

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS – UFMG
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

Sibele Aryadne da Silva

**Contaminantes microbianos no processo de produção de
cerveja**

Belo Horizonte

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS – UFMG
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

Sibele Aryadne da Silva

**Contaminantes microbianos no processo de produção de
cerveja**

Trabalho de Conclusão apresentado ao Curso de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito à obtenção do título de Especialista

Aluna: Sibele Aryadne da Silva

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa
Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Leveduras – ICB/UFMG

Co-orientadora: Dra. Luciana Rocha Brandão
Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos – ICB/UFMG

Belo Horizonte

2017

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Orientador, Professor Doutor Carlos Rosa pela disponibilidade;

À Co-orientadora, Doutora Luciana Rocha Brandão por toda a atenção e auxílio;

À amiga e Doutora Christiane Contigli por todo o apoio de sempre;

A todos que contribuíram e participaram na conclusão de mais uma etapa em minha vida.

“Você não pode mudar o vento, mas pode ajustar as velas do barco para chegar onde quer”.

Confúcio

RESUMO

A cerveja é uma bebida fabricada através da fermentação do malte com a utilização de leveduras, sendo as espécies *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces pastorianus* as mais utilizadas. Os principais ingredientes para fabricação da cerveja são água, lúpulo, malte e leveduras. Relatos indicam que a cerveja originou-se no Oriente Médio ou Egito. O objetivo deste trabalho é realizar uma revisão bibliográfica sobre os principais contaminantes microbianos que podem ser encontrados no processo de produção da cerveja, descrever as principais modificações geradas na cerveja pelos agentes microbianos, bem como as principais características que facilitam a contaminação microbiana e os principais meios de cultivo utilizados na detecção de contaminantes de cerveja. A cerveja não propicia o desenvolvimento de micro-organismos devido as características de pH, presença de álcool, baixa concentração de O₂, porém podem ocorrer contaminações microbianas por bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras selvagens que são capazes de ocasionar deterioração do produto final, agregando compostos, aromas e sabores indesejáveis na cerveja gerando prejuízos monetários e comerciais para os produtores.

Palavras-chave: levedura, cerveja, bactérias Gram-positivas, deterioração, fermentação.

ABSTRACT

Beer is a beverage made by fermenting malt with the use of yeasts, with the species *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces pastorianus* being the most used. The main ingredients for brewing are water, hops, malt and yeast. Reports indicate that beer originated in the Middle East or Egypt. The objective of this work is to perform a literature review on the main microbial contaminants that can be found in the beer production process, to describe the main modifications generated in beer by the microbial agents, as well as the main characteristics that facilitate the microbial contamination and the main means used for detecting beer contaminants. The beer does not promote the development of microorganisms due to the characteristics of pH, presence of alcohol, low concentration of O₂, but microbial contaminations can occur by Gram-positive, Gram-negative bacteria and wild yeasts that are capable of causing deterioration of the product end, adding compounds, aromas and undesirable flavors in the beer generating monetary and commercial losses for the producers.

Keyword: yeast, beer, Gram-positive bacteria, deterioration, fermentation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Principais ingredientes do processo de produção da cerveja	6
Figura 2: Grãos de cevada	10
Figura 3: Flor do lúpulo	13
Figura 4: Temperatura ideal para atuação enzimática	16
Figura 5: Processo de fermentação alcoólica	20
Figura 6: Curva de crescimento de levedura durante processo fermentativo.....	21
Figura 7: Pontos de contaminação microbiológica que podem ocorrer no processo de fabricação da cerveja	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais espécies de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas deteriorantes da cerveja.....	26
Tabela 2: Meios seletivos de cultivo recomendados pela EBC, ASBC e BCOJ para a detecção de bactérias deteriorantes da cerveja.....	34
Tabela 3: Meios seletivos de cultivo NBB suplementados com nutrientes para detecção de microrganismos contaminantes da cerveja.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMBEV - Companhia de Bebidas das Américas

EBC - European Brewery Convention

ASBC - American Society of Brewing Chemist

BCOJ - Brewery Convention of Japan

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVO	4
2.1 OBJETIVO GERAL.....	4
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
3 METODOLOGIA	5
4 REVISÃO DE LITERATURA.....	6
4.1 O que é a cerveja	6
4.2 Insumos utilizados no processo de produção da cerveja	8
4.2.1 Água	8
4.2.2 Cevada e Malte	10
4.2.3 Lúpulo.....	12
4.2.4 Adição de Adjuntos.....	13
4.2.5 Leveduras.....	14
4.3 Processo de fabricação da cerveja.....	15
4.4 Fermentação Alcoólica	17
4.5 Controle da Qualidade da Cerveja	22
4.6 Principais Micro-organismos Contaminantes da Cerveja	25
4.6.1 Bactérias Gram Positivas	26
4.6.2 Bactérias Gram Negativas.....	28
4.6.3 Bolores e Leveduras.....	31
4.6.4 Meios de Cultivo Microbiológico no Controle de Qualidade da Cerveja	32
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	36
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37

1 INTRODUÇÃO

A cerveja é uma bebida obtida através da fermentação do malte com o auxílio de leveduras que possuem a capacidade de transformar carboidratos em álcool. A história da cerveja se confunde com a história da humanidade. Existem relatos de que a cerveja tenha se originado no Oriente Médio ou Egito. Em 1516, na Baviera, Alemanha, foi criado o primeiro regulamento relacionado ao processo de produção e aos principais ingredientes utilizados na fabricação da bebida. A primeira cerveja chegou ao Brasil em 1808, trazida por D. João VI (MARTINS et al., 2014).

Para a produção de cerveja são utilizados quatro ingredientes principais: água, lúpulo, malte e leveduras. A água compõe cerca de 90% da massa da cerveja. É utilizada na fabricação da cerveja no preparo do malte para a etapa de moagem, lavagem de recipientes para o envase, além da água de serviço utilizada para lavagem de equipamentos. Existem requisitos básicos que a água deve apresentar para ser considerada de qualidade para o uso no fabrico da bebida. Tais como ser livre de turbidez, controle de pH entre (5 a 9,5), controle do nível de cloro e padrões microbiológicos que serão descritos neste trabalho (ROSA & AFONSO, 2015).

O lúpulo (*Humulus lupulus* L.) é uma planta originária de climas temperados. Para a fabricação da cerveja são utilizadas as flores femininas dessa planta. O lúpulo apresenta resinas e óleos essenciais que são utilizados para compor o sabor amargo da cerveja. Por ser considerado o tempero da cerveja ele é utilizado na diferenciação dos tipos de cervejas.

A quantidade e o tipo do lúpulo são fatores importantes na diferenciação das cervejas. O lúpulo atua também como conservante natural, pois possui propriedades antimicrobianas, sendo os α -ácidos presentes na planta responsáveis pela ação bacteriostática de bactérias Gram-positivas (MEGA et al.,2011).

O Malte é o resultado de um processo de germinação de grãos, o mais utilizado é a cevada, cereal do gênero *Hordeum*. A cevada possui características como riqueza de amido em sua composição, enzimas amilolíticas, além de apresentar uma casca em torno do grão que confere proteção ao mesmo durante o processo de malteação (ROSA & AFONSO, 2015). Podem ser utilizados também em substituição a parte do malte da cevada, grãos de arroz, trigo, centeio, milho, aveia e sorgo e carboidratos de origem vegetal. (MEGA et al.,2011).

As principais leveduras utilizadas no processo de fabricação da cerveja são as do gênero *Saccharomyces*, as quais fornecem características primordiais para a caracterização da bebida, como aroma, textura e sabor. *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces pastorianus* são as principais leveduras responsáveis pela fermentação do mosto da cerveja. A alta fermentação da cerveja do tipo *Ale* é realizada por *Saccharomyces cerevisiae*, que fermenta o mosto em temperatura entre 18 e 22 °C, de 3 a 5 dias e agem próximo a superfície do mosto. A cerveja *Lager* tem fermentação realizada pela espécie *Saccharomyces pastorianus*, em temperatura entre 7°C e 15 °C, de 7 a 10 dias. Esta espécie tem como característica fermentar o mosto no fundo do tanque (BORTOLI et al, 2013).

A cerveja é considerada um produto estável do ponto de vista microbiológico, no entanto alguns micro-organismos podem se desenvolver na bebida. As principais bactérias que podem contaminar a

cerveja são as Gram-positivas dos gêneros *Lactobacillus* e *Pediococcus* e as Gram-negativas dos gêneros *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Pectinatus* e *Megasphaera*. A contaminação também pode ocorrer por meio da multiplicação de leveduras selvagens *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces*, ocasionando mudanças no sabor, além de turbidez, prejudicando assim a qualidade do produto final (DRAGONE et al.,2008).

Apesar da cerveja não propiciar o desenvolvimento de microorganismos devido às características de pH, concentração de álcool, baixa concentração de O₂, a contaminação bacteriana e por outras leveduras pode acontecer eventualmente e comprometer a qualidade do produto final, gerando prejuízos monetários e comerciais para os produtores. A demanda da indústria cervejeira é cada vez maior no Brasil e no mundo, o que impulsiona o mercado na procura por novos tipos de cervejas e também por maior qualidade da bebida. Portanto, a fim de garantir uma bebida de qualidade, cada um dos insumos deve ser controlado, além de todo o processo de produção (BORTOLI et al., 2013).

Portanto, é importante conhecer os principais contaminantes microbianos do processo produtivo da cerveja para a identificação das características que comprometem o produto final afim de evitar o comprometimento da bebida.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho é realizar uma revisão bibliográfica sobre os principais contaminantes microbianos que podem ser encontrados no processo de produção da cerveja.

2.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos deste trabalho são:

- Apresentar os principais contaminantes da cerveja;
- Descrever as principais modificações geradas na cerveja pelos agentes microbianos deteriorantes na cerveja;
- Apresentar as principais características que facilitam a contaminação microbiana;
- Apresentar os principais meios de cultivo utilizados na detecção de contaminantes de cerveja.

3 METODOLOGIA

Foi realizada uma revisão bibliográfica de artigos e trabalhos científicos relacionados com o tema escolhido. Foram selecionados artigos recentes, disponíveis principalmente nas Plataformas NCBI, SCIELO publicados entre 2007 e 2017.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 O que é a cerveja

A cerveja é uma bebida oriunda de um processo fermentativo de cereais. A cevada é o grão mais utilizado, porém pode ser produzida também a partir do arroz e do trigo. É por meio da fermentação alcoólica realizada com o auxílio de leveduras, principalmente as do gênero *Saccharomyces* que a bebida é produzida. Para a produção da cerveja utilizam-se os insumos, água, levedura, mosto composto pelo lúpulo e o grão do cereal de escolha. Atualmente existem diversos tipos de cervejas com aromas e sabores diferenciados, características dadas pela diversidade de grãos, processo fermentativo realizado pela levedura, qualidade dos insumos utilizados e boas práticas de fabricação do processo produtivo (Figura 1) (MEGA et al, 2011).



Figura 1: Principais ingredientes da cerveja (ROSA & AFONSO, 2015).

Segundo Rosa & Afonso (2015), a cerveja é considerada uma bebida de baixo teor alcoólico, as mais frequentemente consumidas possuem teores de 4% à 6% de álcool em sua composição e apresentam pH ácido em torno de 4.

A cerveja no Brasil é regulamentada pelo decreto n 2.314, de 4 de setembro de 1997, pela lei n 8.918, de 14 de julho de 1994, que foi substituída pelo decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009 que caracteriza a 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. Quanto ao processo fermentativo as cervejas podem ser diferenciadas em dois tipos sendo *Ales* ou *Lagers*. *Ales* são produzidas por leveduras *Saccharomyces cerevisiae* que agem no topo do mosto líquido denso e açucarado resultante do cozimento dos maltes e cereais durante o processo de fermentação em temperaturas (de 18 a 25°C). Os aromas das cervejas *Ales* são diferenciados das cervejas *Lagers* apresentando-se mais complexos devido aos subprodutos da fermentação. A temperatura mais elevada durante o processo fermentativo propicia a formação de álcoois superiores e ésteres que proporcionam a diferenciação de sabores e aromas. Dentre as cervejas *Ales* estão as cervejas Belgas clássicas como: Blond, Dubbel, Trippel e Quadrupel, as cervejas de Trigo, e as cervejas inglesas *Stouts*, *Porters*, *Indians Pale Ale*, *Scottishes*, *Irishes* entre outras (ACERVA, 2009).

As cervejas do tipo *Lagers* são produzidas pelas leveduras da espécie *Saccharomyces pastorianus* e são as mais consumidas atualmente no Brasil. Essas leveduras fermentam o mosto no fundo do tanque durante o processo de fermentação, e trabalham a temperaturas mais baixas que as das *Ales*, entre 8° e 14° C. Possuem sabor mais leve e refrescante além de aroma mais suave. As mais conhecidas são do tipo *American lagers*, *Pilseners*, *Schwarzbier*, *Munich Dunkel*, *Oktoberfestbier*, *Bock*, *Helles*, *Rauchbier* entre outras (ACERVA,2009).

As cervejas do Tipo *Lambic* são fabricadas tradicionalmente na região de Pajottenland, Bélgica. Essas cervejas se diferem das cervejas do tipo *Ale* e *Largesr* visto que fermentam espontaneamente, sem adição de fermento selecionado. A denominação para “*Lambic*”, é uma cerveja clara, ácida, com maturação em madeira e fermentação de leveduras do gênero *Saccharomyces*, *Brettanomyces* e outras leveduras, como também bactérias. Os micro-organismos envolvidos na produção de cervejas *Lambics* são oriundos do ar ou provenientes de equipamentos e matérias-primas. O local onde a cerveja é produzida deve ser estar próximo a fontes de leveduras naturais, tanto do gênero *Saccharomyces* quanto do gênero *Brettanomyces*. Normalmente são fermentadas em barris de madeira (MARCUSI,2013).

4.2 Insumos utilizados no processo de produção de cervejas

4.2.1 Água

A água é o ingrediente em maior quantidade utilizado na fabricação da cerveja. Sabe-se que 90% da massa da cerveja é composta por água e a qualidade da mesma afeta consideravelmente o produto final, sendo, portanto, necessário o tratamento e controle de toda a água utilizada no processo de fabricação. Atualmente, os produtores fazem o controle da qualidade da água utilizada para a fabricação da cerveja propriamente dita, na preparação dos materiais, umidificação e preparo do malte e também da água de serviço utilizada em procedimentos que não entram em contato com o produto (ROSA & AFONSO, 2015).

Os principais parâmetros analisados no controle da qualidade da água para a produção de uma cerveja de qualidade são a turbidez, o pH e os parâmetros microbiológicos. A turbidez é ocasionada pela presença de resíduos minerais ou microbiológicos na água e a faixa adequada é garantida por meio de processos criteriosos de filtração e controle do pH (potencial de hidrogênio), sendo o ideal entre 5 e 9,5. O pH controlado nessa faixa atua auxiliando em processos enzimáticos, variação de cor e solubilização de ingredientes. Os padrões microbiológicos da água potável para consumo humano são estabelecidos pela portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011, que estabelece os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011; ROSA & AFONSO, 2015).

Atualmente o MINISTÉRIO DA SAÚDE (2011) solicita, como principal parâmetro para caracterizar a água de consumo humano, a análise microbiológica do parâmetro presença-ausência de *Escherichia coli* em 100 ml de água. Por ser uma bactéria Gram-negativa de origem exclusivamente gastrointestinal e potencial causadora de doenças, ela é o principal micro-organismo indicador para detecção de contaminação fecal. Porém, podem ser analisadas também a contagem de bactérias heterotróficas e coliformes totais, como forma de conhecer as reais condições higiênico-sanitárias da água. Portanto, é importante controlar a qualidade microbiológica da água utilizada na fabricação da cerveja para identificar e descartar possíveis fontes de contaminação no produto final.

4.2.2 Cevada e Malte

A cevada é uma planta da família das gramíneas, pertencente ao gênero *Hordeum*, recebendo a denominação de *Hordeum distichum erectum* para a cevada de haste ereta e *Hordeum distichum nutans* para a cevada de haste curta. A preferência pelo uso da cevada na produção da cerveja é devida à riqueza de amido que o grão apresenta, além do alto teor proteico que fornece os aminoácidos necessários para o crescimento das leveduras e de substâncias nitrogenadas que participam da formação da espuma. O cereal apresenta uma casca grossa e insolúvel, que age como um agente filtrante e auxilia no processo de aroma, cor e sabor do mosto, além da proteção do grão durante a maltagem (CARVALHO, 2007).



Figura 2: Grãos da Cevada. Fonte: ACERVA, 2009.

O malte é produzido a partir da germinação parcial dos grãos de cereais, posteriormente secos e torrados (Figura 2). O processo de maltagem serve para disponibilizar o amido presente no cereal e ativação das enzimas presentes na casca do grão. Um malte de qualidade, rico em açúcar, é essencial para a fabricação de uma cerveja saborosa. Durante a fermentação ocorre a conversão de amido em açúcar que será consumido pelas leveduras (ACERVA, 2009; CARVALHO, 2007).

4.2.3 Lúpulo

O lúpulo, de nome científico *Humulus lupulus*, é uma planta trepadeira típica de climas frios, possuindo flores masculinas e femininas em plantas diferentes (Figura 3). Para a fabricação da cerveja, suas flores são utilizadas, porém somente as flores femininas. O amargor e o aroma característico da cerveja são alcançados através das resinas e óleos fornecidos por essa planta. O lúpulo é originário de climas temperados e o Brasil importa todo o lúpulo dos Estados Unidos ou Europa, clima onde a planta se desenvolve adequadamente. As flores são prensadas para a comercialização e vendidas sob a forma de pellets (MEGA et al., 2011).

O lúpulo confere o aroma e sabor amargo que são característicos da cerveja. Atua também como agente anti-espumante e possui efeito bacteriostático sob bactérias Gram-positivas. As propriedades bacteriostáticas do lúpulo são devido aos α – ácidos (humulonas). É composto também por β -ácidos (lupulonas), proteínas, resinas totais, taninos, óleos essenciais e água. Deve ser adicionado à cerveja durante o processo de fervura do mosto para que seus componentes se dissolvam e liberem o amargor e o aroma desejado. Os α -ácidos são isomerizados em altas temperaturas de fervura transformando-se em iso- α -ácidos que são os responsáveis pelo sabor amargo da cerveja (CARVALHO, 2007).



Figura 4: Flor de lúpulo. Fonte: MEGA et al., 2011.

4.2.4 Adição de adjuntos

Segundo o decreto Nº 6.871, de 4 de junho de 2009, que regulamenta a lei nº 8.918, de 14/07/1994 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento parte do malte de cevada pode ser substituída por adjuntos cervejeiros desde que não excedam 45% em relação ao extrato primitivo. Adjuntos são definidos como qualquer fonte de carboidratos diferentes do malte de cevada que contribuem com açúcares fermentáveis no mosto. Em substituição ao malte da cevada podem ser utilizados cereais e matérias ricas em amido como milho, trigo, mandioca, arroz, utilizam-se também amidos e açúcares de origem vegetal. Os adjuntos proporcionam uma redução dos custos de produção, complementando os carboidratos do malte de cevada, produção de características sensoriais diferenciadas e

também possibilitam o emprego de menor quantidade de energia durante o processamento (D'AVILA et al., 2012).

4.2.5 Leveduras

As leveduras são organismos eucarióticos que fazem parte do Reino Fungi. Por serem unicelulares crescem mais rapidamente do que os fungos filamentosos e estão presentes em vários processos bioquímicos, sendo utilizadas na fabricação de cervejas e pães há milhares de anos. Reproduzem-se através de brotamento ou assexuadamente por fissão binária (CARVALHO et al., 2005)

A utilização de leveduras no processo de fabricação da cerveja ocorre devido aos processos metabólicos produzidos pelas mesmas. Quando existe oxigênio, produzem um crescimento elevado e formam dióxido de carbono. Na ausência do oxigênio, essa taxa diminui, originando o etanol e dióxido de carbono. Os gêneros que estão diretamente relacionados com a fermentação alcoólica são, em sua maioria, as leveduras do gênero *Saccharomyces*, mas os gêneros *Brettanomyces*, *Dekkera*, *Torulaspota*, *Zygosaccharomyces* também são utilizados na produção de bebidas alcoólicas (LEVINHO, 2015).

Diversas empresas fornecem leveduras para a fabricação de cerveja e cada uma informa as condições para o seu cultivo, mas de uma maneira geral as leveduras comercializadas apresentam sob a forma liofilizada e necessitam de uma hidratação prévia para a realização do cultivo e propagação (MARTINS et al, 2005).

4.3 Processo de produção da cerveja e insumos utilizados

A produção de cerveja é um processo dividido em etapas sendo:

Produção de mosto: moagem do malte, mosturação, filtração, fervura e clarificação do mosto.

Na moagem do malte, a cevada é moída em moinhos de rolos, discos ou de martelos para expor o amido de seu interior e ser transformado durante o processo de maceração. A moagem do malte é importante para desintegrar o endosperma do grão através do processo de trituração afim de que todos os constituintes do cereal estejam acessíveis às ações enzimáticas (AMBEV,2011).

Na mosturação os grãos são misturados à água em temperaturas pré-determinadas conforme (Figura 4) para que se inicie a ação das enzimas e ocorra a transformação das cadeias de amidos em cadeias menores como glicose, maltose. Na mosturação ocorre a dissolução das substâncias do malte e hidrólise do amido em um processo denominado de sacarificação. Obtém se com esse processo a extração dos sólidos do malte que permanecem em dissolução ou suspensão na água que constitui o mosto para a etapa de fermentação (ACERVA, 2009).

1º	Glucanases	35 – 45° C
2º	Proteases	45 – 55° C
3º	β - amilase	60 – 65° C
4º	α - amilase	70 – 75° C

Figura 4: Temperatura ideal para atuação enzimática (AMBEV)

No processo de mosturação, é importante monitorar a temperatura o tempo e o pH para que ocorra a melhor atuação enzimática uma vez que a ação enzimática é dependente da temperatura e também do pH do mosto, sendo que as glucanases possuem pH ideal de 5, proteases entre 5,2 e 8,2, β – amilases de 5,4 – 5,6 e α - amilases de 5,6 e 5,8. O controle do pH pode ser realizado com ácido fosfórico e cloreto de cálcio (CARVALHO, 2007).

A etapa de clarificação consiste na separação das substâncias solubilizadas das substâncias insolúveis presente no mosto. O mosto deverá ser límpido, pois a turbidez excessiva é negativa acarretando perda de mosto, o que atrapalha a fermentação (AMBEV, 2011).

A etapa de fervura do mosto ocorre à temperatura de 100 °C. É nesta etapa que o lúpulo é adicionado, ocorre então a estabilização da composição do mosto bem como a inativação enzimática devido a coagulação das proteínas e do tanino presente no lúpulo, ocorrendo o precipitação. A fervura do mosto produz também modificação da cor e esterilização do mosto (BORTOLI et al., 2014).

Após a fervura, o mosto deve ser resfriado rapidamente a uma temperatura de 20 °C, evitando assim a contaminação por micro-

organismos. Após essa etapa ocorre a oxigenação do mosto que deve ser transferido para os tanques de fermentação (CARVALHO, 2007).

As espécies *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces pastorianus* são as principais leveduras responsáveis pela fermentação do mosto da cerveja. O oxigênio injetado no mosto antes da inoculação do fermento é consumido e produz ácidos carboxílicos insaturados e esteróis, que atuam na síntese da membrana celular, para crescimento celular das leveduras. Esses micro-organismos por sua vez, catabolizam os açúcares simples seja por via metabólica respiratória ou por via fermentativa. No início do processo na presença de oxigênio elas oxidam as moléculas simples de açúcar e produzem gás carbônico, água e energia. A medida que o oxigênio se esgota as leveduras passam a utilizar a via fermentativa, produzindo duas moléculas de etanol, duas de gás carbônico e energia `a partir de uma molécula de glicose. Após esse processo a cerveja é denominada cerveja verde e necessita passar por um processo de maturação (BORTOLI et al., 2014).

O processo de maturação ocorre a zero grau, levando de semanas à meses, dependendo do tipo de características sensoriais desejadas e dependendo também do tipo de fermentação empregada. A maturação ou fermentação secundária é importante entre outras coisas para eliminar o diacetil gerado na fermentação primária, clarificar a cerveja através do processo de sedimentação das leveduras e iniciar a carbonatação onde ocorre a absorção do gás carbônico pela cerveja e incorporação de características sensoriais como melhoria do odor, sabor e redução de metabólitos como diacetil e acetaldeído (BORTOLI et al., 2014).

Após a maturação a cerveja deve ser filtrada para eliminar partículas em suspensão, e deixar a bebida límpida e com brilho. Não é desejável a

incorporação de oxigênio e a filtração é realizada sob contra-pressão, a baixas temperaturas, para que a cerveja não perca a saturação de CO₂. O envase pode ser realizado em garrafas, latas ou barris. Após o envase pode ser realizado a pasteurização. O processo de pasteurização é um processo térmico onde a bebida é submetida a vários ciclos alternados de temperatura, onde é aquecida a 60°C e rapidamente resfriada. Esse processo confere maior estabilidade microbiológica ao produto. Uma filtração feita adequadamente, com ausência de oxigênio no processo de engarrafamento, utensílios assépticos e pasteurização realizada de maneira correta garantem a estabilidade biológica do produto final (ACERVA, 2009, CARVALHO, 2007).

4.4 Fermentação Alcoólica

O processo fermentativo consiste no ponto central para a produção de qualquer bebida alcóolica, incluindo as cervejas, possuindo como principal objetivo a conversão de açúcares em etanol e gás carbônico pela levedura em condições anaeróbicas. A fermentação é realizada pelas leveduras que por sua vez tem seu metabolismo influenciado e controlado por alguns fatores importantes, como a fisiologia celular, viabilidade, tolerância ao stress (principalmente devido a diversas faixas de temperatura e mudanças de pH), disponibilidade nutricional (quantidade e concentração de nutrientes essenciais) e também temperatura, pH, densidade do mosto e oxigênio dissolvido (MEGA et al., 2011). Segundo LIMA et al (2014), existem condições específicas de temperatura, pressão osmótica, pH, oxigenação, espécie e concentração adequada da levedura (inóculo) que precisam ser controladas durante o processo de fabricação

da cerveja, pois são primordiais para a qualidade e o rendimento da fermentação alcoólica.

O processo da fermentação alcoólica é caracterizado por uma via catabólica, onde ocorre a quebra de moléculas de açúcar (glicose ou frutose) através de leveduras ou bactérias, formando etanol e CO₂, com liberação de energia. A via catabólica ocorre através da glicólise e o piruvato é o produto final da degradação, o qual pode seguir diferentes vias metabólicas: fermentação alcoólica, láctea e respiração no ciclo de Krebs e cadeia respiratória. Na fermentação alcoólica, o piruvato é descarboxilado através da enzima piruvato descarboxilase, gera CO₂ e NADH e reoxidando o NADH, através da álcool desidrogenase, o acetaldeído é convertido em álcool etílico (ERNANDES, GARCIA-CRUZ, 2009).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* possui a característica de ajuste metabólico sendo, portanto, um micro-organismo aeróbio facultativo, desenvolvendo-se na ausência e também na presença de oxigênio (STEINLE, 2013).

A equação da fermentação alcoólica:

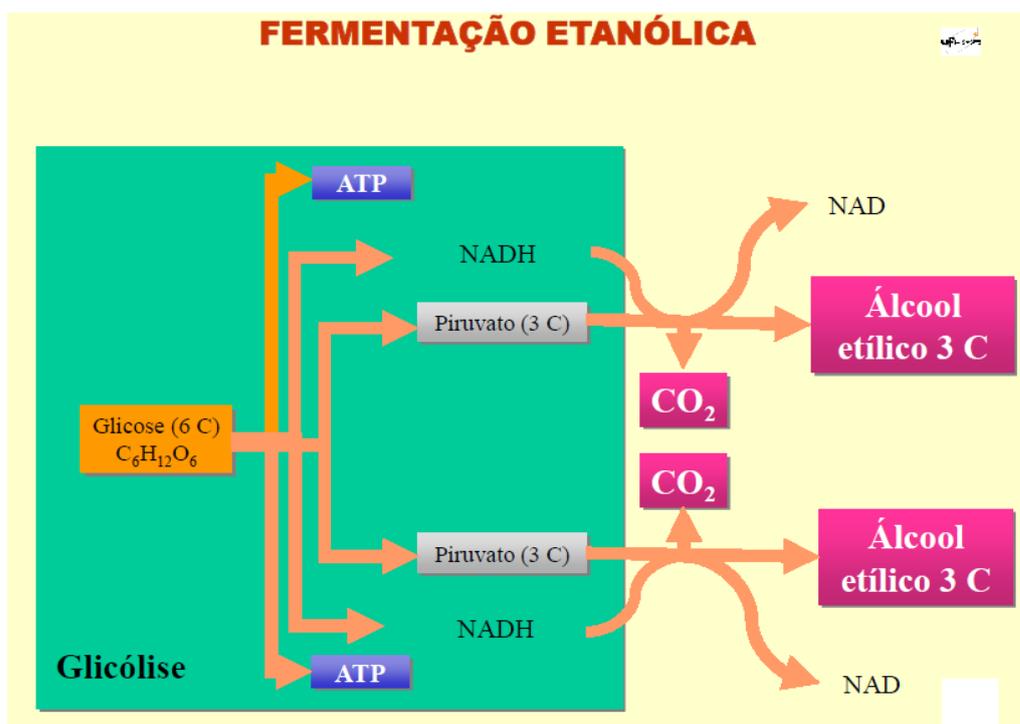


Figura 5: Fermentação Alcoólica –Sertãozinho,CEISE –III. Sertãozinho: MTA UFSCAR, 2012.p.41. Adaptado de STEINLE (2013).

Na presença de oxigênio ocorrem diversas reações enzimáticas com rotas metabólicas alternativas, que produzem substâncias relacionadas à adaptação e sobrevivência das leveduras, tais como glicerol, proteínas, lipídios, ácidos acético e pirúvico, decorrentes das reações ocorridas no ciclo de Krebs durante o processo fermentativo da levedura (STEINLE, 2013).

O processo fermentativo é dependente de mecanismos celulares que controlam a mitose das leveduras e o metabolismo dos nutrientes,

mecanismo influenciado pelo pH, temperatura, oxigênio dissolvido, entre outros. Além disso, relacionado ao processo de crescimento das leveduras que é dividido pelas fases adaptativa (lag), exponencial (log) e estacionária (Figura 6). Durante a fase lag, as leveduras estão se adaptando às condições do ambiente para iniciar sua multiplicação celular; o controle de temperatura e da taxa de inoculação são importantes nessa etapa, além do controle pH do mosto, que deverá estar entre 4 e 5. Durante a fase exponencial, de maior multiplicação celular, a levedura se multiplica utilizando as reservas de glicogênio e o oxigênio disponível. Converte então os açúcares do mosto em etanol, gás carbônico e outros compostos aromáticos. Cada levedura tem sua característica específica e a quantidade de nutrientes do mosto determina a obtenção do teor alcoólico desejado como também das características sensoriais da bebida. Na fase estacionária, o crescimento das leveduras se iguala ao número de células e morrem, diminuindo a atividade fermentativa, ocorre o amadurecimento da cerveja e a obtenção dos aromas desejados (SUHRE, 2014).

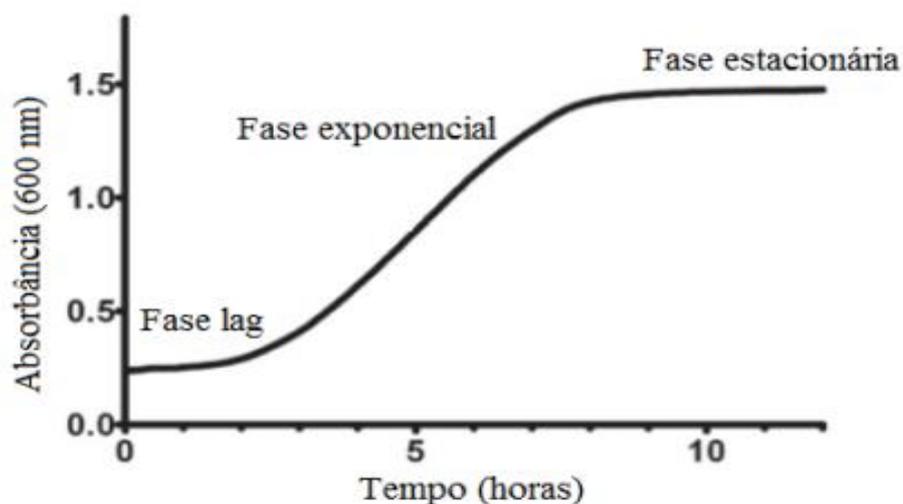


Figura 6 - Curva de crescimento de levedura durante processo fermentativo, lida em 600 nm em espectrofotômetro (SUHRE, 2014).

4.5 Controle de qualidade da Cerveja

A contaminação bacteriana durante a produção da cerveja pode ocasionar danos ao produto final. Bactérias Gram-positivas são os micro-organismos contaminantes que predominam nesse tipo de matriz. Ácidos acéticos e lácticos podem inibir o crescimento da *Saccharomyces cerevisiae*, o que prejudica o rendimento do processo fermentativo (DE PAULA et al., 2007).

Apesar da multiplicação de micro-organismos ser desfavorável na cerveja devido a alterações de pH decorrentes da fermentação do mosto, podendo o mesmo chegar à faixa de 4, algumas espécies de bactérias podem se multiplicar e ocasionar turbidez e outras características sensoriais indesejadas, prejudicando assim a qualidade sensorial da bebida. Por isso, se faz necessário o estudo dos micro-organismos deteriorantes, a fim de garantir a qualidade do produto final e identificar em quais etapas do processo de fabricação da bebida pode ocorrer a contaminação (DRAGONE et al., 2007).

Algumas etapas do processo de produção da cerveja agem como obstáculos para o estabelecimento de micro-organismos contaminantes sendo elas a acidificação do malte, a fervura, a pasteurização e a filtração. As principais características para a ausência de crescimento microbiano na cerveja são: baixos níveis de pH (entre 3.9 e 4.4), presença do etanol, dióxido de carbono elevado, baixo teor de oxigênio < 0,1 ppm, além da ausência de componentes nutricionais primordiais para o crescimento microbiano. (VRIESEKOOPT ET AL., 2013).

Porém, foi observado que a cerveja torna-se mais susceptível ao crescimento microbiano quando alguns desses fatores são alterados, principalmente nível elevado de pH, quando existe a adição de açúcar, níveis baixos de etanol e de dióxido de carbono (VRIESEKOOOP ET AL., 2013).

A contaminação microbiana da cerveja pode ocorrer através de várias maneiras, tais como micro-organismos provenientes da matéria prima, dos materiais e utensílios utilizados durante o processo de produção e também durante o processo de envase e distribuição (ESTEVINHO, 2015).

Em uma cervejaria são vários os pontos onde pode ocorrer contaminação microbiana (Figura 7). A matéria-prima utilizada deve ser controlada e devidamente armazenada. Os insumos e os fornecedores devem ser avaliados criteriosamente. O ambiente onde a bebida é produzida deve ser bem higienizado afim de que contaminantes presentes no ar não contaminem a bebida. Os equipamentos e o contato humano direto com a bebida deve ser o mínimo possível e com a utilização de equipamentos de proteção para que que bactérias patogênicas humanas não possam entrar em contato com a bebida. Os tanques da sala de preparo do mosto são potenciais pontos de contaminação microbiana. As garrafas e barris retornáveis podem conter contaminações e devem ser higienizadas adequadamente. Na sala de envase os micro-organismos presentes no ar podem contaminar a cerveja até mesmo durante o transporte das garrafas vazias (DRAGONE et al., 2007).

A ação dos micro-organismos deteriorantes é ocasionada principalmente devido a falhas no processo principalmente relacionados armazenamento e qualidade dos grãos, processos de sanitização e limpeza, cuidados dos operadores, gerenciamento inadequado da

levedura e contaminação, erros no processo de filtração, envase e pasteurização.

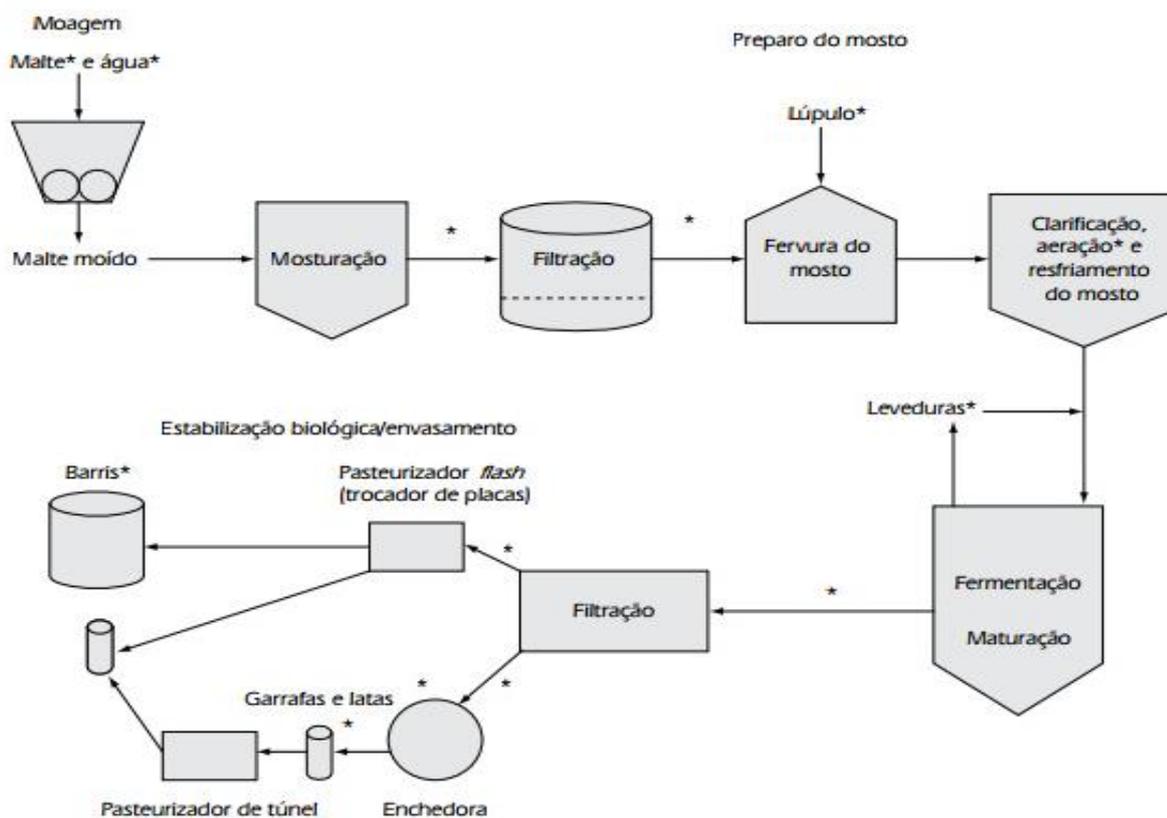


Figura 7: Em asterisco os pontos de contaminação microbiana que podem ocorrer no processo de fabricação da cerveja (VAUGHAN et al., 2005). Adaptado por DRAGONE et al., 2007.

4.6 Principais micro-organismos contaminantes da cerveja

Vários micro-organismos estão relacionados com a deterioração da cerveja (Tabela 1) dentre eles estão bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e também as leveduras selvagens. A deterioração da bebida por bactérias Gram-positivas ocorre principalmente por bactérias produtoras de ácido láctico pertencente aos gêneros *Lactobacillus spp* e *Pediococcus spp*, que são anaeróbios facultativos. Essas são as que mais acometem a produção das cervejarias, visto que esses organismos são responsáveis por aproximadamente 70% da deterioração da cerveja. As bactérias dos gêneros *Megasphaera* e *Pectinatus* pertencem à família Acidaminococcaceae e são consideradas as bactérias anaeróbicas mais importantes na indústria da cerveja. De 1980 até as décadas atuais, os incidentes de contaminação microbiana com esses tipos de bactérias aumentaram consideravelmente, visto que são bactérias anaeróbias e o avanço da tecnologia de envase da bebida proporciona um baixo a quase zero percentual de oxigênio, o que favorece o crescimento das mesmas (SAKAMOTO & KONINGS, 2003). A tabela abaixo apresenta as principais bactérias contaminantes de cervejas.

	Gram-positivas		Gram-negativas
<i>Bacillus</i>	<i>B. coagulans</i>	<i>Acetobacter</i>	<i>A. aceti</i>
			<i>A. liquefaciens</i>
<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. brevis</i>		<i>A. pastorianus</i>
	<i>Lb. brevisimilis</i>		<i>A. hansenii</i>
	<i>Lb. buchneri</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>C. freundii</i>
	<i>Lb. casei</i>		
	<i>Lb. collinoides</i>	<i>Enterobacter (Rahnella)</i>	<i>E. aerogenes</i>
	<i>Lb. coryneformis</i>		<i>E. agglomerans (R. aquatilis)</i>
	<i>Lb. curvatus</i>		<i>E. cloacae</i>
	<i>Lb. delbrueckii</i>		
	<i>Lb. lindneri</i>	<i>Gluconobacter</i>	<i>G. oxydans</i>
	<i>Lb. malefermentans</i>		
	<i>Lb. parabuchneri</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>K. aerogenes</i>
	<i>Lb. paracasei</i>		<i>K. pneumoniae</i>
	<i>Lb. plantarum</i>		<i>K. terrigena</i>
<i>Leuconostoc</i>	<i>Leuc. mesenteroides</i>	<i>Megasphaera</i>	<i>M. cerevisiae</i>
<i>Micrococcus</i>	<i>M. kristinae</i>	<i>Obesumbacterium (Hafnia)</i>	<i>O. proteus (H. protea)</i>
	<i>M. varians</i>	<i>Pectinatus</i>	<i>P. cerevisiiphilus</i>
<i>Pediococcus</i>	<i>P. clausenii</i>		<i>P. frisingensis</i>
	<i>P. damnosus</i>		<i>P. sp. DSM20764</i>
	<i>P. dextrinicus</i>	<i>Selenomonas</i>	<i>S. lactificex</i>
	<i>P. inopinatus</i>	<i>Zymomonas</i>	<i>Z. mobilis</i>
		<i>Zymophilus</i>	<i>Z. paucivorans</i>
			<i>Z. raffinosisivorans</i>

Tabela 1. Principais espécies de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas encontradas nas cervejarias (BOULTON e QUAIN, 2006; PRIEST, 2006; BRIGGS et al., 2004; SAKAMOTO e KONINGS, 2003). Adaptado por DRAGONE et al., 2007.

4.6.1 Bactérias Gram-positivas

As bactérias ácido-láticas são utilizadas na produção e alimentos e bebidas. Porém, também podem acarretar a produção de aromas e sabores desagradáveis nos mesmos. São bactérias Gram-positivas, catalase negativa, não formadores de esporos e se reproduzem em condição de microaerofilia ou em anaerobiose. São classificadas em homofermentativas ou heterofermentativas, de acordo com o produto final resultante da sua fermentação. As homofermentativas produzem ácido láctico como o principal produto da fermentação e as heterofermentativas,

produzem ácido láctico, dióxido de carbono, ácido acético e etanol (EMBRAPA, 2011).

Lactobacillus spp.

Os *Lactobacillus spp.* são bactérias pleiomórficas, variando assim a sua morfologia entre bacilos longos, delgados ou cocobacilos. São bactérias heterofermentativas e crescem melhor à temperatura de 30°C. Possuem a capacidade de fermentar dextrinas e amido (SOUZA, FAVERO, 2017).

O gênero *Lactobacillus spp.* é o maior gênero de bactérias produtoras de ácido láctico e inclui várias espécies. Estas bactérias podem produzir turbidez e mudanças de sabor desagradáveis, como a acidez e odores atípicos na cerveja. As espécies que mais acometem as cervejas são *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus lindneri*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus casei*, sendo essa última capaz de produzir uma substância chamada diacetil, que confere à cerveja um sabor desagradável de manteiga (SAKAMOTO & KONINGS, 2003).

Pediococcus spp

Pediococcus é uma bactéria Gram-positiva, homofermentativa, apresenta-se sob a forma de diplococos ou tétrades. Necessita de carboidratos fermentáveis para sua multiplicação. É um micro-organismo acidófilo, crescendo em baixa concentração de O₂. A temperatura ótima de crescimento é entre 25 e 40°C (SOUZA & FAVERO, 2017). Os *Pediococos* também são produtores de ácido láctico. As espécies mais encontradas desse gênero são *Pediococos damnosus* e *Pediococos clausenii* (DANIELSEN et al., 2007). O gênero produz na cerveja uma

característica ácida e um aroma amanteigado pela produção de diacetil. Podem ser encontrados em todas as etapas de fabricação da cerveja. As principais espécies são *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus damnosus*, *P. dextrinicus*, *P. halophilus*, *P. inopinatus*, *P. parvulus*, *P. pentosaceus* e *P. damnosus* (SAKAMOTO & KONINGS, 2003).

4.6.2 Bactérias Gram-negativas

Pectinatus spp

As bactérias do gênero *Pectinatus* se apresentam sob a forma de bacilos anaeróbios, são móveis e possuem flagelos laterais, não formam esporos. A temperatura ideal de crescimento é entre 15 e 40°C (SOUZA & FAVERO, 2017).

Pectinatus spp. é o gênero bacteriano que ocasiona a contaminação microbiana mais temida nas cervejarias, pois o seu crescimento e metabolismo pode ocasionar em odor fecal. As espécies mais conhecidas são *Pectinatus cerevisiiphilus* e *Pectinatus frisingensis*. Durante o crescimento podem produzir ácido acético, propiônico, succínico e láctico além de muita turbidez e um cheiro forte característico de ovo pobre relacionado a formação de sulfeto de hidrogênio e metil mercaptano (SAKAMOTO & KONINGS, 2003).

Megasphaera spp

As bactérias do gênero *Megasphaera spp* se apresentam sob a forma de cocos, são imóveis e anaeróbios estritos. A multiplicação ocorre em temperaturas entre 15 e 37°C. Este gênero apresenta duas espécies,

Megasphaera elsdeni e *Megasphaera cerevisiae*. É o micro-organismo anaeróbico mais importante na contaminação de cerveja, pois provocam um odor fecal na cerveja (SOUZA & FAVERO, 2017, SAKAMOTO & KONINGS, 2003).

Gluconobacter spp.

O gênero *Gluconobacter* pertence à família Acetobacteriaceae. São bastonetes, Gram-negativas, aeróbios obrigatórios e não formadoras de esporos. Apresentam temperatura ótima de crescimento entre 25 e 30 °C, e o pH de 5,5. Espécies desse gênero podem ser encontrados no meio ambiente (solo), em flores, solo, frutas, mel, sendo as mais comuns: *Gluconobacter oxidans*, *Gluconobacter cerinus*, *Gluconobacter frateurii*, *Gluconobacter asaii*, *Gluconobacter albidus*, *Gluconobacter thailandicus*. Estão relacionadas como agente deteriorante na indústria cervejeira e de bebidas em geral. Essas bactérias produzem sabores indesejáveis principalmente de vinagre por ter a capacidade de produzir ácido acético a partir da oxidação do álcool, formação de gás, alteração da viscosidade do produto. O aumento de recipientes plásticos no envase de bebidas e os conservantes utilizados como o ácido sórbico, ácido benzóico e os altos níveis de oxigênio, contribuem para o crescimento da bactéria visto que a mesma é resistente a sanitizantes e conservantes utilizados durante o envase de bebidas (OLIVEIRA et al., 2010).

As bactérias do gênero *Acetobacter* também produzem ácido acético, fornecendo um sabor característico e indesejável de vinagre na cerveja.

A família das enterobactérias (*Escherichia*, *Aerobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter* e *Obesumbacterium*) também podem contaminar a cerveja, além de ocasionar danos ao produto (CARVALHO et al., 2006). As

enterobactérias apresentam-se sob a forma de bacilos Gram-negativos, podendo ser imóveis ou móveis. São anaeróbios facultativos e desenvolvem-se a temperatura de 37°C, algumas linhagens têm temperaturas ótimas entre 25 e 30°C. A presença de enterobactérias está associada como indicador para possível contaminação fecal decorrente de condições higiênicas precárias durante ou pós o processamento (FELIPE, 2008).

Zymomonas spp.

A bactéria *Zymomonas mobilis* é móvel, Gram-negativa, não formadora de esporos, anaeróbia facultativa, catalase positiva. Apresenta-se sob a forma de bastonete, normalmente são encontrados em pares. Essa bactéria para geração de energia suficiente para o crescimento, necessita catabolizar substratos com altas taxas de carbono resultando em baixos rendimentos de biomassa. Além de etanol a *Zymomonas mobilis* produz também pequenas quantidades de lactato, ácido acético, glicerol, acetoína, dihidroxicetona, sorbitol, manitol, ácido glicônico e acetaldeído. Crescem em temperatura de 30 a 36°C (ERNANDES, GARCIA-CRUZ, 2009).

Essa bactéria causa turvação, produz sulfeto de hidrogênio (H₂S) e acetaldeído que são indesejáveis na cerveja. É mais comum em cervejas que utilizam a adição de açúcar em sua fórmula sob a forma de adjuntos. A presença está relacionada a contaminações provenientes do ambiente. Fermenta glicose, frutose e sacarose e pode ser considerado uma das melhores bactérias produtoras de etanol a partir de fontes como glicose e

frutose É uma bactéria resistente ao lúpulo e pode se multiplicar em cervejas com pH acima de 3,4 (LANGONE, 2012).

4.6.3 Bolores e Leveduras

A cerveja pode ser contaminada com bolores dos gêneros *Fusarium* spp. *Aspergillus* spp. *Penicillium* spp. *Rhizopus* spp. e leveduras selvagens que crescem em pH baixo. Os bolores podem contaminar a cerveja através dos esporos que são carregados pelo ar. As leveduras selvagens podem contaminar a cerveja ocasionando turbidez, odores e sabores indesejáveis, além de criar uma espécie de película na superfície da cerveja. A levedura comumente encontrada nesses casos é a *Brettanomyces* spp. (SOUZA & FAVERO, 2017).

As leveduras contaminantes são pertencentes em dois grupos: as do gênero *Saccharomyces* e as não-*Saccharomyces* (*Brettanomyces*, *Debaryomyces*, *Filobasidium*, *Zygosaccharomyces*, entre outros). As leveduras selvagens *Saccharomyces diastaticus* representam o maior risco de contaminação, devido à sua similaridade fisiológica e morfológica com o fermento inoculado da levedura *S. cerevisiae* (LATORRE, 2016).

Bretanomyces spp

Atualmente, as espécies pertencentes ao gênero são *Brettanomyces/Dekkera*: *B. anomalus*, *B. bruxellensis*, *D. bruxellensis*, *B. custersianus*, *B. naardensis* e *B. nanus*. São encontradas no meio ambiente, solo, frutas, flores. Possuem a capacidade de sobreviver longos períodos de tempo no ambiente e de iniciar o crescimento em produtos em

armazenamento. Apresentam-se sob a forma oval ou elíptica. Pode formar esporo (*Dekkera*). De crescimento lento, depende de fontes de carbono específicas (glicose, frutose, galactose, sacarose, maltose e trealose). A temperatura ótima de crescimento de 25°C a 32°C. São produtoras de grande quantidade de ácido acético e essa característica atrapalha o crescimento das leveduras do gênero *Saccharomyces sp* (PEDRO, 2014). São fermentadoras de dextrinas, e a produção de ácido acético ocorre a partir da glicose. Pode também formar alguns compostos fenólicos fornecendo sabores indesejáveis que são produzidos por enzimas específicas (ROCHA et al, 2004).

4.6.4 Meios de Cultivo Microbiológico no Controle de Qualidade da Cerveja

Os métodos mais utilizados para a análise de bactérias e leveduras deteriorantes da cerveja são realizados através de cultivo microbiológico em meio de cultura seletivos. Embora não seja uma metodologia que proporcione resultados rápidos e de alta sensibilidade, são os mais utilizados atualmente devido ao custo benefício. Organizações internacionais cervejeiras como a European Brewery Convention (EBC), recomendam a utilização dos meios de cultura presentes nas tabelas 2 e 3 para análises de contaminantes (DRAGONE ET AL., 2007). A suplementação dos meios são realizadas de acordo com as características das bactérias que se deseja cultivar, porém os meios não são específicos para cada espécie. Os períodos de incubação são extensos e isso dificulta o controle de qualidade das cervejarias. Assim, alguns trabalhos tem sugerido o uso de métodos rápidos métodos rápidos como o PCR ou ELISA, para a detecção mais rápida de contaminantes. Porém, esses

métodos apresentam custos mais altos, além de pessoal qualificado para a aplicação. Bactérias como *Megasphaera* e *Pectinatus* possuem dificuldade de cultivo devido as condições anaeróbias estritas próprias (SAKAMOTO e KONINGS, 2003).

Para a detecção de leveduras selvagens é sugerida a utilização de vários meios seletivos, sendo que a combinação desses dependerá do tipo de levedura. São indicados os meios MYGP (extrato de malte e levedura, glicose e peptona) com 200 ppm de CuSO₄, XMACS (meio contendo xilose, manitol, adonitol, celobiose e sorbitol), meio lisina ou meio CLEN (contendo cadaverina, lisina, etilamina e nitrato) (DRAGONE ET AL., 2007). As tabelas 2 e 3 apresentam os meios de cultura utilizados na detecção de contaminantes e sugeridos pelas organizações internacionais.

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

^aEBC, European Brewery Convention; ASBC, American Society of Brewing Chemists; BCOJ, Brewery Convention of Japan.

^bBAL, Bactérias ácido lácticas.

^cG(-), Bactérias Gram-negativas.

TABELA 2. Meios seletivos de cultivo recomendados pela EBC,ASBC e BCOJ para a detecção de bactérias deteriorantes da cerveja (SAKAMOTO e KONINGS, 2003).

Tipos de amostra	Método mais recomendado	Deteção
Amostras de levedura Inóculo (fermento de carga) Cultura pura de levedura Recolha (fermento de propagação) Sedimentos de levedura	NBB-Boullion (NBB-B)	<i>Lactobacillus</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Pectinatus</i> , <i>Megasphaera</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Leuconostoc</i> e <i>Zymomonas</i> .
Cerveja não filtrada Sala de fermentação Cerveja não maturada Cerveja de trigo	NBB-Concentrado (NBB-C)	Todas as bactérias contaminantes de cerveja, especialmente lactobacilos (<i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. lindneri</i> e <i>Lb. brevisimilis</i>), <i>Pediococcus</i> (<i>P. damnosus</i>), <i>Pectinatus</i> e <i>Megasphaera</i> . Também indicador de germes (<i>Acetobacter</i>).
Amostras de cerveja filtrada e água Água de enxágüe Cerveja após filtração Cerveja de tanques de pressão Cerveja de envasamento Cerveja engarrafada Chope	NBB-Ágar (NBB-A)	Todas as bactérias contaminantes de cerveja, especialmente lactobacilos (<i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. lindneri</i> e <i>Lb. brevisimilis</i>), <i>Pediococcus</i> (<i>P. damnosus</i>), <i>Pectinatus</i> e <i>Megasphaera</i> .
Pontos de contaminação Produção (exemplos: bombas, linhas de cerveja, juntas de vedação, by-passes e outros) Área de envasamento (exemplos: envasador, estrelas, válvulas, ajustamentos, lacrador, lavador, inspetor de garrafas)	NBB-Boullion-AM (NBB-B-AM)	Todas as bactérias contaminantes de cerveja. Germes indicadores: biofilmes. Microorganismos formadores de muco/placa (<i>Acetobacter</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , etc.).

TABELA 3. Meios seletivos de cultivo NBB suplementados com nutrientes para deteção de microrganismos contaminantes da cerveja (DÖLHER, 2001). Adaptado por Dragone et al., 2007.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A contaminação microbiana na produção de cerveja pode ocorrer em vários pontos durante o processo de elaboração da bebida, desde a escolha da matéria prima até o envase. É importante o controle de todos os insumos utilizados, uma vez que a contaminação microbiana afeta a qualidade sensorial do produto ocasionando prejuízos monetários e comerciais para o produtor.

Apesar das características da cerveja não facilitarem o desenvolvimento de micro-organismos, devido a fatores como pH, alterações de temperatura, baixa concentração de nutrientes, podem ocorrer contaminações que alteram o produto produzindo turbidez, sabor amanteigado ou ácido, aromas e sabores indesejados.

Na indústria cervejeira é necessária a análise criteriosa da matéria prima, desde a água utilizada até os insumos, sanitização dos equipamentos e dos manipuladores, bem como todo o processo fermentativo, afim de garantir que a bebida seja de qualidade e não apresente características sensoriais indesejáveis. A realização periódica de análises microbiológicas é primordial para o acompanhamento da qualidade do produto.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMBEV. Disponível em: <https://www.ambev.com.br/marcas/cervejas>. Acesso: 20 de Setembro de 2017,

ACERVA PAULISTA – Associação dos cervejeiros artesanais Paulista - Apostila de Produção Caseira de Cerveja - VERSÃO: 0.4 ALPHA AUTORES: ALEX WIRZ VIEIRA – Disponível: < <https://xa.yimg.com/kq/groups/25660352/1771330033/name/Apostila+de+Producao+Artesanal+de+Cerveja+0.4.pdf>>. Acesso: 11 de outubro de 2017.

BORTOLI, DAIANE ALINE DA SILVA; SANTOS, FLÁVIO DOS; STOCCO, NÁDIA MONIQUE; ORELLI JR., ALESSANDRO; TOM, ARIEL; NEME, FERNANDA FAGANELLO; NASCIMENTO, DANIELA DEFAVARI. Multiplicação de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) cervejeiras utilizando meios de cultura a base de açúcar mascavo. Bioenergia em revista: diálogos, ano 3, n. 2, p. 50-68, jul./dez. **2013**. Disponível em: < <https://www.researchgate.net/publication/275021599> >. Acesso: 10 de Setembro de 2017.

BORTOLI, DAIANE A. DA S.; SANTOS, FLÁVIO DOS; STOCCO, NÁDIA M.; ORELLI JR., ALESSANDRO; TOM, ARIEL; NEME, FERNANDA F.; NASCIMENTO, DANIELA DEFAVARI; Leveduras e produção de cervejas – Revisão, bioenergia em revista: diálogos, ano 3, n. 1, p. 45-58, jan./jun. 2013 Disponível em: < <https://www.researchgate.net/publication/275021630> >. Acesso: 15 de Setembro de 2017.

BOULTON, C.; QUAIN, D. Brewing Yeast & Fermentation. London: Blackwell Publishing, 2006. p. 510-585. 2008. Disponível em: < http://www.academia.edu/26298161/Produ%C3%A7%C3%A3o_de_cerveja_microrganismos_deteriorantes_e_m%C3%A9todos_de_detec%C3%A7%C3%A3o >. Acesso: 02 de Setembro de 2017

CARVALHO, G. B. M.; BENTO, C. V.; SILVA, J. B. A. Elementos Fundamentais no Processo Cervejeiro: 1ª parte- As leveduras. Revista Analítica. São Paulo, 2006. Disponível em: < https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4075236/mod_resource/content/1/Carvalho2006%20Artigo_Analitica_1_As_Leveduras.pdf>. Acesso: 02 de Setembro de 2017.

CARVALHO, DE GUERREIRO LILIAN. REDETEC. Rede de Tecnologia do Rio de Janeiro. Produção de Cerveja. Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas. Março de 2007.

Disponível em: < <http://www.sbrt.ibict.br/dossie-tecnico/downloadsDT/NTc=>>. Acesso: 10 de Setembro de 2017.

DANIELSEN, M, P.J. SIMPSON, E.B. O'CONNOR, R.P. ROSS AND C. STANTON. Susceptibility of *Pediococcus* spp. to antimicrobial agentes. Journal of Applied Microbiology, Volume 102, Issue 2, pages 384–389, February 2007.

Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.2006.03097.x/full> > Acesso: 15 de Novembro de 2017.

D'AVILA, FARIAS ROSEANE; LUVIELMO, MELLO DE MARCIA; MENDONÇA, ROSANE CARLA; JANTZEN, MONKS MÁRCIA. Adjuntos utilizados para produção de cerveja: características e aplicações. Estudos Tecnológicos em Engenharia, vol. 8, N. 2, p. 60-68, jul/dez 2012.

Disponível em: <http://revistas.unisinis.br/index.php/estudos_tecnologicos/article/download> Acesso: 20 de Novembro de 2017.

DRAGONE, G.; MUSSATTO, S. I.; NOGUEIRA, A. D.; et al. Produção de cerveja: microrganismos deteriorantes e métodos de detecção. Brazilian Journal of Food Technology, 2008, v. 10, p. 240-25. Disponível em: 10 de Agosto de 2017.

<http://www.academia.edu/26298161/Produ%C3%A7%C3%A3o_de_cerveja_microrganismos_deteriorantes_e_m%C3%A9todos_de_detec%C3%A7%C3%A3o >. Acesso: 15 de novembro de 2017.

DE PAULA NOBRE, THAIS, JORGE HORII, ANDRÉ RICARDO ALCARDE, Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação, Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 27(1): 20-25, jan.-mar. 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-20612007000100004&script=sci_abstract&lng=pt >. Acesso: 02 de Outubro de 2017.

EMBRAPA, Manual de Curadores de Germoplasma – Micro-organismos: Bactérias Ácido-Láticas, 2011. Disponível: < <https://www.embrapa.br/documents/1355163/2005846/doc336-151.pdf/4c82dbc8-73bd-4689-a47e-5819e3f1ffc7>>. Acesso: em 27 de Novembro de 2017.

ERNANDES, PAGANE GUERESCHI MARIA FERNANDA; GARCIA-CRUZ, HUMBERTO CRISPIN *Zymomonas mobilis*: um microrganismo promissor para a fermentação alcoólica. Seminário: Ciências Agrárias, Londrina, v. 30, n. 2, p. 361-380, abr./jun. 2009. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/42572/WOS000267690100011.pdf?sequence=1>>. Acesso: 02 de Novembro de 2017.

ESTEVINHO, M LETICIA. Leveduras e fermentações: O caso da cerveja. Centro de Investigação de Montanha – Instituto Politécnico de Bragança; Departamento de Biologia e Biotecnologia da Escola Superior Agrária de Bragança. 2015.

Disponível em:< <https://bibliotecadigital.ipb.pt/bitstream/10198/11625/3/LivroDeActas.pdf#page=59>>
Acesso: 10 de Setembro de 2017.

FERREIRA, HERMOGENES RUBENS; VASCONCELOS, CELESTE MARIA; VALERIA, JUDICE MARTINS; NEVES, RAMOS TADEU JORGE. Inovação na fabricação de cervejas especiais na região de Belo Horizonte. Perspectivas em Ciência da Informação, v.16, n.4, p.171-191, out./dez. 2011.

Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/pci/v16n4/v16n4a11>>. Acesso: 14 de Setembro de 2017.

HATOUM, R.; LABRIE, S.; FLISS, I. Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: from fundamental to novel applications. Frontiers in Microbiology. v. 3, a.421, p. 1-12. doi: 10.3389/fmicb.2012.00421. 2012.
Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3525881/>>. Acesso: 01 de Outubro de 2017.

LANGONE, JULIO CAROLINA ANA. Prevalência de *Zymomonas mobilis* em ambiente de indústrias cervejeiras no Brasil. Universidade federal do rio grande do sul instituto de ciência e tecnologia de alimentos curso de engenharia de alimentos. Monografia .2012

Disponível em: < <http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/72776>> Acesso:13 de Outubro de 2017.

LATORRE, MAILÉN A. Incidencia de contaminantes microbianos en cervezas artesanales embotelladas de la Patagonia Andina. Trabalho de Conclusão de Curso.Universidad Nacional del Comahue Centro Regional Universitario Bariloche. 2016

Disponível em:

<http://www.conicet.gov.ar/new_scp/detalle.php?keywords=&id=50185&congresos=yes&detalles=yes&congr_id=3351326>. Acesso: 03 de Setembro de 2017.

LIMA, E. R. A.; TÔRRES, A. R.; "Otimização do processo de fermentação alcoólica para produção de etanol hidratado", p. 2362-2369. In: Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química - COBEQ 2014 - Blucher Chemical Engineering Proceedings, v.1, n.2. São Paulo: Blucher, 2014. Disponível em: <

<http://pdf.blucher.com.br.s3-sa-east>

1.amazonaws.com/chemicalengineeringproceedings/cobeq2014/1659-18176-156101.pdf >. Acesso:

LUDWIG, K.M.; OLIVA-NETO, P.; ANGELIS, D.F. de. Quantificação da Floculação de *Saccharomyces cerevisiae* por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 21, n. 1, p. 63-68, 2001.

Disponível em: < <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/6523>>. Acesso: 01 de Outubro de 2017.

MARCUSSI, ALEXANDRE ALMEIDA. Cervejas selvagens – parte II – como e onde se produzem Lambics? 2013. Disponível em: <<http://ocrueomaltado.blogspot.com.br/2013/05/cervejas-selvagens-parte-iii-como-e.html>> Acesso: 15 de Novembro de 2017.

MATÉRIA PRIMA PARA AÇÚCAR E ÁLCOOL, 2, 2012, Sertãozinho, CEISE – A CANA- DE- AÇÚCAR. Sertãozinho: MTA UFSCAR, 2012.p.13.

MARTINS, IZADORA F.; FUZIOKA, PÂMELA U.; SILVA, ALEXSANDRO M. Processo de produção da cerveja. II Simpósio de assistência farmacêutica, 2014. Disponível em: <<http://www.saocamillo-sp.br/novo/eventos-noticias/saf/resumo-24.pdf>> Acesso: 10 de Novembro de 2017.

MARTINS, SILVEIRA CLAUDIA SUZANA; LIMA, FELIX RENATA; MARTINS, MIRANDA CLÁUDIA. Isolamento e caracterização de leveduras de caldo de cana de uma indústria de fermentação alcoólica no nordeste brasileiro, *enciclopédia biosfera*, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.11 n.22; p. 2015.

Disponível em: <

<http://www.conhecer.org.br/enciclop/2015c/biologicas/Isolamento%20e%20caracterizacao.pdf>>.

Acesso: 14 de Setembro de 2017.

MEGA, JÉSSICA FRANCIELI, NEVES, ETNEY, JOSÉ DE ANDRADE, CRISTIANO. A produção da cerveja no Brasil. *Revista CITINO*. Vol. 1, No. 1, Outubro-Dezembro de 2011.

Disponível em: <<https://www.hestia.org.br/wp-content/uploads/2012/07/CITINOAno1V01N1Port04.pdf>>.

Acesso: 02 de Outubro de 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE.PORTARIA Nº 2914, DE 12 DE DEZEMBRO DE 2011.

OLIVEIRA, DORINI LUIZ ANDRE; JUNIOR, SANTOS VITORINO; LIOTTI, GRAZIELA RHAVENA; ZILIOI, ESTEVÃO; SPINOSA, APARECIDA WILMA; RIBEIRO-PAES, TADEU JOÃO. Estudo de bactérias do gênero *Gluconobacter*: isolamento, purificação, identificação fenotípica e molecular. *Ciênc. Tecnol. Aliment. Campinas*, 30(1): 106-112, jan.-mar. 2010. Disponível em < <http://www.scielo.br/pdf/cta/v30n1/v30n1a16.pdf> >. Acesso: 17 de Novembro de 2017.

PEDRO, DIANA NASCIMENTO SÍLVIA. Quantificação de leveduras do gênero *Brettanomyces/Dekkera* em Vinhos de Qualidade. Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar. Instituto politécnico de Bragança. Página 5. 2014

Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10198/11524>>. Acesso: 20 de Outubro de 2017.

ROSA, A. N.; AFONSO, C. J. Química da Cerveja. Revista Quím. nova esc. – São Paulo-SP, BR. Vol. 37, N° 2, p. 98-105, maio de 2015. Disponível em: < http://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc37_2/05-QS-155-12.pdf >. Acesso: 10 de Setembro de 2017.

ROCHA, C. D.1; SCHMIDT, H. J.2; MONTEIRO, C.3; ODEBRECHT, E.3. Deterioração de refrigerantes por leveduras. Visão Acadêmica, Curitiba, v. 5, n. 2, p. 95-100, Jul.- Dez./2004 - ISSN: 1518-5192

Disponível em: <<http://revistas.ufpr.br/academica/article/download/553/461>>. Acesso: 01 de Setembro de 2017.

SAKAMOTO KANTA, KONINGS AND WIL N.. Beer spoilage bacteria and hop resistance. International Journal of Food Microbiology 89, 105– 124, 2003.

Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14623377>>. Acesso: 17 de Setembro de 2017.

SOUZA, DE SANTOS ROSENILDA; FAVERO, MATOS DIEGO. Correlação entre a redução da carga microbiológica e a inativação da enzima invertase na etapa de pasteurização da cerveja. Revista Mundi Meio Ambiente e Agrárias. Curitiba, PR, v. 2, n. 1, 15, jan./jun., 2017

Disponível em: <

<http://periodicos.ifpr.edu.br/index.php?journal=MundiMAA&page=article&op=view&path%5B%5D=317&path%5B%5D=109>>. Acesso : 15 de Setembro de 2017.

STEINLE, LUIS ANTONIO. Monografia apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Gestão do Setor Sucoenergético – MTA. Fatores que interferem na fermentação alcoólica, 2013. Disponível em: <<http://www.etanol.ufscar.br/trabalhos-mta/sertaozinho-iii-c/trabalhos/fatores-que-interferem-na-fermentacao-alcoolica> >. Acesso: 08 de Novembro de 2017.

VAUGHAN, A.; O'SULLIVAN, T.; VAN SINDEREN, D. Enhancing the microbiological stability of malt and beer – A review. Journal of the Institute of Brewing, London, v. 111, n. 4, p. 355-371, 2005.

VIANA, LOMBA MONTEIRO TIAGO. Caracterização bioenergética de *saccharomyces cerevisiae* em fermentação vinária. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Alimentar. Universidade Técnica de Lisboa. 2009.

Disponível

em:<https://www.researchgate.net/profile/Tiago_Viana2/publication/277162466_Caracterizacao_bioenergetica_de_Saccharomyces_cerevisiae_em_fermentacao_vinaria>. Acesso: 02 de Setembro de 2017.

VRIESEKOOOP, FRANK. KRAHL, MORITZ, HUCKER, BARRY, MENZ, GARRY. Bacteria in brewing: The good, the bad and the ugly, INSTITUTE OF BREWING & DISTILLING, 2013.