

O principal grupo de bactérias gram-positivas que deterioram a cerveja são as bactérias ácido lácticas (BAL) dos gêneros *Lactobacillus* e *Pediococcus*. Aproximadamente 70% das contaminações da cerveja são causados por estas bactérias (Suzuki et al. 2006). Níveis de nitrogênio, aminoácidos, maltotriose e pH são fatores que afetam significativamente a resistência das cervejas a deterioração por BAL. A espécie mais frequentemente relatada na deterioração da cerveja é o *Lactobacillus brevis*, microrganismo importante na produção de vários alimentos fermentados. Heterofermentativo, sua faixa de crescimento é em torno de 30°C em pH entre 4 e 5, e sua capacidade de fermentar dextrinas e amido causa superatenuação (Sakamoto and Konings 2003; Vaughan et al. 2005).

Já o gênero *Pediococcus* é homofermentativo e provoca o aumento da turbidez, da acidez e forma sabores e odores desagradáveis (Hough et al. 1982). *P. damnosus* ou *P. cerevisiae* é responsável por 90% dos casos de deterioração da cerveja por microrganismos desse gênero. Elas produzem

exopolissacarídeos tornando a bebida viscosa e gelatinosa, e podem se aderir as leveduras, induzindo a sedimentação prematura do fermento, causando retardamento do processo fermentativo (Priest 1996; Back 2005).

#### 2.4.2 Bactérias Gram-Negativas

Entre as espécies de gram-negativos que deterioram a cerveja os mais importantes são os gêneros *Pectinatus*, *Megasphaera*, *Zymomonas* e alguns membros da família *Enterobacteriaceae* (Briggs et al. 2004; Sakamoto and Konings 2003). São anaeróbios estritos e os dois primeiros são os mais prejudiciais para a indústria cervejeira, embora sua ocorrência seja pouco frequente (Iijima et al. 2007). O aumento da detecção de contaminações por anaeróbios é devido ao melhoramento das técnicas de enchimento, que reduzem o oxigênio no produto final, e também ao aumento da produção de cervejas com baixo teor de etanol e de lúpulo (Jespersen and Jakobsen 1996).

Os microrganismos do gênero *Pectinatus* (principalmente as espécies *P. cerevisiiphilus* e *P. frisingensis*) são responsáveis por cerca de 20 a 30% das contaminações na bebida pronta, principalmente naquelas que não passam pela pasteurização. Sua temperatura ótima de crescimento é em torno de 32°C, mas conseguem se multiplicar dentro da faixa de 15 a 40°C em condições anaeróbicas, e pH de 4,5 (Vaughan et al. 2005). Sua produção de compostos orgânicos, ácidos graxos, sulfeto de hidrogênio e metil mercaptano, entre outras substâncias durante a multiplicação, são responsáveis por aumentar a turbidez e conferirem cheiro de "ovo podre". No gênero das *Megasphaera*, apenas a espécie *M. cerevisiae* é conhecida como deteriorante da cerveja, sendo responsáveis por 7% das contaminações cervejeiras por esta bactéria (Sakamoto and Konings 2003). A temperatura ótima de crescimento é 28°C, podendo ocorrer de 15 a 37°C, em valores de pH acima de 4,1 e de etanol abaixo de 2,8% v/v, apesar de já ter sido relatado sua detecção em cervejas com etanol superior a 5,5% v/v (Vaughan et al. 2005). Assim como o *Pectinatus*, sua produção de sulfeto de hidrogênio causa odor fecal, além de causar elevada acidez na bebida como consequência da alta produção de ácido burítico e outros ácidos como acético, valérico, isovalérico e capríco (Sakamoto and Konings 2003).

### 2.4.3 Leveduras selvagens

Levedura selvagem é aquela que está presente no processo sem ser a linhagem utilizada para fermentação. Geralmente são do gênero *Saccharomyces*, considerada a mais prejudicial, mas também podem ser dos gêneros *Brettanomyces*, *Debaryomyces*, *Torulopsis*, *Dekkera*, *Candida* ou *Pichia*. Elas causam turvação, formação de película na superfície da cerveja, fermentação com desvio na atenuação e formação de compostos sulfurosos, fenólicos e diacetílicos, que por sua vez geram aromas desagradáveis (Sakamoto and Konings 2003; Carvalho et al. 2006).

Algumas espécies de leveduras possuem o chamado "fator *killer*" (*Killer yeasts*), pois secretam polipeptídeos tóxicos para outras estirpes de leveduras. A própria *Saccharomyces cerevisiae* é a principal produtora de tais toxinas, e suas características morfológicas as diferem das leveduras cervejeiras, pois produzem células menores e alongadas, apresentando floculação inconstante. As leveduras com "fator *killer*" contaminam o processo de fermentação, eliminando e substituindo as leveduras cervejeiras, que geralmente são sensíveis a baixas concentrações das *killer yeasts* (0,01%) (Vaughan et al. 2005).

### 2.4.4 Microrganismos esporulados

Já foi comprovado que os complementos da cerveja, a água, a cevada e o malte, podem apresentar contaminação por esporos bacterianos devido a sua considerável presença em diversos ambientes. Alguns ingredientes da bebida, como por exemplo xaropes, chocolate e caramelo, podem carrear uma microbiota contendo bactérias esporuladas, devido a sua fonte ou processamento, assim como a água utilizada nas instalações industriais. Para evitar esse tipo de contaminação, deve-se atentar ao tratamento da água da indústria e aos programas de limpeza e sanitização (Munford et al. 2017).

Pertencente à família dos Bacilaceae, os *Bacillus* podem ser divididos em inúmeras espécies. Sua morfologia consiste em bastonetes de tamanhos variados, são gram-positivos, podem ser aeróbios ou anaeróbios, geralmente possuem motilidade, algumas espécies são capsuladas (*B. anthracis*, *B. licheniformis*, *B. megaterium* e *B. subtilis*), geralmente catalase positivos e

apresentam resultados variáveis ao teste de oxidase. Suas espécies iniciam esporulação logo que as condições do meio tornam-se desfavoráveis para sua sobrevivência (Gomes 2013). As espécies patogênicas para o homem são *B. cereus* e *B. anthracis*, sendo que a primeira causa toxinfecção no homem e foi encontrada na maioria das cervejas analisadas por Munford et al. (2017). Além dessas duas espécies, *B. subtilis* e *B. licheniformis* também já foram apontadas como responsáveis por infecções oculares, e por alguns casos raros de infecções diversas. O *B. licheniformis* está relacionado a casos de toxinfecções alimentares após a ingestão de carne cozida ou vegetal, contendo mais de  $10^6$  bactérias/g (Gomes 2013). *B. megaterium* foi descrito como causador de deterioração ácida em alimentos (Silva and Gibbs 2004).

Foi em 1991 que alguns gêneros de *Bacillus* foram reclassificados e classificados em outros grupos filogenéticos, sendo estes, *Alicyclobacillus*, *Brevibacillus*, *Paenibacillus*, *Lysinibacillus*, já relatados como presentes em algumas cervejas, todos formadores de esporos (Gomes 2013). Os *Alicyclobacillus* foram isolados pela primeira vez em 1982 de suco de fruta pasteurizado, sendo introduzido inicialmente no gênero *Bacillus*, mas suas características ácido e termoresistentes geraram a necessidade de nova classificação anos mais tarde. São bactérias capazes de resistir a processos de pasteurização, e causam *off-flavours* em sucos de frutas pasteurizados (guaiacol e halofenóis) (Chang and Kang 2008). Os *Lysinibacillus*, antigamente conhecidos como *Bacillus sphaericus*, possuem crescimento ótimo a 30°C, podendo crescer de 10 a 50°C, em pH 7,0, são catalase positiva, oxidase negativa e halotolerantes. Os *Brevibacillus* são gram-positivos aeróbios, comumente encontrados no solo, no ar e na água, não são causadores de patogenicidades, mas podem acometer pacientes imunodeprimidos (Camargo et al. 2016).

*Bacillus* e *Paenibacillus* são microrganismos responsáveis por casos de intoxicações alimentares, são capazes de resistir a diferentes temperaturas, e são facilmente carregados em alimentos à base de grãos, devido à sua ocorrência natural no solo, ar e água (Pirttijärvi et al. 2000; Granum 2001). São produtores de enzimas extracelulares que degradam polissacarídeos como

quitina, celulose e amido e ainda produzem substâncias antimicrobianas e antifúngicas. Os *Paenibacillus* também pertencem à família Bacillaceae, sendo aeróbios ou anaeróbios facultativos, e junto com os *Bacillus* são os mais encontrados em alimentos armazenados sob refrigeração (10°C) (Girardin et al. 2002). As enzimas excretadas por esta espécie podem causar a deterioração da cerveja. Por serem bactérias encontradas abundantemente em solos e plantas, podemos atribuir a ocorrência delas na cervejas devido a matéria-prima utilizada.

#### 2.4.5 Resistência ao lúpulo

A resistência ao lúpulo pode ser causada por contato prolongado das bactérias aos compostos do lúpulo, resultando assim em uma adaptação aos seus compostos antibacterianos. O lúpulo contém iso-alfa-ácidos e suas formas isomerizadas que correspondem aos compostos que garantem a estabilidade microbiológica da cerveja (Caballero et al. 2009). Estes ácidos atuam como protonóforos, transportando prótons em bicamadas lipídicas, o que altera o pH e diminui a força motora do próton (PMF), diminuindo a absorção de nutriente e levando a célula a morte (Sakamoto and Konings 2003). As bactérias resistentes ao lúpulo então necessitam de mecanismos específicos para manter o pH interno e sua PMF funcionando corretamente (Kashket 1987). Os responsáveis para tal são os genes *horA* e *horC*, que codificam os transportadores que bombeiam os compostos tóxicos para fora da célula (Suzuki et al. 2005). Esses genes são encontrados principalmente em bactérias ácido-láticas (Sakamoto and Konings 2003; Suzuki et al. 2005), mas já foram encontrados em algumas espécies de *Bacillus* e *Staphylococcus* isolados de cerveja artesanal. A descoberta de *horA* é de grande importância para a indústria cervejeira, uma vez que foi mostrado que a presença desse gene é altamente correlacionada com a capacidade de *Lactobacillus* e *Pediococcus* conseguirem se multiplicar na presença do lúpulo (Haakensen and Ziola 2008). *Bacillus cereus*, *B. pumilus*, *B. thuringiensis*, *B. megaterium*, *Paenibacillus alginolyticus*, *P. validus*, *P. ehimensis*, *P. naphthalenovorans*, *P. polymyxa* e *Brevibacillus invocatus* foram as espécies isoladas de diferentes cervejas por Munford et al. (2017), que apresentavam ou o gene *horA* ou *horC*, sendo que

*B. thuringiensis* isolados de cervejas sem álcool apresentou os dois genes.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar o comportamento de bactérias esporuladas ao longo de etapas do processamento da cerveja.

#### 3.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar o comportamento de cepas de *Bacillus thuringiensis* nas principais etapas do processo de fabricação da cerveja;
- ✓ Avaliar o comportamento dos *Bacillus thuringiensis* em cervejas com diferentes valores de pH;
- ✓ Avaliar o comportamento dos *Bacillus thuringiensis* em cervejas com diferentes tipos e quantidades de lúpulos (tipos de cerveja).

### 4 MATERIAL E MÉTODOS

#### 4.1 Microrganismos e preparo das suspensões

Os microrganismos utilizados para realização deste trabalho foram escolhidos com base na presença de genes de resistência ao lúpulo. As cepas foram isoladas por Munford et al. (2017) de cervejas comercializadas na região de Campinas, SP. Diferentes isolados de *Bacillus thuringiensis* apresentaram diferentes perfis no que concerne à presença de gene de resistência ao lúpulo: portadores do gene *horA* (C:002), *horC* (C:118), e de ambos (C:206), e por isso foram escolhidas para o estudo.

As cepas conservadas a -80°C foram reativadas em caldo nutriente (Neogen, Michigan, EUA) incubados a 30°C / 24 - 48h. Para obtenção de esporos, o meio de cultura utilizado foi composto por ágar nutriente (Neogen, Michigan, EUA) adicionado de 1ml/1,5 litros de solução a 5ppm de MnSO<sub>4</sub>. Além disso, uma parte da água destilada foi substituída por 25% de cerveja

Pilsen desaerada (NA + 25% de cerveja), pois verificou-se que estes microrganismos necessitavam de cerveja para crescimento (Munford et al. 2017). O meio foi distribuído em garrafas de Roux e autoclavado a 121°C / 15 minutos. Após, um total de 2 ml das culturas reativadas foram inoculados em cada garrafa de Roux, seguindo-se incubação a 30°C / 30 dias. A partir do 10º dia de incubação foram feitas lâminas de coloração com verde malaquita (Wirtz-Conklin) em dias alternados para acompanhamento do processo de esporulação. No trigésimo dia após a incubação, foi feita a lavagem dos esporos (Jones and Pflug 1981), adicionando-se 10 ml de água estéril em cada garrafa de Roux. Com a ajuda de uma bastão de vidro foi retirada toda a massa de crescimento das bactérias. O líquido resultante foi filtrado em gaze estéril e submetido a centrifugação de 1500×g por 20 minutos a 4°C. A lavagem foi repetida três vezes e o pelete resultante foi diluído parcialmente em água destilada estéril e transferido para tubos Falcon e armazenados a -20°C.

## **4.2 Avaliação do comportamento de cepas de *Bacillus thuringiensis* ao longo do processo de fabricação de cerveja**

Cerveja do tipo Pilsen foi escolhido para esta etapa do trabalho, pois este é o estilo de cerveja mais fabricado e consumido mundialmente. O comportamento de *B. thuringiensis* foi avaliado durante as principais etapas da produção separadamente: brassagem, fermentação e maturação.

### **4.2.1 Brassagem**

Para estudo do comportamento de *B. thuringiensis* durante a etapa de brassagem, foram utilizados 4 erlenmeyers, sendo um para tratamento controle e os outros três (um por cepa) contendo 10<sup>3</sup> esporos/ml da suspensão de esporos inoculados em 500 ml de mosto. Foi utilizado 125g de malte pilsen (Arte Brew) para cada erlenmeyer com 500 ml de água estéril para o preparo do mosto e feita a contagem inicial (N0) por plaqueamento em profundidade em NA + 25% de cerveja, seguindo-se incubação à 30°C por 48 horas. Os erlenmeyers com o mosto inoculado foram levados ao banho maria, onde foram retiradas alíquotas para as contagens seguintes quando a temperatura do mosto atingiu as principais rampas de temperatura da brassagem: 50°C

(N1), 64°C (N2), 72°C (N3) e 78°C (N4). Para essas contagens foi necessário choque térmico (80°C / 30 minutos) para ativação dos esporos. O tempo necessário do mosto para a ativação das enzimas sob essas temperaturas é 15, 20, 20 e 10 minutos para 50, 64, 72 e 78°C respectivamente.

Após os 10 minutos / 78°C previamente estabelecidos para esta temperatura na rampa de brassagem, os erlenmeyers foram submetidos a fervura utilizando-se placa de amianto e bico de Bunsen. Foi realizada a contagem por plaqueamento em profundidade com NA + 25% de cerveja dos esporos quando o mosto atingiu a fervura (96°C) (N5) e de 5 em 5 minutos pelos 60 minutos previamente estabelecidos (N6, N7, N8,...).

#### **4.2.2 Fermentação**

O processo de brassagem foi repetido, sem a inoculação de *B. thuringiensis*, em um erlenmeyer de 2 litros, e após fervura e resfriamento do mosto para 25°C inoculou-se o levedo US-05 (Fermentis, Lesaffre, France) em quantidade suficiente para fermentar o mosto (11,5g para cada 20 – 30 litros). O mosto foi homogeneizado e dividido em 4 erlenmeyers de 500 ml, sendo inoculado  $10^3$  esporos/ml da suspensão de esporos de cada cepa em cada frasco, sendo um o tratamento controle (não inoculado). Foi feita a contagem inicial das células vegetativas e de esporos. Posteriormente os erlenmeyers foram incubados a 12°C / 10 dias, sendo a contagem de células vegetativas e de esporos feita de 2 em 2 dias (plaqueamento em profundidade em NA + 25% de cerveja), seguindo-se incubação à 30°C por 48 horas. Além das contagens de *B. thuringiensis* também foi feita a contagem de células vivas e mortas das leveduras, usando-se a técnica da câmara de Neubauer.

#### **4.2.3 Maturação**

Para simulação da maturação, a brassagem e a fermentação foram repetidas sem inóculo. Um total de 4 erlenmeyers de 500 ml foram também usados nesta etapa e ao final dos 10 dias de fermentação houve inoculação de  $10^3$  esporos/ml da suspensão de esporos de cada cepa, sendo um dos

erlenmeyers o tratamento controle (não inoculado). A maturação foi conduzida incubando-se os erlenmeyers a 3°C / 20 dias, sendo a contagem de células vegetativas e de esporos feita antes do experimento (N0) e de 5 em 5 dias, através da técnica de plaqueamento em profundidade em NA + 25% de cerveja, seguindo-se incubação à 30°C por 48 horas.

### **4.3 Avaliação do comportamento de *Bacillus thuringiensis* em cervejas com diferentes pHs**

O pH da cerveja pronta para o consumo é normalmente entre 4,0 a 4,2, sendo responsável pela qualidade microbiológica e sensorial. Algumas cervejas possuem por natureza o pH mais elevado, como é o caso das artesanais no Brasil. Este valor de pH inibe o crescimento de microrganismos, mas algumas bactérias como as bactérias lácticas conseguem se multiplicar. Por outro lado, em um estudo foi reportada a deterioração de cerveja que possuía pH ~6,0 por bactérias esporuladas (Haakensen and Ziola 2008). Os valores de pH estudados foram 4,0, 4,6, 5,0 e 5,7, pois existem relatos de deterioração por bactérias esporuladas em cerveja com pH até 5,7 (Haakensen and Ziola 2008).

Para estes experimentos foram preparados erlenmeyers de cerveja com pHs alterados para 4,6, 5,0, e 5,7, além do controle (cerveja sem pH alterado; 4,0). Cada um destes 4 tratamentos foram distribuídos em 4 tubos de 5 ml, onde um não foi inoculado, e os outros foram inoculados com as cepas C:002, C:118 e C:206, separada e respectivamente, em uma quantidade de  $10^6$  esporo/ml de cerveja. Foi simulado o processo de pasteurização da cerveja em banho-maria colocando-se os tubos à temperatura de 60°C por 20 minutos, com o objetivo de simular a pasteurização realizada na indústria. Após, foi feita a contagem inicial de esporos (choque térmico para ativação de esporos a 80°C / 30 minutos em banho-maria seguido de banho de gelo) por plaqueamento em profundidade com NA + 25% de cerveja. Os tubos foram incubados a 37°C / 7 dias e posteriormente foi feita a contagem de esporos (plaqueamento em profundidade em NA + 25% de cerveja, seguindo-se incubação à 30°C por 48 horas).

#### **4.4 Avaliação do comportamento dos *Bacillus thuringiensis* em cervejas com diferentes lúpulos**

A quantidade média utilizada de lúpulo, para todos os tipos de cerveja, é entre 30 e 60g para cada 20 litros de mosto. Para estes experimentos foram testadas as quantidades de 30, 45 e 60g, com e sem tratamento de fervura, para avaliação da atividade inibidora microbiana do lúpulo. Foram preparados dois tubos falcon com 15 ml de água estéril para cada quantidade de lúpulo: 30, 45 e 60 / g / 20 litros, sendo que um de cada foi submetido a fervura por 60 minutos. Desta forma, foram obtidos então 6 tubos para cada um dos três lúpulos selecionados: 2 tubos com 30g, 2 com 45g e 2 com 60g/20L (um com e outro com tratamento de fervura) do lúpulo Saaz (Arte Brew, 3,7% de  $\alpha$ -ácidos); e da mesma forma para os lúpulos Cascade (Arte Brew, 6,6% de  $\alpha$ -ácidos) e Magnum (Arte Brew, 14,1% de  $\alpha$ -ácidos). Então houve a inoculação em profundidade de  $10^6$  esporos/ml da suspensão de esporos de cada cepa em placas NA + 25% de cerveja. Um total de 3 placas de cada cepa foram preparadas, sendo que em cada um volume de 15 ml de meio de cultura. Posteriormente, em cada placa foram inseridos 6 "plugs" (5,38mm de diâmetro) espaçados igualmente na placa, seguindo-se inóculo de 50 $\mu$ l de cada tubo falcon contendo os tratamentos com lúpulo. As placas foram então incubadas a 37°C / 24 horas, seguindo-se medição com paquímetro dos halos de inibição que se formaram ao redor de cada plug.

#### **4.5 Análises estatísticas**

O comportamento das cepas de *B. thuringiensis* em todos os experimentos descritos foram verificados quanto a diferenças estatísticas significativas ( $p \leq 0,05$ ) empregando a análise de variância de fator único (ANOVA) seguida do teste de Scott-Knott. As análises estatísticas foram realizadas no software SISVAR versão 5.6 (Ferreira 2014).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Avaliação do comportamento de cepas de *Bacillus thuringiensis* ao longo do processo de fabricação de cerveja

#### 5.1.1 Brassagem

Na tabela 1 são apresentados resultados de contagens das três diferentes cepas de *B. thuringiensis* ao longo do processo de brassagem. Pode-se observar na tabela 1 que de uma contagem inicial entre  $10^5$ - $10^6$  UFC/ml, contagens de  $\sim 10^2$  UFC/ml foram obtidas após 5 min de brassagem para a cepa 206. Após este tempo, a contagem foi menor do que o limite de quantificação do método ( $10^1$  UFC/ml). Este fato indica que a cepa 206 é mais sensível ao processo térmico aplicado durante a brassagem, já que  $\sim 10^1$  UFC/ml da cepa 002 foram obtidas após 9 min de brassagem ( $p < 0,05$ )

No presente estudo, a rampa de brassagem utilizada considerou 4 etapas com as seguintes temperaturas: 50°C (N1), 64°C (N2), 72°C (N3) e 78°C (N4). O tempo que o mosto permaneceu em cada condição e que seria necessário para ativar as enzimas seriam 15, 20, 20 e 10 minutos para 50, 64, 72 e 78°C, respectivamente. Sabe-se que bactérias esporuladas podem resistir à temperaturas muito maiores que 78°C (Wells-Bennik et al, 2016), porém normalmente os tempos de processo empregados são mais reduzidos. No presente estudo, o tempo total de brassagem estudado atingiu 105 minutos, o que se constitui uma condição bastante drástica até para bactérias esporuladas. Desta forma, justifica-se a redução da contagem das três cepas de *B. Thuringiensis* estudadas (Tabela 1). Apesar disso, foi possível observar que dentre as três cepas avaliadas, a cepa 002 parece apresentar maior resistência térmica, já que foi possível enumerá-la até com 9 minutos de brassagem. Por outro lado, se observou mais que 5 reduções decimais da cepa 206 após 6 minutos de brasagem, evidenciando assim uma carga contaminante anterior à inoculação. Considerando-se que o processo de brassagem pode durar mais que 60 minutos e de acordo com os resultados da tabela 1, tem-se que a presença de bactérias esporuladas no produto final (cerveja) pode também ser explicada pelo fato destes microrganismos poderem ser originários de outras fontes de contaminação, tais como o próprio processo

de fabricação (biofilmes, por exemplo). Todavia, estes fatos precisam ser verificados em trabalhos posteriores, além do fato da necessidade de serem gerados dados sobre a cinética de inativação de bactérias esporuladas nas diferentes temperaturas e tipos de mostos preparados para a produção de diferentes tipos de cerveja. Também faltam dados relativos à ocorrência e contagem de bactérias esporuladas nas principais matérias-primas empregadas para fabricação de cervejas. Apesar de se saber que, de um modo geral, as matérias-primas podem ser importantes fontes de contaminação por bactérias esporuladas (Pereira and Sant'Ana, 2018), conhecer a ocorrência e concentração destes microrganismos nos ingredientes será fundamental para cálculos e estimativas adequadas do impacto do processo.

**Tabela 1:** Contagens de *B. thuringiensis* (cepas 002, 118 e 206) ao longo do processo de brassagem<sup>1</sup>.

Etapa	Tempo	<i>B. thuringiensis</i>	<i>B. thuringiensis</i>	<i>B. thuringiensis</i>
		002 log UFC/mL	118 log UFC/mL	206 log UFC/ml
Brassagem	N0	5,32±0,088 Aa	6,26±0,166 Ba	5,37±0,103 Aa
	N1	4,95±0,069 Ab	6,63±0,022 Bb	5,08±0,177 Ab
	N2	4,66±0,260 Ab	6,90±0,066 Cb	5,11±0,00 Bb
	N3	6,18±0,041 Bc	6,40±0,049 Ba	4,60±0,00 Ac
	N4	6,51±0,047 Bd	6,75±0,033 Bb	5,54±0,096 Aa
Fervura	0	2,65±0,069 Be	5,69±0,087 Cc	2,00±0,00 Ad
	5	2,77±0,103 Be	3,08±0,177 Bd	<LQ
	10	1,83±0,181 Cf	0,50±0,707 Be	<LQ
	15	1,54±0,088 Bg	<LQ	<LQ
	20	1,30±0,426 Bg	<LQ	<LQ
	25	<LQ	<LQ	<LQ
	30	<LQ	<LQ	<LQ

<sup>1</sup>Letras minúsculas diferentes na mesma coluna para o mesmo parâmetro indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste de Scott-Knott em diferente tempo <sup>2</sup>Diferentes letras maiúsculas na mesma linha indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste de Scott-Knott para diferentes cepas.

<LQ – Menor do que o limite de quantificação

\*N0 = contagem inicial, N1 = mosto atinge 50°C, N2 = mosto atinge 64°C, N3 = mosto atinge 72°C, N4 = mosto atinge 78°C.

### 5.1.2 Fermentação

A fermentação é a etapa crucial do processo de fabricação da cerveja. Ela é iniciada após a adição das leveduras cervejeiras no mosto aerado, sendo conduzida em tanques de aço inox para evitar contaminação e perda de CO<sub>2</sub>. Os tanques possuem um sistema de serpentinas ou camisas de refrigeração para o controle rígido de temperatura que, dependendo do tipo de cerveja, fica em torno de 10 a 15°C para cervejas tipo Lager, e de 17 a 22°C para Ales (Kunze 1997). Após todo o O<sub>2</sub> ser consumido, as leveduras começam o processo de conversão dos açúcares em CO<sub>2</sub>, etanol e compostos aromáticos. O processo de fermentação dura de 2 a 10 dias, dependendo do estilo de cerveja a ser produzido sendo produzidos álcoois superiores e ésteres, que contribuem para positivamente nas características organolépticas do produto final, além de outras alterações que contribuem para uma maior estabilidade microbiológica do produto, tais como produção de CO<sub>2</sub>, liberação de álcool, redução da quantidade de carboidratos e redução do pH do substrato, dentre outras (White et al. 2010). Ao final da fermentação as leveduras floculam e podem ser retiradas, tratadas e armazenadas para novas bateladas de fermentação (Santos et al. 2005). Apesar de todo o controle de temperatura e cuidados com a sanitização, os riscos de contaminação microbiológica são maiores justamente nesta etapa (White et al. 2010).

Na tabela 2 são apresentados os dados de contagem de células vegetativas (V) e esporos (E) de cada cepa ao longo do processo de fermentação. Pode-se observar que a contagem de células vegetativas da cepa 002 variou de 2,7 a 0,5 log UFC / ml até 10 dias de fermentação. Já para a cepa 118, a contagem de células vegetativas variou de 2,74 a 1,0 log UFC / ml, porém após 8 dias de fermentação. Já para a cepa 206, a contagem de células vegetativas variou de 2,72 a 1,15 log UFC / ml ( $p < 0,05$ ) no oitavo dia de fermentação. Para as cepas 118 e 206 não foi possível enumerar células vegetativas no décimo dia de fermentação (Tabela 2A). Além disso, após 10 dias de processo de fermentação, não foi possível recuperar células vegetativas de nenhuma das três cepas de *B. thuringiensis* estudadas (Tabela 2A). No que concerne a contagem de esporos, pode-se observar que ela variou de 3,22 a 2,6 log UFC / ml para a cepa 002 ( $p > 0,05$ ), de 2,63 a 0,74 log UFC /

ml para a cepa 118 e de 3,71 a 2,27 log UFC / ml para a cepa 206 ( $p \geq 0,05$ ). Neste caso, foi possível ainda fazer a contagem de esporos no décimo dia de fermentação.

Na tabela 2 também são apresentados os resultados da análise estatística para contagens de esporos e células vegetativas das três cepas de *B. thuringiensis* estudadas. Pode-se observar que não houve diferença significativa entre contagem de células vegetativas e esporos das três cepas nos tempos 0, 2, 4, 6 e 8 ( $p > 0,05$ ). Todavia, após 10 dias de fermentação observou-se diferença significativa entre a contagem de células vegetativas e esporos para cepa 002, enquanto que para as cepas 118 e 206 não foi possível recuperar vegetativas no décimo dia de fermentação.

Apesar das alterações que são observadas durante o processo de fermentação ser fundamentais para a estabilidade microbiológica da cerveja, sabe-se que tais condições não necessariamente levarão uma inativação das bactérias esporuladas. Sabe-se que a maioria das bactérias é sensível ao álcool, e este composto, pode particularmente, limitar a capacidade de germinar e se multiplicar destes microrganismos. Todavia, ainda faltam dados sistemáticos sobre o impacto do álcool produzido durante o processo de fermentação para fabricação da cerveja na injúria dos esporos e na sua capacidade de germinar posteriormente. Além disso, faltam dados sobre os mecanismos de resistência a prolongada exposição ao álcool de esporos bacterianos. Tais informações serão fundamentais no sentido de permitir avaliar o potencial de deterioração ou de defeitos de qualidade na cerveja (produto final). De qualquer forma, mesmo que tais microrganismos não venham a causar preocupação no que se refere à estabilidade microbiológica do produto final, as bactérias esporuladas podem indicar a utilização de ingredientes de qualidade microbiológica duvidosa e/ou procedimentos de limpeza e sanificação ineficientes.

**Tabela 2:** Teste Scott-Knott para diferentes tempos e cepas (A) e diferença entre células vegetativas e esporos (B) durante fermentação

**A**

Tempo (dias) / esporos ou células vegetativas	<i>B. thuringiensis</i> 002 log UFC/mL	<i>B. thuringiensis</i> 118 log UFC/mL	<i>B. thuringiensis</i> 206 log UFC/mL
0 / esporos	3,22 ± 0,06 Ab	2,63 ± 0,21 Aa	3,71 ± 0,18 Ab
0 / vegetativas	2,7 ± 0,12 Ab	2,74 ± 0,06 Ab	2,72 ± 0,17 Ab
2 / esporos	0,95 ± 1,35 Aa	1,9 ± 0,04 Aa	1,84 ± 0,34 Aa
2 / vegetativas	1,24 ± 0,34 Aa	0,74 ± 0,34 Aa	1,54 ± 0,34 Ab
4 / esporos	1,65 ± 0,5 Aa	1,35 ± 0,49 Aa	1,8 ± 0,28 Aa
4 / vegetativas	1,93 ± 0,04 Ab	2,2 ± 0,18 Ab	2,1 ± 0,02 Ab
6 / esporos	1,65 ± 0,25 Aa	1,5 ± 0 Aa	0,74 ± 1,04 Aa
6 / vegetativas	0,74 ± 1,04 Aa	1,4 ± 0,12 Aa	0,65 ± 0,92 Aa
8 / esporos	1,23 ± 1,74 Aa	0,65 ± 0,92 Aa	0,74 ± 1,04 Aa
8 / vegetativas	1,3 ± 0 Aa	1,0 ± 0 Aa	1,15 ± 0,21 Aa
10 / esporos	2,6 ± 0,13 Aa	0,74 ± 1,04 a	2,27 ± 1,13 a
10 / vegetativas	0,5 ± 0,71 Bb	<LQ	<LQ

<sup>1</sup>Letras minúsculas diferentes na mesma coluna para o mesmo parâmetro indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste de Scott-Knott em diferente tempo. <sup>2</sup>Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna para o mesmo parâmetro indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste de Scott-Knott entre esporos e células vegetativas.

<LQ – Menor do que o limite de quantificação

### 5.1.3 Maturação

Na tabela 3 são mostradas as contagens de células vegetativas (V) e esporos (E) de cada cepa ao longo da maturação da cerveja. No que concerne à contagem de células vegetativas, pode-se observar que não houve um aumento significativo ( $p \geq 0,05$ ) na contagem das três cepas ao longo dos 20 dias de maturação. Por exemplo, para a cepa 002, a contagem de células vegetativas variou de 2,65 a 3,05 log UFC / ml após 20 dias de maturação ( $p > 0,05$ ). Para a cepa 118, a contagem se manteve estável em  $\sim 3$  log UFC / ml ao longo destes 20 dias de processo, enquanto que para a cepa 206 houve variação não significativa ( $p \geq 0,05$ ) de 2,15 para 3,0 log UFC / ml (Tabela 3). Com relação a contagem de esporos, observou-se uma redução significativa ao longo do processo de maturação para as três cepas estudada ( $p < 0,05$ ) com

uma variação entre 1-2 ciclos log UFC / ml de contagem entre o tempo zero e 20 dias de maturação.

Não houve diferença significativa na contagem de células vegetativas e esporos nos tempos 0, 10, 15 e 20 ( $p \geq 0,05$ ), porém observou-se diferença significativa ( $p < 0,05$ ) apenas após 5 dias de processo de maturação para a cepa 002. Não houve diferença significativa entre a contagem de células vegetativas e esporos da cepa 118 em nenhum tempo ao longo do processo de maturação. Já para a cepa 206, não houve diferença significativa entre a contagem de células vegetativas e esporos nos tempos 5, 10, 15 e 20 dias ( $p \geq 0,05$ ), porém observou-se diferença significativa ( $p < 0,05$ ) apenas no tempo zero de maturação (0) (Tabela 3). Os dados obtidos referentes à esta etapa, corroboram o fato de que se estiverem presentes, devido à alta contaminação dos ingredientes ou por falhas de limpeza e sanificação, as bactérias esporuladas estarão presentes no produto final. Neste caso, a possibilidade de causarem deterioração estará intimamente ligada também ao pH do produto final. Em um recente estudo, sugeriu-se que o pH pode ser o principal fator que governa a capacidade de bactérias esporuladas portadores de genes de resistência ao lúpulo de deteriorarem a cerveja (Munford et al 2017).

**Tabela 3:** Contagens de células vegetativas e esporos de três diferentes cepas de *B. thuringiensis* durante maturação da cerveja.

Tempo (dias) / esporos ou células vegetativas	<i>B.</i> <i>thuringiensis</i> 002 log UFC/mL	<i>B.</i> <i>thuringiensis</i> 118 log UFC/mL	<i>B.</i> <i>thuringiensis</i> 206 log UFC/mL
0 esporos	3,7 ± 0,1 Aa	4,11 ± 0,02 Aa	4,35 ± 0,1 Aa
0 vegetativas	2,65 ± 0,07 Aa	3,0 ± 0,1 Aa	2,15 ± 0,21 Ba
5 esporos	1,78 ± 0,43 Aa	3,04 ± 0,06 Aa	2,0 ± 0,74 Aa
5 vegetativas	3,33 ± 0,04 Ba	3,45 ± 0,04 Aa	3,3 ± 0,05 Aa
10 esporos	2,04 ± 0,2 Aa	2,13 ± 0,07 Aa	2,0 ± 0,4 Aa
10 vegetativas	3,48 ± 0,04 Aa	3,6 ± 0,04 Aa	3,2 ± 0,02 Aa
15 esporos	2,1 ± 0,14 Aa	2,23 ± 0,04 Aa	1,75 ± 0,21 Aa
15 vegetativas	2,94 ± 0,02 Aa	3,06 ± 0,02 Aa	2,9 ± 0,02 Aa

20 esporos	1,72 ± 0,2 Aa	2,08 ± 0,05 Aa	1,8 ± 0,14 Aa
20 vegetativas	3,05 ± 0,03 Aa	3,0 ± 0,03 Aa	3,0 ± 0,03 Aa

<sup>1</sup>Letras minúsculas diferentes na mesma coluna para o mesmo parâmetro indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste de Scott-Knott em diferente tempo. <sup>2</sup>Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna para o mesmo parâmetro indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste de Scott-Knott entre esporos e células vegetativas.

## 5.2 Avaliação do comportamento dos *Bacillus thuringiensis* em cervejas com diferentes pH

Na tabela 4 são apresentados os dados de contagem de UFC esporos / ml de cada cepa de *B. thuringiensis* inoculadas nas cervejas com diferentes pH após o inóculo (N0) e após 7 dias de estocagem (NF). A contagem da cepa 002 variou de 5,35 a 4,82 log UFC / ml, da cepa 118 variou de 5,03 a 3,97 log UFC / ml, e a contagem da 206 foi de 4,24 a 3,71 log UFC / ml, para os pH estudados. Os dados indicam que as cepas 002 e 206 não tiveram seu comportamento afetado pela variação do pH da cerveja, ou seja, não houve crescimento na cerveja à medida que o pH foi aumentado. Já no caso da cepa 118, observou-se que quando o pH foi de 5,7 houve diferença significativa entre o NO e NF ( $p < 0,05$ ). Este fato indica que esta cepa foi capaz de se multiplicar no produto quando o pH foi de 5,7 (Tabela 4). Estes dados indicam que enquanto as demais características da cerveja parecem colaborar para sua estabilidade microbiológica, o pH parece ser o fator crucial para definir se tais microrganismos terão capacidade ou não de deteriorar o produto final. De acordo com Haakensen et al (2008), bactérias esporuladas foram capazes de deteriorar cervejas com valores de pH aproximadamente  $>6,0$ . Tal fato chama a atenção para a necessidade de controle rígido do processo de fermentação e maturação, pois é durante estas etapas que ocorrem as principais mudanças que culminam com a redução do pH do produto. Também é muito importante que o pH da final da bebida seja mensurado e alterado para evitar valores  $>5,7$ , pois nestes casos, haverá maior probabilidade de bactérias esporuladas se multiplicarem no produto e causarem sua deterioração. Isto será particularmente crítico se tais cepas carregarem os genes de resistência ao

lúpulo conforme verificado em trabalhos anteriores (Haakensen et al, 2008; Munford et al 2017).

**Tabela 4:** Contagem de três cepas de *B. thuringiensis* em cervejas com valores de pH alterados – após a inoculação (N0) e após 7 dias (NF) de estocagem.

pH	<i>B. thuringiensis</i>	<i>B. thuringiensis</i>	<i>B. thuringiensis</i>
	002	118	206
	log UFC/mL	log UFC/mL	log UFC/mL
4,0 N0	5,04 ± 0,13 a	4,78 ± 0,06 a	4,24 ± 0,29 a
4,0 NF	5,35 ± 0,54 a	4,91 ± 0,01 a	3,96 ± 0,08 a
4,6 N0	4,82 ± 0,17 a	4,78 ± 0,2 a	4,24 ± 2,78 a
4,6 NF	4,86 ± 0,23 a	5 ± 0,08 a	4,14 ± 0,08 a
5,0 N0	4,94 ± 0,23 a	4,8 ± 0,01 a	3,97 ± 0,03 a
5,0 NF	5 ± 0,01 a	5,03 ± 0,02 a	4,06 ± 0,23 a
5,7 N0	5,04 ± 0,13 a	3,97 ± 0,17 b	3,71 ± 0,13 a
5,7 NF	5,22 ± 0,01 a	4,86 ± 0,2 a	3,91 ± 0,09 a

<sup>1</sup>Letras minúsculas diferentes na mesma coluna para o mesmo parâmetro indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste de Scott-Knott em diferente pH.

### 5.3 Avaliação do comportamento dos *Bacillus thuringiensis* em cervejas com diferentes lúpulos

É de grande importância determinar a capacidade antimicrobiana do lúpulo e também muito importante para sua seleção visando a fabricação de cervejas, além de se considerar aspectos sensoriais, como o amargor que confere às cervejas. Neste sentido, o efeito inibitório da quantidade de lúpulo (30, 45 e 65g / 20 litros de mosto), o tipo do lúpulo (A = Saaz, B = Cascade e C = Magnum) e da fervura por 60 minutos sobre as três cepas de *B. Thuringiensis* é ilustrado na Tabela 5. Os dados indicam que nenhuma das três cepas de *B. thuringiensis* foi inibida pelo lúpulo A (N/H), independente da quantidade usada para o preparo do mosto e da adoção de fervura ou não. Os dados indicam que a cepa 002 apresentou maior sensibilidade à quantidade e tipos de lúpulos estudados, enquanto a cepa 206 pareceu ser a mais resistente (Tabela 5). Além disso, a adoção da fervura afetou positivamente a atividade inibitória do lúpulo, indicando que o tratamento provavelmente leva a liberação

de compostos que apresentam atividade antimicrobiana. Estes dados corroboram o fato de que nem todos os lúpulos podem apresentar atividade antimicrobiana, e particularmente, contra bactérias esporuladas. O controle de qualidade do lúpulo deve também considerar sua atividade antimicrobiana e não somente aspectos sensoriais, tais como amargor.

**Tabela 5:** Halo de inibição (mm<sup>3</sup>) de três cepas de *B. Thuringiensis* por soluções contendo diferentes quantidades (30, 45, 60g / 20 L) e tipos de lúpulo (A, B, C). As soluções foram submetidas ou não à fervura (F) por 60 minutos.

Quantidade / Tipo de lúpulo / Fervura (F)	<i>B. thuringiensis</i> 002	<i>B. thuringiensis</i> 118	<i>B. thuringiensis</i> 206
	Halo/mm <sup>3</sup>	Halo/mm <sup>3</sup>	Halo/mm <sup>3</sup>
30g A	<LQ	<LQ	<LQ
30g A (F)	<LQ	<LQ	<LQ
30g B	18,02 ± 5,04 a	5,4 ± 7,6 a	4,05 ± 5,73 a
30g B (F)	23,0 ± 3,0 a	13,5 ± 1,65 b	13,0 ± 4,2 b
30g C	19,5 ± 2,4 a	14,62 ± 1,6 b	11,8 ± 1,1 b
30g C (F)	24,81 ± 6,45 a	17,73 ± 0,85 c	16,8 ± 0,25 c
45g A	<LQ	<LQ	<LQ
45g A (F)	<LQ	<LQ	<LQ
45g B	16,94 ± 1,22 a	12,63 ± 0,63 b	9,0 ± 2,5 b
45g B (F)	18,83 ± 0,11 a	9,62 ± 0,7 b	10,92 ± 3,51 b
45g C	19,7 ± 1,84 a	15,34 ± 7,4 c	14,01 ± 7,51 b
45g C (F)	21,1 ± 1,4 a	17,14 ± 0,95 c	18,83 ± 3,6 c
60g A	<LQ	<LQ	<LQ
60g A (F)	<LQ	<LQ	<LQ
60g B	16,94 ± 0,04 a	12,63 ± 10,6 b	9,0 ± 1,3 b
60g B (F)	16,8 ± 1,7 a	11,4 ± 4,55 b	10,22 ± 0,6 b
60g C	22,1 ± 0,65 a	20,0 ± 1,51 c	19,34 ± 2,21 c
60g C (F)	22,2 ± 2,23 a	17,71 ± 7,2 c	17,45 ± 4,73 c

<sup>1</sup>Letras minúsculas diferentes na mesma coluna para o mesmo parâmetro indicam diferenças significativas (p < 0,05) de acordo com o teste de Scott-Knott em diferente tipo e quantidade de lúpulo. <LQ – Menor do que o limite de quantificação

## 6 CONCLUSÕES

Apesar da cerveja ser uma bebida com certa estabilidade microbiológica, a ocorrência e o papel de microrganismos esporulados não tem sido reportados. Neste sentido, o presente estudo contribui com o entendimento do efeito de diferentes etapas do processamento de cerveja (brassagem, fermentação e maturação) sobre três cepas de bactérias esporuladas isoladas de cervejas. Os dados indicaram que as cepas apresentam comportamento diferenciado em função da operação unitária empregada, sendo a da brassagem a etapa mais drástica e que culminou no maior número de reduções decimais. Durante a fermentação e maturação, houve sobrevivência das bactérias esporuladas, sendo a maturação a menos deletéria a estes microrganismos. Além disso, também são reportados resultados inéditos sobre o efeito do pH da cerveja e do tipo e concentração de lúpulo/emprego ou não da fervura sobre a inibição de bactérias esporuladas. Os dados indicaram que a resistência das cepas ao pH e tipo/concentração de lúpulo variaram de cepa para cepa. Todavia, ficou evidente que em valores de  $\text{pH} > 5,7$  há possibilidade de algumas cepas se multiplicarem na cerveja. Com os dados obtidos ainda não foi possível verificar se haverá deterioração ou não em virtude da habilidade de algumas cepas de *B. thuringiensis* de se multiplicarem no produto. Além disso, o fato de que alguns lúpulos não apresentaram nenhuma atividade inibitória das cepas de *B. thuringiensis* avaliadas, sugere que sua atividade antimicrobiana devam ser considerados nos testes de controle de qualidade e como ferramenta importante para sua seleção, juntamente com seu poder de amargor. Em conjunto, os resultados deste estudo indicam que as bactérias esporuladas podem sobreviver às etapas de fabricação de cerveja e que, dependendo da composição do produto final, podem fornecer condições para a germinação e crescimento pós-germinativo de bactérias esporuladas, tais como *B. thuringiensis*. Mais estudos são necessários para elucidação do papel das bactérias esporuladas em cervejas: se podem ser classificadas como indicadores de práticas higiênicas ao longo do processamento do produto e de qualidade da matéria-prima ou se também poderão ser considerados agentes potencialmente capazes de deteriorar a cerveja.

## 7 REFERÊNCIAS

- AQUARONE, E., ALMEIDA LIMA, U., BORZANI, W. **Alimentos e bebidas produzidos por fermentação**, São Paulo: Edgard Blücher, 227 p., 1983.
- ALTHERTUM, F.; CRUZ, M.R.M.; VAIRO, M.L.R.; GAMBASSI, P.M. Efeito dos microrganismos contaminantes da fermentação alcoólica nas microdestilarias. **STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Campinas, v. 3, n. 1, p. 42-49, 1984.
- BACK, W. Secondary contamination in the filling area. **Brauwelt International**, v. 4, p. 326-328, 1994.
- BACK, W. **Color Atlas and Handbook of Beverage Microbiology**. Ed. Verlag Hans Carl: Nürnberg, Germany, p. 10-112, 2005.
- BAMFORTH, C.W. **Brewing and brewing research: past, present and future**. In *J. Sci. Food Agric.*, 80:1371–78, 2000.
- BAMFORTH, C. W. **Beer: tap into the art and science of brewing**. 2 nd ed. New York: Oxford University Press, 2003. 246p.
- BANNWART, P. **Malefícios e benefícios dos adjuntos**. Concerveja - Congresso Nacional de Cerveja Online, 2015.
- BASSO, R.F.; ALCARDE, A.R.; PORTUGAL, C.B. **Could non-Saccharomyces yeasts contribute on innovative brewing fermentations?** Food Research International, v. 86, p. 112-120, 2016.
- BOKULICH, N.A. E BAMFORTH, C.W. **The Microbiology of Malting and Brewing**. Microbiol. Mol. Biol. Rev. p.: 77(2):157, 2013.
- BRASIL. Decreto nº 2314, de 04 de setembro de 1997. Dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 05 de setembro de 1007. p. 19549, 1997.
- BRIGGS, D.E.; BOULTON, C.A.; BROOKES, PA.; STEVENS, R. **Brewing: Science and Practice**, Boca Raton: CRC Press, p. 606-649, 2004.
- CABALLERO, I.; AGUT, M., ARMENTIA, A.; BLANCO, C.A. Importance of tetrahydroiso-alpha-acids to the microbiological stability of beer. **Journal of AOAC International**, v. 92, n. 4, p. 1160-1164, 2009.

CAMARGO, D.; HAAB, C.; TISCHLER, B.; SCHWARZBLD, A.V.; PACHECO, L.S.; TRINDADE, P.A. Infecção cutânea por *Brevibacillus brevis* em paciente transplantado renal: Caso Clínico" In **Anais do 13º Congresso Gaúcho de Clínica Médica - Blucher Medical Proceedings**, v. 2, n. 7, p. 102-104, São Paulo, 2016.

CARLIN, F. Origin of bacterial spores contaminating foods. **Food Microbiology**, v. 28, n. 2, p. 177-182, 2011.

CARVALHO, G.B.M.; BENTO, C.V., SILVA, J.B.A. **Elementos biotecnológicos fundamentais no processo cervejeiro: 1ª parte – as leveduras**. Rev. Analytica, v. 25, p. 36-42, 2006.

CHANG, S.; KANG, D. *Alicyclobacillus* spp. in the Fruit Juice Industry: History, Characteristics, and Current Isolation/Detection Procedures. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 30, n. 2, p. 55-74, 2008.

D'AVILA, R.F., LUVIELMO, M.M., MENDONÇA, C.R.B., JANTZEN, M.M. **Adjuntos utilizados para produção de cerveja: características e aplicações**. Estudos Tecnológicos em Engenharia, v. 8, p. 60-68, 2012.

DELOS, G. **Beers of the world**. London: Tiger Books International PLC, 1994.

EßLINGER, H.M. **Handbook of Brewing: Process**, 1a. ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2009, p. 200-250.

FERNANDES, F.A.P. **Melhoria dos indicadores microbiológicos em linhas de enchimento de cerveja em barril**. Dissertação para obtenção de grau de mestre em tecnologia e segurança alimentar. Faculdade de Ciências e Tecnologia - Universidade Nova de Lisboa, 2012.

FERNANDEZ, J.L.; SIMPSON, W.J. Measurement and prediction of the susceptibility of lager beer to spoilage by lactic-acid bacteria. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 78, p. 419-425, 1995.

FILHO, W.G.V. **Bebidas Alcoólicas**. 2a. ed. Blucher, v. 1, 2016.

GIRARDIN, H.; ALBAGNAC, C.; DARGAIGNARATZ, C.; NGUYEN-THE, C.; CARLIN, F. Antimicrobial Activity of Foodborne Paenibacillus and Bacillus spp. against Clostridium botulinum. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 5, p. 806-813, 2002.

GOMES, M.J.P. Gênero *Bacillus* spp. **Tópicos em Bacteriologia Veterinária**, FAVET-UFRGS, 2013.

GRANUM, P.E.. Foodborne pathogenic bacteria. In **Food microbiology**. Edited by M.P. Doyle, L.R. Beuchat, and T.J. Montville. ASM Press, Washington, D.C., p. 373–381, 2001.

HAAKENSEN, M.; ZIOLA, B. Identification of novel horA-harboring bacteria capable of spoiling beer. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 54, p. 321-325, 2008.

HARDWICK, W. **Handbook of Brewing**. v. 15, p. 728, 1994.

HORNSEY, I.S. **A History of Beer and Brewing**. The Royal Society of Chemistry, 2003.

HOUGH, J.S.; BRIGGS, D.E.; STEVENS, R.; YOUNG, T.W. **Malting and Brewing Science - Vol II - Hopped Wort and Beer**. Chapman and Hall, Londres, 1982.

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**, v. 113, n. 1, p. 96-101, 2007.

JASKULA, B.; KAFARSKI, P.; AERTS, G.; COOMAN, L. A kinetic study on the isomerization of hop  $\alpha$ -acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 15, p. 6408-6415, 2008. <https://doi.org/10.1021/jf8004965>

JESPERSEN, L., JAKOBSEN, M.. Specific spoilage organisms in breweries and laboratory media for their detection. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 33, p. 139-155, 1996.

JONES, A., PFLUG, I.J. *Bacillus coagulans*, FRR B666, as a potential biological indicator organism. **J. Parenteral Science and Technology**, v. 35, n. 3, p. 82-87, 1981.

KALNIN, J.L. **Avaliação Estratégica Para Implantação De Pequenas Cervejarias**. Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Produção e Sistemas, Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 1999.

KASHKET, E. Bioenergetics of lactic acid bacteria: Cytoplasmic pH and osmotolerance. **FEMS Microbiology Letters**, v. 46, n. 3, p. 233-244, 1987.

KEUKELEIRE, D. Fundamentals of beer and hop chemistry. **Química Nova**, v. 23, n. 1, p. 108-112, 2000.

- KUNZE, W. **Technology brewing and malting**. Berlin: VLB, 1997.
- KUNZE, Wolfgang. **Tecnología Para Cerveceros y Malteros**. Primeira edição, 2006.
- MEUSSDOERFFER, F.G. A Comprehensive History of Beer Brewing. In **Handbook of Brewing: Processes, Technology, Markets**. Esslinger H.M. (ed.), p. 1-42, 2009.
- WELLS-BENNIK, M.H.J.; EIJILANDER, R.T.; BESTEN, H.M.W.; BERENDSEN, E.M.; WARDA, A.K.; KRAWCZYC, A.O.; GROOT, M.N.N.; XIAO, Y.; ZWIETERING, M.H.; KUIPERS, O.P.; ABEE, T. Bacterial Spores in Food: Survival, Emergence, and Outgrowth. **Annual Review of Food Science and Technology**. Vol. 7:457-482, pp 457-482, 2016.
- MUNFORD, A.R.G.; ALVARENGA, V.O.; PRADO-SILVA, L.; CRUCELLO, A.; CAMPAGNOLLO, F.B.; CHAVES, R.D.; OTEIZA, J.M.; SANT'ANA, A.S. Sporeforming bacteria in beer: Occurrence, diversity, presence of hop resistance genes and fate in alcohol-free and lager beers. **Food Control**, v. 81, p. 126-136, 2017.
- PEREIRA, A.P.M.; SANT'ANA, A.S. **Diversity and fate of spore forming bacteria in cocoa powder, milk powder, starch and sugar during processing: A review**. Trends in Food Science & Technology. V. 76, p-p 101-118, 2018.
- PIRTTIJÄRVI, T.S.M.; ANDERSSON, M.A.; SALKINOJA-SALONEN, M.S. Properties of *Bacillus cereus* and other bacilli contaminating biomaterial-based industrial processes. **Int. J. Food Microbiol.** 60: 231-239, 2000.
- POMBEIRO, M.J. **O Mundo da Cerveja**. SCC – Sociedade Central de Cervejas e Bebidas, S.A., 2008.
- PRIEST, F.G. Gram-positive brewing bacteria. **Brewing Microbiology**. Chapman and Hall, Londres, p. 127-161, 1996.
- REINOLD, M. R. **Manual prático de cervejaria**. São Paulo: Aden, 1997. 214p.
- SANTOS, M.S.; RIBEIRO, F.M. Cervejas e Refrigerantes. São Paulo: **CETESB**, p. 58, 2005.
- SAKAMOTO, K.; KONINGS, W.N. **Beer spoilage bacteria and hop resistance**. *International Journal of Food Microbiology*, v. 89, p. 105-124, 2003.

SILVA, F.; GIBBS, P. Target selection in designing pasteurization processes for shelf-stable high-acid fruit products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 44, n. 5, p. 353-360, 2004.

SIMPSON, W. J., SMITH, A. R. W. Factors affecting antibacterial activity of hops compounds and their derivatives. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 72, n. 4, p. 327-334, 1992.

SOBRAL, J.N. **Curso Elementar de Cerveja**, Centro de Formação Profissional para o Setor Alimentar. 2006.

SUZUKI, K.; IIJIMA, K.; OZAKI, K.; YAMASHITA, H. Isolation of a hop-sensitive variant of *Lactobacillus lindneri* and identification of genetic markers for beer spoilage ability of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, n. 9, p. 5089-5097, 2005.

SUZUKI, K.; IIJIMA, K.; SAKAMOTO, K.; SAMI, M.; YAMASHITA, H. A review of hop resistance in beer spoilage lactic acid bacteria. *Journal of the Institute of Brewing*, v. 112, p. 173–191, 2006.

VAUGHAN, A.; O'SULLIVAN, T.; VAN SINDEREN, D. Enhancing the microbiological stability of malt and beer — a review. *Journal of the Institute of Brewing*, v. 11, n. 4, p. 355-371, 2005.

VENTURINI-FILHO, W. G. **Bebidas Alcoólicas – Ciência e Tecnologia**. 2ª Edição, vol:1, Editora: Blucher, 2016.

WHITE, C.; ZAINASHEFF J. **Yeast, The practical guide to beer fermentation**. Brewers Association. Boulder, Colorado. Primeira edição, 2010.

YOKOYA, F. Problemas com contaminantes na Fermentação alcoólica. *STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos*, v.9, n. 6, p. 38 e 39, 1991.