



Isolamento e Análise de Micro-organismos em Processos Cervejeiros, comparando-se Metodologia Convencional e Petrifilm BAL

Letícia Korin Moretti

Projeto de Final de Curso

Orientadores:

Prof^a. Karen Signori Pereira, D.Sc.

Thaís Fernandes Justo, Eng. Alimentos.

Fevereiro de 2018

**ISOLAMENTO E ANÁLISE DE MICRO-ORGANISMOS EM
PROCESSOS CERVEJEIROS, COMPARANDO-SE
METODOLOGIA CONVENCIONAL E PETRIFILM BAL**

Letícia Korin Moretti

Projeto de Final de Curso submetido ao Corpo Docente da Escola de Química, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Engenheira de Alimentos.

Aprovado por:

Camilla Pires de Souza, M. Sc.

Lauro Luís Martins Medeiros de Melo, D. Sc.

Fernando Cunha Peixoto, D. Sc.

Orientado por:

Prof^ª. Karen Signori Pereira, D.Sc.

Thaís Fernandes Justo, Eng. Alimentos.

Rio de Janeiro, RJ - Brasil
Fevereiro de 2018

Moretti, Letícia Korin.

Isolamento e Análise de Micro-organismos em Processos Cervejeiros, comparando-se Metodologia Convencional e Petrifilm BAL/ Letícia Korin Moretti. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2018.

viii, 56p.;il.

(Projeto Final)–Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2018.

Orientadores: Karen Signori Pereira e Thaís Fernandes Justo.

1. Cerveja. 2. Bactérias ácido lácticas. 3. Petrifilm. 4. Projeto Final. (Graduação – UFRJ/EQ). 5. Karen Signori Pereira, D. Sc., Thaís Fernandes Justo, Eng. Alimentos.

*“O tempo deixa perguntas, mostra respostas, esclarece dúvidas...
Mas, acima de tudo, o tempo traz verdades”*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me amparado nos momentos mais difíceis ao longo destes anos. Por diversas vezes foi o responsável por eu continuar e conseguir chegar ao fim desta caminhada. Agradeço por ter colocado em meu caminho pessoas incríveis e que, cada uma de forma especial, tiveram papel essencial na formação de quem sou hoje.

Agradeço à minha mãe, Luzia, e à minha tia Célia por todo apoio e toda a confiança em mim depositada. Sei que o caminho trilhado para que eu pudesse estar aqui não foi fácil e sou imensamente grata por todo o esforço. Agradeço também ao meu pai que, mesmo não estando mais fisicamente presente, sei que me vigiou e zelou por mim.

Agradeço à minha avó, Tomie, e a minha tia Tsutae por toda a torcida desde o dia em que ingressei na UFRJ. Sei que, mesmo distantes e nos vendo tão pouco, torceram por mim.

Agradeço ao meu namorado, Augusto, por todo apoio ao longo deste período estressante. Obrigada por sempre estar ao meu lado, me amparando e se preocupando para que tudo estivesse bem. Agradeço pelo carinho, atenção e pelas críticas quando necessárias.

Agradeço à minha segunda família, Marília, Almiro, Mariana e Manoel, que me acolheram com tanto carinho. Vocês foram meu porto seguro no Rio de Janeiro. Sempre que eu sentia a tristeza de estar longe da minha família vocês estavam lá para me amparar. Muito obrigada.

Agradeço à minha professora e orientadora Karen Signori, por ser um exemplo de profissional apaixonada pelo que faz. A dedicação e o amor pela Engenharia de Alimentos, apesar de todas as dificuldades que este curso enfrenta, me faz acreditar que fiz a escolha certa. Obrigada por ter aceitado meu pedido de orientação e por me aceitar no MicrAlim.

Agradeço à minha co-orientadora Thaís Justo por toda a atenção e dedicação, tanto dentro como fora do laboratório. Obrigada por ter me acolhido e por todos os ensinamentos transmitidos. Agradeço pelas conversas nos momentos de descontração e todo apoio sempre que precisei. Sou muito grata pelo carinho e pela paciência.

Agradeço à Simone Rodrigues, Thays Alves, Káthia Coelho, Paola Fernanda, Ariane Alves, Fernanda Ferreira pelo companheirismo ao longo destes anos em que moramos juntas.

Agradeço aos professores envolvidos na minha formação. Cada um teve sua contribuição, de forma especial, para a formação do meu caráter profissional.

Agradeço a todos os funcionários da Escola de Química sem os quais nada disso seria possível.

Resumo do Projeto de Final de Curso apresentado à Escola de Química como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Engenharia de Alimentos.

ISOLAMENTO E ANÁLISE DE MICRO-ORGANISMOS EM PROCESOS CERVEJEIROS, COMPARANDO-SE METODOLOGIA CONVENCIONAL E PETRIFILM BAL

Letícia Korin Moretti

Fevereiro, 2018

Orientadores: Prof^ª. Karen Signori Pereira, D. Sc.
Thaís Fernandes Justo, Eng. Alimentos.

A cerveja é um produto considerado estável microbiologicamente por ser uma matriz com condições adversas para o desenvolvimento de grande parte dos micro-organismos. Apesar disso, alguns são capazes de causar a deterioração da bebida e diversas etapas produtivas são fontes de contaminação. Dentre os micro-organismos deterioradores, a maior parte dos casos (até 70%) ocorre pela presença de bactérias ácido lácticas. Existem métodos tradicionalmente utilizados para a detecção de micro-organismos ao longo da cadeia produtiva. Porém, devido a diversos interferentes nestes métodos, novas técnicas estão sendo desenvolvidas recentemente, os chamados métodos rápidos. O presente estudo teve como objetivo a comparação de dois meios de cultura convencionais destinados a bactérias ácido lácticas com um método alternativo. Foram analisados grãos maltados, amostras ambientais de uma planta de produção de cervejas artesanais e o resíduo produzido. Foi realizada a contagem total (expressa em logUFC/mL) para a comparação dos meios convencionais de Man, Rogosa e Sharpe (MRS) e Orange Serum Agar (OSA) e o Petrifilm[®]. Foram isoladas algumas colônias com base em seu comportamento de crescimento. Estes isolados foram submetidos à caracterização microbiológica bem como à identificação utilizando espectrometria de massas. A contagem total das amostras resultou em valores entre 0,00 e 5,03 logUFC/mL. Desta forma foi possível observar a maior seletividade do Petrifilm com relação aos meios convencionais, visto que as contagens referentes aquele meio foram menores para a maior parte das amostras. A caracterização e identificação microbiológica permitiram observar a presença de bactérias Gram-positivas e leveduras tanto no MRS como no OSA. Este resultado reflete a menor seletividade destes meios, permitindo o desenvolvimento de uma maior variedade de micro-organismos. Por outro lado, percebeu-se, além de bactérias Gram-positivas, a presença de leveduras em dois isolados do Petrifilm. A identificação destes micro-organismos em um meio seletivo para bactérias lácticas indica que, apesar da tecnologia aplicada, esta linhagem de leveduras encontrou condições para seu desenvolvimento. Desta forma, é possível concluir que o Petrifilm apresenta maior seletividade microbiológica quando comparado com os meios convencionais, embora pareça não ser suficiente para o desenvolvimento exclusivo de bactérias ácido lácticas.

SUMÁRIO

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 4 |
| 2.1 | Cerveja..... | 4 |
| 2.1.1 | Definições..... | 4 |
| 2.1.2 | Matérias-primas..... | 4 |
| 2.1.3 | Processo produtivo..... | 8 |
| 2.2 | Microbiologia da cerveja: Presença de deterioradores..... | 11 |
| 2.2.1 | Microbiologia característica e deterioradores..... | 11 |
| 2.2.2 | Bactérias ácido lácticas (BAL)..... | 12 |
| 2.3 | Métodos de análise..... | 14 |
| 2.3.1 | Métodos convencionais..... | 14 |
| 2.3.2 | Espectrometria de massas – MALDI-TOF..... | 16 |
| 3 | OBJETIVOS..... | 19 |
| 3.1 | Objetivo geral..... | 19 |
| 3.2 | Objetivos específicos..... | 19 |
| 4 | MATERIAIS E MÉTODOS..... | 20 |
| 4.1 | Preparo das amostras..... | 20 |
| 4.2 | Análise microbiológica..... | 21 |
| 4.3 | Caracterização microbiológica..... | 22 |
| 4.4 | Identificação microbiológica..... | 23 |
| 4.5 | Análise estatística..... | 23 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 24 |
| 5.1 | Análise microbiológica..... | 24 |
| 5.2 | Caracterização e identificação microbiológica..... | 26 |
| 5.2.1 | Grãos de malte..... | 30 |
| 5.2.2 | Tanque de mosturação..... | 31 |

| | | |
|-------|---|----|
| 5.2.3 | Saída do trocador de calor | 32 |
| 5.2.4 | Mangueira de transferência | 34 |
| 5.2.5 | Fermentador 1 – Válvula inferior | 34 |
| 5.2.6 | Fermentador 2 – Válvula superior e inferior | 37 |
| 5.2.7 | Bagaço de malte..... | 39 |
| 6 | CONCLUSÕES | 42 |
| 7 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 43 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Grãos de malte | 5 |
| Figura 2. Inflorescências do lúpulo (<i>Humulus lupulus</i>) e sua forma fracionada (<i>pellets</i>) | 6 |
| Figura 3. Células de leveduras..... | 7 |
| Figura 4. Esquema simplificado do processo de produção de cerveja. | 8 |
| Figura 5. Placas de Petrifilm AC Bactérias ácido lácticas | 16 |
| Figura 6. Esquema ilustrativo do método de MALDI-TOF. | 17 |
| Figura 7. Locais de coleta: tanque de mosturação, saída do trocador de calor, mangueiras de transferência e de envase, fermentador (válvula de saída de produto e válvula de saída do extrato de levedura), resíduo..... | 21 |
| Figura 8. Esquema generalizado para realização das diluições seriadas..... | 22 |
| Figura 9. Cocobacilos Gram-positivos isolados dos grãos de malte..... | 30 |
| Figura 10. Cocos Gram-positivos e bastonetes Gram-positivos isolados do tanque de mosturação..... | 31 |
| Figura 11. Cocos Gram-positivos identificados no MRS e no Petrifilm isolados da saída do trocador de calor. | 32 |
| Figura 12. Leveduras identificadas no Petrifilm isolados da saída do trocador de calor | 33 |
| Figura 13. Bacilos Gram-positivos identificadas no MRS isolados da mangueira de transferência..... | 34 |
| Figura 14. Bastonetes Gram-positivos e cocobacilos Gram-positivos no Petrifilm isolados do fermentador 1 (v. superior)..... | 35 |
| Figura 15. Cocos Gram-positivos em cadeia identificados no MRS isolados do fermentador 2 (v. superior)..... | 36 |
| Figura 16. Leveduras identificados no MRS e OSA isolados do fermentador 2 (v. superior) | 37 |
| Figura 17. Cocobacillus Gram-positivos e leveduras identificados no Petrifilm isolados do fermentador 2 (v. superior)..... | 38 |
| Figura 18. Leveduras identificadas no MRS e OSA isolados do bagaço de malte | 39 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Contagem total média (logUFC/ml) dos grãos de malte, das amostras ambientais e do bagaço de malte. | 24 |
| Tabela 2. Caracterização por microscopia e/ou identificação a partir da análise pelo método de MALDI-TOF MS dos isolados provenientes dos grãos de malte, das amostras ambientais e do bagaço de malte e seus respectivos meios de cultura. | 27 |

1 INTRODUÇÃO

A cerveja é uma bebida alcoólica fermentada constituída de água, malte e lúpulo (BRASIL, 2009). A água é a matéria-prima majoritária deste produto, chegando a 95% em volume (SILVA, 2005). O principal cereal maltado é a cevada, porém outros cereais podem passar por este processo e serem aplicados na produção cervejeira (VENTURINI e CERADA, 2001). O lúpulo, por sua vez, atua como conservante natural além de ser responsável pelo amargor característico do produto (KEUKELEIRE, 2000; NUNES, 2016; HUGHES et al., 2000).

São utilizados agentes de fermentação, as leveduras, para a transformação do mosto cervejeiro no produto final. As leveduras cervejeiras são divididas, em função do comportamento apresentado durante a fermentação, em *lager* e *ale* (*Saccharomyces pastorianus* e *Saccharomyces cerevisiae*, respectivamente) (FERREIRA et al., 2010; KOURTIS e ARVANITTOYANNIS, 2001; BOKULIGH e BAMFORTH, 2013). O processo de produção é constituído de algumas etapas principais: moagem do malte, mosturação, fervura, fermentação, maturação, acondicionamento e pasteurização. Ao longo do processo transformações físicas, químicas e bioquímicas ocorrem e o controle de todas as etapas é essencial para a obtenção de um produto de qualidade (FERREIRA et al., 2010; TSAROUHAS e ARVANITTOYANNIS, 2010).

Produto considerado estável microbiologicamente, a cerveja é uma matriz com condições adversas para o desenvolvimento de grande parte dos micro-organismos. Apesar disso, alguns são capazes de se desenvolver e causar a deterioração da bebida causando sua descaracterização. Assim, ao longo da linha produtiva deve-se atentar para que não haja a entrada de contaminantes, de forma a permitir o adequado desempenho da levedura inoculada. Diversos pontos, envolvendo quase todas as etapas do processo, são fontes de contaminação e técnicas de controle eficientes devem ser aplicadas (DRAGONE et al., 2007; HILL, 2015; RIBEIRO et al., 2011).

Dentre os micro-organismos deterioradores estão as bactérias Gram-positivas (bactérias ácido lácticas), bactérias Gram-negativas e leveduras selvagens. A maior parte dos casos de contaminação na indústria cervejeira ocorre pela presença de bactérias ácido lácticas. Algumas dessas bactérias são formadoras de diacetil, devido ao desvio em

sua via metabólica, causando a deterioração gerada pela formação de sabor amanteigado na cerveja (DRAGONE et al., 2007; PEYER et al., 2016).

As bactérias ácido lácticas são bactérias Gram-positivas, não formadoras de esporos, microaerófilas ou estritamente anaeróbias, sem motilidade, quimiorganotróficas e nutricionalmente exigentes. Apresentam melhor crescimento em meios com pH reduzido (em torno de 4,5) e seu principal produto metabólico é o ácido láctico. Apresentam-se em vida livre bem como no trato gastrointestinal de humanos e animais (RAMÍREZ et al., 2011; HUERTAS, 2010; FORSYTHE, 2013). Estes microorganismos são classificados com relação ao seu metabolismo em homofermentativos e heterofermentativos. As bactérias homofermentativas produzem apenas ácido láctico ao metabolizar glicose. As bactérias heterofermentativas, por sua vez, produzem ácido láctico, etanol e gás carbônico. Morfologicamente podem ser divididos em cocos e bastonetes (RAMÍREZ et al., 2011; HUERTAS, 2010; FURTADO, 2010; DRAGONE et al., 2007).

Os principais gêneros causadores de deterioração microbiana da cerveja são *Lactobacillus* spp. e *Pediococcus* spp.. As linhagens responsáveis pelo processo de deterioração são resistentes, principalmente, aos compostos presentes no lúpulo (alfa e beta iso-ácidos) que atuam na preservação da bebida. Estudos indicam que as células apresentam uma alteração genética que possibilita a expulsão destes ácidos impedindo sua ação intracelular (SUZUKI, 2011; MENZ et al., 2010; KOURTIS E ARVANITOYANNIS, 2001; DRAGONE et al., 2007).

Existem métodos tradicionalmente utilizados para a detecção de micro-organismos ao longo da cadeia produtiva. Estes métodos envolvem o plaqueamento de alíquotas em meios de cultura, pelo método de *pour plate*. Porém, a execução deste método pode tornar-se trabalhosa e a análise dos resultados depende da interpretação do analista e está susceptível a erros. Desta forma, métodos rápidos foram desenvolvidos nos últimos anos para reduzir o tempo deste tipo de análise e minimizar as interferências (SANT'ANA et al., 2002).

O presente estudo teve como objetivo a comparação de três meios de cultura utilizados para o desenvolvimento de bactérias ácido lácticas. Dois meios convencionais (MRS e OSA) foram comparados com um método rápido de detecção, o Petrifilm[®] AC

Bactérias Ácido Lácticas, com relação à sua seletividade a partir da análise de matéria-prima, amostras ambientais e resíduos produzidos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cerveja

2.1.1 Definições

No Brasil, a padronização, a classificação, o registro, a inspeção e a fiscalização de bebidas são regulamentadas pelo decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009. Segundo o artigo 36 deste regulamento: “Cerveja é 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, 2009). Keukeleire (2000) define cerveja como sendo uma bebida aquosa fermentada baseada em amido e aromatizada com lúpulo. Da mesma forma, Moura-Nunes et al. (2016) pontuam cerveja como uma bebida obtida da fermentação alcoólica do mosto cervejeiro, sendo que os ingredientes combinados de diversas formas resultam em uma bebida quimicamente complexa.

De acordo com a legislação brasileira, a cor da cerveja deve provir das substâncias corantes do malte, sendo que correções podem ser feitas para a padronização do produto como o uso de corante caramelo, por exemplo. A fermentação do mosto deve ser realizada utilizando levedura cervejeira. Sua estabilização biológica deve ser feita por processo apropriado, como a pasteurização na maior parte dos casos. Assim é definido como chope o produto que não foi submetido ao tratamento térmico e cerveja o produto que foi pasteurizado. A água utilizada na produção deve ser potável e tratada de forma a assegurar as características de qualidade do produto (BRASIL, 2009).

2.1.2 Matérias-primas

2.1.2.1 Água

Componente majoritário na cerveja, sendo o produto final constituído de 92 a 95% de água (SILVA, 2005). Desta forma o controle de sua qualidade é essencial para o processo e para a qualidade do produto final (KOURTIS e ARVANITTOYANNIS, 2001). A portaria de consolidação nº 5, de 11 de dezembro de 2017, anexo XX, capítulo V (BRASIL, 2017), define o padrão de potabilidade da água para consumo humano. Desta forma os parâmetros microbiológicos, físicos, químicos e radioativos são estabelecidos e devem ser seguidos para a produção de uma bebida de qualidade.

2.1.2.2 Malte

Produto obtido da germinação controlada de grãos de cereais, seguida de uma etapa de secagem (SILVA, 2005; MIRANDA, 2006; BRASIL, 1978). Na produção cervejeira o principal cereal maltado é a cevada (Figura 1), gramínea do gênero *Hordeum*, por apresentar melhores resultados tecnológicos (VENTURINI e CERADA, 2001). Porém outros cereais, como trigo, milho e aveia, podem ser submetidos ao processo de maltagem (SILVA, 2005; MIRANDA, 2006).



Figura 1. Grãos de malte (Fonte: O Caneco, 2017)

Os grãos devem apresentar limpeza, estado de conservação adequado e seu armazenamento deve ser feito sob condições controladas, como umidade e temperatura (BRASIL, 1978). Na maltearia, o processo divide-se em três etapas: maceração, germinação e secagem (FERREIRA et al., 2010; WOFFENDEN et al., 2001).

Na maceração, os grãos são hidratados em silos com água e há injeção de oxigênio de forma a permitir a respiração dos mesmos. Essa etapa termina quando se percebe o aparecimento da radícula e os grãos apresentam umidade em torno de 45%. Os grãos macerados seguem para a segunda etapa, a germinação, na qual a temperatura é controlada a partir do fluxo de ar entre os grãos. O crescimento do germe dita o fim do processo. A germinação dos grãos é cessada em secadores, na última etapa do processo, devido a retirada da umidade dos grãos (TSAROUHAS e ARVANITTOYANNIS, 2010).

Na maltagem, as cadeias de amido do grão são reduzidas em cadeias menores aumentando sua disponibilidade e solubilidade. Enzimas, principalmente alfa e beta amilases, são formadas e terão papel fundamental na obtenção de um extrato rico em carboidratos fermentescíveis e compostos nitrogenados (SANTOS et al., 2010; FERREIRA et al., 2010; PELEMBE et al., 2002).

A produção e liberação de novas enzimas resultam no aumento do poder diastático do grão, ou seja, o aumento da capacidade enzimática de conversão do amido em açúcares (SANTOS et al., 2010; PELEMBE et al., 2002). É nesta etapa que compostos da reação de Maillard e de caramelização dos açúcares são produzidos, sendo que em temperaturas mais altas, um maior teor destes compostos é produzido, definindo assim a coloração e o aroma do malte (WOFFENDEN et al., 2001).

2.1.2.3 Lúpulo

Planta da espécie *Humulus lupulus*, cujas inflorescências femininas (Figura 2a) são utilizadas, na sua forma natural ou industrializada, na produção cervejeira (KEUKELEIRE, 2000; BRASIL, 2001). O lúpulo pode ser aplicado no processo na sua forma in natura (flores secas) ou em suas formas fracionadas, como *pellets* (Figura 2b), extratos e essências (KEUKELEIRE, 2000; SRINIVASAN et al., 2004).

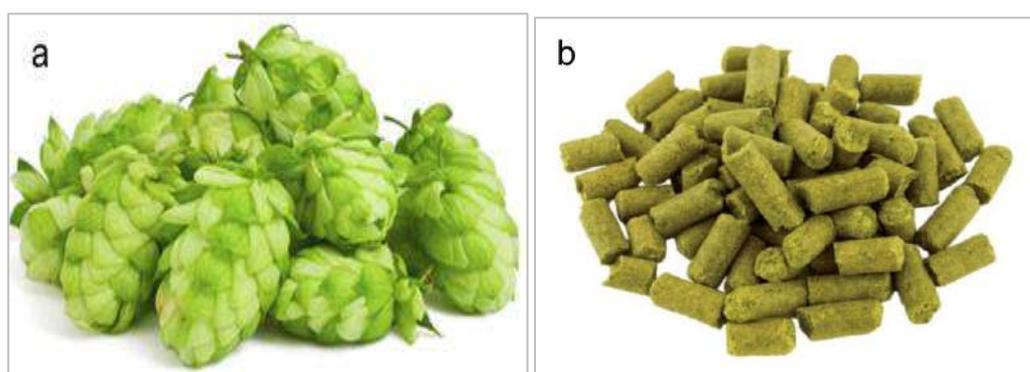


Figura 2. (a) Inflorescências do lúpulo (*Humulus lupulus*) e (b) sua forma fracionada (*pellets*).
(Fonte: EOL e JuanBrew, 2017)

O lúpulo atua como conservante natural da cerveja, protegendo contra oxidação e envelhecimento do produto, bem como contra micro-organismos influenciando diretamente em sua qualidade (KELLNER et al., 2007; KEUKELEIRE, 2000; MOURA-NUNES et al., 2016). A proteção contra oxidação resulta da presença de polifenóis, principalmente taninos, que atuam como antioxidantes no produto final (KELLNER et al., 2007; MOURA-NUNES et al., 2016). Os principais responsáveis pela ação antimicrobiana do lúpulo são os alfa e beta ácidos que são ácidos fracos representados, respectivamente, pela humulona e lupulona (KEUKELEIRE, 2000; SRINIVASAN et al., 2004). Os alfa-ácidos são também os principais responsáveis pelo amargor. Eles sofrem isomerização na etapa de mosturação formando alfa-iso-ácidos

(ou iso-humulonas), compostos mais amargos e solúveis que os alfa-ácidos (HUGHES, 2000).

Apesar da pequena quantidade utilizada no processo, o lúpulo apresenta impacto importante na qualidade do produto final sendo responsável pelo seu aroma e amargor característicos (KEUKELEIRE, 2000; MOURA-NUNES et al., 2016; HUGHES et al., 2000).

2.1.2.4 Adjuntos

A legislação brasileira permite a substituição de parte do malte (até 45% do extrato primitivo) pelos chamados adjuntos cervejeiros. Estes substitutos são matérias-primas opcionais fontes de carboidrato utilizadas em conjunto com o malte na produção cervejeira (FERREIRA et al., 2010; BRASIL, 2001). São geralmente adicionados por apresentarem formas menos complexas (mais acessíveis) de açúcares para as leveduras (BROOKS et al., 2002). Cereais como milho, trigo, arroz e sorgo são comumente utilizados, bem como amidos e açúcares (cristais ou xaropes) (BRASIL, 2001).

2.1.2.5 Leveduras

As leveduras (Figura 3) são micro-organismos do reino Fungi, unicelulares, heterótrofos com reprodução por brotamento. Sua principal aplicação é em processos fermentativos, como produção de pão, cerveja e vinho. Os produtos obtidos do metabolismo das leveduras são diversos, sendo o etanol o principal desejado na produção cervejeira. O principal gênero utilizado como agente de fermentação do mosto é *Saccharomyces* spp. (FERREIRA et al., 2010).

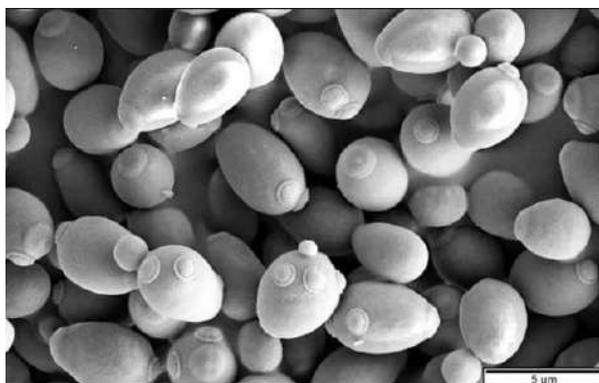


Figura 3. Células de leveduras. (Fonte: LabNetwork, 2017)

Existem dois tipos de levedura: de alta fermentação e de baixa fermentação. Essa denominação influencia diretamente o processo tecnológico na linha de produção, especificamente na etapa de separação. Na baixa fermentação são utilizadas leveduras “lager”, geralmente *Saccharomyces pastorianus*. Elas caracterizam-se por decantar no fundo do tanque ao final do processo fermentativo. Já na alta fermentação, as leveduras “ale”, na maior parte dos casos *Saccharomyces cerevisiae*, costumam flocular na superfície do mosto ao final da fermentação (FERREIRA et al., 2010; KOURTIS e ARVANITTOYANNIS, 2001; BOKULICH e BAMFORTH, 2013).

2.1.3 Processo produtivo

A cerveja é produzida pela fermentação de um extrato rico em carboidratos fermentescíveis, obtido a partir de uma matéria-prima amilácea. Transformações químicas e bioquímicas ocorrem ao longo do processo de forma a obter uma bebida com teor alcoólico, sabor e aroma desejados (FERREIRA et al., 2010). As principais etapas envolvidas na produção de cerveja podem ser observadas na Figura 4, dentre elas: moagem do malte, mosturação, fervura, fermentação, maturação, acondicionamento e pasteurização (FERREIRA et al., 2010; TSAROUHAS e ARVANITTOYANNIS, 2010).

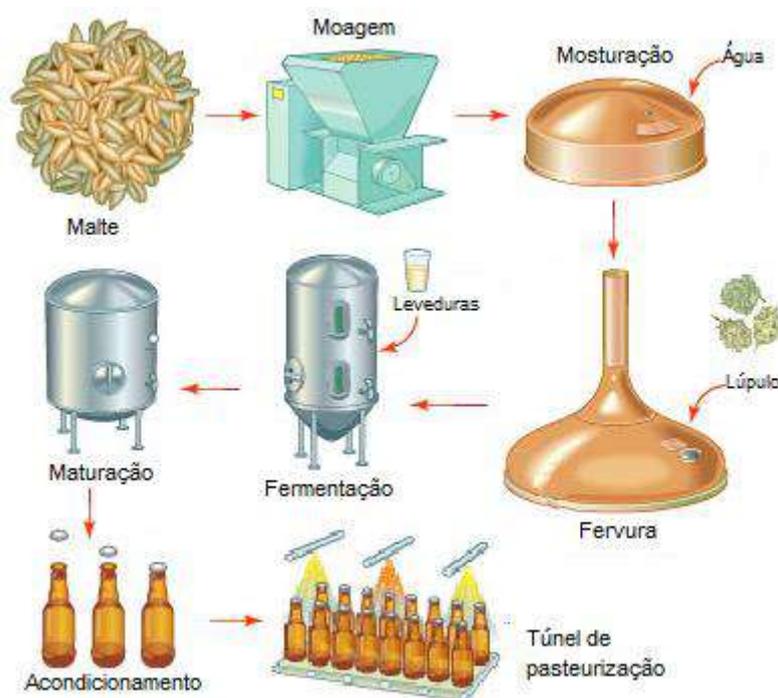


Figura 4. Esquema simplificado do processo de produção de cerveja. (Fonte: Cerveja Pura - adaptado, 2017)

2.1.3.1 Moagem do malte

Nos moinhos os grãos de malte têm sua granulometria reduzida de forma a expor o endosperma e separá-lo da casca. A exposição do endosperma visa melhorar o ataque enzimático na etapa de mosturação, a fim de obter um extrato rico em carboidratos fermentescíveis e compostos nitrogenados. A moagem pode ser feita por via seca ou úmida (KOURTIS e ARVANITTOYANNIS, 2001; TSAROUHAS e ARVANITTOYANNIS, 2010).

2.1.3.2 Mosturação (ou Brassagem)

O mosto é formado pela mistura das matérias-primas no processo conhecido como mosturação (ou brassagem). Malte e água, nas proporções adequadas, são misturados sendo obtido um extrato rico em compostos solúveis (principalmente carboidratos fermentescíveis e compostos nitrogenados) que serão utilizados na etapa de fermentação para produção de etanol, gás carbônico e compostos secundários (KOURTIS e ARVANITTOYANNIS, 2001). A temperatura inicial do processo permanece em torno de 35°C chegando a aproximadamente 75°C no final da etapa. Ao longo de 130 minutos, em média, são realizados aumentos graduais na temperatura que ocorrem em intervalos de 10 a 20 minutos. Este aquecimento é feito para atingir a temperatura ótima das enzimas envolvidas no processo, principalmente peptidases (40-60°C) e alfa e beta amilases (60-75°C) (SILVA, 2005).

2.1.3.3 Fervura

O mosto é submetido a uma etapa de fervura para inativação de enzimas, eliminação de micro-organismos, coagulação de proteínas e concentração do mosto. É nessa etapa que há adição do lúpulo, desenvolvendo aroma e sabor característicos bem como gerando aumento da estabilidade microbiológica, devido aos alfa e beta ácidos (KOURTIS e ARVANITTOYANNIS, 2001; TSAROUHAS e ARVANITTOYANNIS, 2010).

2.1.3.4 Fermentação

Ajustadas as condições, o mosto é inoculado e inicia-se a etapa de fermentação. Componentes provenientes do malte e dos adjuntos atuam como fonte de compostos essenciais para o desenvolvimento do agente de fermentação. Dentre tais compostos

encontram-se carboidratos, compostos nitrogenados, lipídios e vitaminas. As células desenvolvem-se de forma a atingir uma população final até seis vezes maior que o inóculo inicial dependendo das condições (FERREIRA et al., 2010).

As condições do processo variam conforme o tipo de fermentação conduzida. Na alta fermentação a inoculação ocorre a temperatura de 16-24°C e é aumentada para 20-25°C no início do processo fermentativo e permanece assim até sua finalização. Devido à temperatura aplicada o processo é finalizado com um curto período de tempo, em torno de 3 dias. Já na baixa fermentação a temperatura do processo é de 6 a 15°C e o tempo para finalização é maior devido à menor temperatura, podendo chegar a 10 dias (NUNES et al., 2016; SILVA, 2005).

2.1.3.5 Maturação

Nesta etapa ocorre a chamada fermentação secundária, responsável pelas características sensoriais (coloração, aroma, sabor) finais do produto. Compostos fermentescíveis residuais são metabolizados e moléculas resultantes do metabolismo secundário das leveduras são formadas resultando na perda da característica de “cerveja verde”. As temperaturas de maturação variam em torno de 12-20°C para leveduras de alta fermentação enquanto que temperaturas menores são aplicadas para leveduras de baixa fermentação. O tempo que a bebida permanece nesta etapa é função do tipo de cerveja produzida e das características desejadas podendo variar de 1 ou 2 semanas a alguns meses (KOURTIS e ARVANITOYANNIS, 2001; SILVA, 2005).

2.1.3.6 Acondicionamento (Envase)

Após a fermentação a cerveja segue para o envase. As embalagens, previamente higienizadas, são preenchidas com a cerveja e lacradas. Existem diversas embalagens que tem aplicação na indústria cervejeira, dentre elas estão as garrafas de vidro (retornáveis ou não), latas de alumínio, barris, garrafas PET (poli(tereftalato de etileno)) e tanques a granel. A escolha do tipo de embalagem depende do destino do produto (exportação ou consumo interno), da distância para distribuição, do custo da embalagem e cultura de consumo. A embalagem deve promover proteção à luz e alteração de temperatura, fatores que levam a alteração do produto. Questões econômicas (custo) e ambientais (reciclabilidade) também devem ser consideradas. (PATERNOSTER et al., 2017)

O sistema de envase deve permitir seu controle microbiológico. Limpeza CIP (*Cleaning In Place*) e redução do oxigênio a partir de aplicação de vácuo são estratégias eficientes (TSAROUHAS e ARVANITTOYANNIS, 2010).

2.1.3.7 Pasteurização

A pasteurização é aplicada a fim de gerar estabilidade microbiológica. A eficiência do processo depende diretamente da temperatura atingida pelo produto bem como do tempo que o aquecimento é aplicado (RIBEIRO et al., 2011). O trocador de calor empregado nesta etapa pode ser de placas ou em túnel. A pasteurização em trocador de placas é aplicada antes do acondicionamento. Desta forma, o produto é estabilizado, atingindo uma temperatura de 75°C, e segue para a etapa seguinte de envase em embalagens esterilizadas. Já na pasteurização em túnel, a cerveja é previamente acondicionada. As embalagens, contendo o produto, seguem para um túnel com aspersão de água aquecida por um tempo determinado chegando a 65°C (HORN et al., 1997; DILAY et al., 2006).

A eficiência do processo é medida em unidades de pasteurização (UP). Esta medida define o efeito do tratamento térmico sobre os micro-organismos. Uma unidade de pasteurização refere-se ao efeito devido ao aquecimento a 60°C durante um minuto. As unidades de pasteurização são agregadas ao produto de forma a garantir sua estabilidade microbiológica (DILAY et al., 2006).

2.2 Microbiologia da cerveja: Presença de deterioradores

2.2.1 Microbiologia característica e deterioradores

A cerveja, constituída primordialmente de água, malte e lúpulo, é produzida pelas transformações químicas e bioquímicas durante a fermentação. O principal agente responsável por essas transformações é a levedura cervejeira. Atualmente são utilizadas linhagens específicas como *Saccharomyces pastorianus* e *Saccharomyces cerevisiae* para cervejas lager e ale, respectivamente. A escolha da linhagem utilizada é função das características desejadas no produto final e do processo de fabricação. Os produtos principais do metabolismo fermentativo são etanol e dióxido de carbono, porém os compostos responsáveis pelo aroma e sabor do produto final são formados pelo metabolismo secundário da célula. Ambas as linhagens vão atuar na etapa de maturação,

cada uma de forma específica, na produção destes compostos que ao final do processo irão caracterizar a cerveja produzida.

Ao longo da linha produtiva deve-se atentar para que não haja contaminação do produto de forma a permitir o adequado desempenho da levedura inoculada. Desde as matérias-primas até o envase da cerveja, existe a possibilidade de entrada de micro-organismos indesejados. Dragone et al. (2007) e Hill (2015) indicam diversos pontos de contaminação, dentre eles: malte, água, lúpulo, leveduras, tanque de mosturação, tanque de fermentação, tubulações, enchedora, garrafas, latas e barris.

Além das leveduras cervejeiras regularmente utilizadas, outros micro-organismos podem desenvolver-se na cerveja. Como resultado da deterioração há a alteração de sabor, produção de odores desagradáveis, aumento da acidez e turbidez do produto (RIBEIRO et al., 2011). Dentre os micro-organismos deterioradores estão bactérias Gram-positivas, bactérias Gram-negativas e leveduras selvagens (DRAGONE et al., 2007).

As bactérias Gram-positivas são constituídas pelas bactérias ácido lácticas, A maior parte dos casos de contaminação é ocasionada pelos gêneros *Lactobacillus* e *Pediococcus*. A principal espécie envolvida no processo de deterioração é *Lactobacillus brevis*. Em seguida, encontram-se *Lactobacillus lindneri* e *Pediococcus damnosus*. As bactérias Gram-negativas envolvidas na contaminação da cerveja pertencem aos gêneros *Pectinatus* e *Megasphaera* podendo haver algumas espécies da família Enterobacteriaceae. A presença de *Pectinatus cerevisiiphilus* e *Pectinatus frisingensis* é reportada na maior parte dos casos envolvendo este grupo de bactérias. As leveduras selvagens são consideradas quaisquer leveduras que não sejam a levedura cervejeira utilizada como inóculo. Dentre elas, as mais importantes são as *Saccharomyces* spp. que podem eliminar as leveduras do cultivo devido a produção de toxinas. Outros gêneros como *Candida*, *Brettanomyces* e *Pichia* também são relatados como contaminantes (DRAGONE et al., 2007).

2.2.2 Bactérias ácido lácticas (BAL)

Dentre os micro-organismos relatados, a maior parte dos casos de contaminação da indústria cervejeira ocorre pela presença de bactérias ácido lácticas. Algumas dessas bactérias são formadoras de diacetil, devido ao desvio em sua via metabólica, causando

a deterioração da cerveja. Peyer et al. (2016) citam *L. lactis* e *L. plantarum* como exemplos de espécies com essa capacidade.

As bactérias ácido lácticas (BAL) são bactérias Gram-positivas, catalase negativas, não formam esporos, microaerófilas ou estritamente anaeróbicas, não apresentam motilidade, quimiorganotróficas e nutricionalmente exigentes (RAMÍREZ et al., 2011; HUERTAS, 2010). Apresentam crescimento na faixa de temperatura de 5 a 45°C. São bactérias acidófilas, desenvolvendo-se em baixos valores de pH (em torno de 4,5), e têm como principal produto metabólico o ácido láctico (FORSYTHE, 2013; RAMÍREZ et al., 2011). São naturalmente encontradas no trato gastrointestinal e geniturinário tanto de humanos como de animais (NOGUEIRA, 2010). Estão distribuídas na natureza, estando presentes no solo, água, alimentos e plantas (RAMÍREZ et al., 2011).

Estes micro-organismos são classificados, com relação ao seu metabolismo, em homofermentativos e heterofermentativos. As bactérias homofermentativas produzem, pela via glicolítica, duas moléculas de ácido láctico para cada molécula de glicose e não há produção de gás. Este grupo é constituído por *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* e *Streptococcus* spp.. Por outro lado, as bactérias heterofermentativas produzem uma molécula de ácido láctico e uma molécula de etanol podendo haver produção de gás. *Lactobacillus* e *Leuconostoc* fazem parte deste grupo (RAMÍREZ et al., 2011; HUERTAS, 2010; FURTADO, 2010; DRAGONE et al., 2007).

Com relação à sua morfologia, as bactérias ácido lácticas podem ser divididas em bastonetes e cocos (ou coco-bacilos). *Lactobacillus* e *Carnobacterium* caracterizam-se por apresentarem-se na forma de bastonetes, enquanto os outros gêneros apresentam-se na forma de cocos. Há uma exceção, o gênero *Weissella*, que pode apresentar ambas as morfologias (RAMÍREZ et al., 2011; FURTADO, 2010).

As BAL são responsáveis por até 70% da deterioração nas cervejarias (MENZ et al., 2010). A principal característica da contaminação por BAL é o aspecto amanteigado devido à formação de diacetil. Os principais gêneros causadores de deterioração microbiana da cerveja são *Lactobacillus* e *Pediococcus* (SUZUKI, 2011; MENZ et al., 2010; KOURTIS e ARVANITTOYANNIS, 2001).

As linhagens responsáveis por este processo de deterioração são resistentes às condições do meio, como por exemplo, à presença dos compostos do lúpulo, alfa e beta ácidos, que atuam na preservação do produto. Estudos indicam que as cepas causadoras de deterioração encontradas na produção cervejeira sofreram alterações genéticas ao longo do tempo, de forma a serem capazes de se desenvolver no produto. O tamanho das células sofreu redução de modo a reduzir a superfície de contato com o meio e conseqüentemente com os compostos do lúpulo. Sem contar no desenvolvimento de moléculas (transportadores) que expulsam os iso-ácidos da célula, não permitindo sua atuação antimicrobiana (SUZUKI, 2011; MENZ et al., 2010; DRAGONE et al., 2007).

2.3 Métodos de análise

2.3.1 Métodos convencionais

Os métodos convencionais de análise microbiológica caracterizam-se principalmente pela sua execução simplificada. O plaqueamento das amostras é realizado em meios de cultura padrão e as placas são incubadas em temperaturas e tempos adequados. Dentre os métodos tradicionais, os meios utilizados para detecção de bactérias lácticas são: Man, Rogosa e Sharpe (MRS) e Orange Serum Agar (OSA).

O meio criado em 1960 por de Man, J. C., Rogosa, M. e Sharpe, M. E. é destinado às bactérias do gênero *Lactobacillus*. Sua criação tem origem na necessidade de um meio para melhorar o crescimento de *Lactobacillus* spp. em geral, visto que o meio anteriormente utilizado (Briggs) inibia o crescimento de algumas espécies dessas bactérias (DE MAN, ROGOSA e SHARPE, 1960). Por outro lado, é considerado um meio seletivo por conter acetato de sódio em sua formulação. Este é um agente de seleção que não permite o crescimento de outros micro-organismos que possam concorrer pelos nutrientes no meio. Diversos trabalhos (GOLDIN et al., 1992; ROSELINO, 2016; NERO et al., 2006) utilizam este meio para o crescimento de *Lactobacillus* spp. desde a sua criação.

Sua composição foi criada com base em testes e comparações com o método anterior. A melhor formulação encontrada, amplamente utilizada até hoje, é composta por fontes de carbono, nitrogênio e vitaminas, agentes seletivos, sais inorgânicos, agente tamponante, agente surfactante e agente solidificante. O meio é considerado seletivo

pela presença de acetato de sódio e citrato de amônio e apresenta pH em torno de 6,5 após sua esterilização (DE MAN, ROGOSA e SHARPE, 1960; NEOGEN, 2018).

O OSA foi desenvolvido para micro-organismos acidófilos relacionados à deterioração de alimentos (WITTHUHN et al., 2007). Desenvolvido por Glen L. Hays (1951), o meio permitiu a melhora na detecção de contaminantes para o controle de qualidade de produtos como o suco de laranja analisado na época. Atua como meio seletivo devido a seu pH reduzido (5,5).

Sua formulação inclui soro de laranja, extrato de levedura, fontes de carbono e nitrogênio, bem como agente solidificante. É utilizado para *Lactobacillus* spp., *Saccharomyces cerevisiae* (ALWAZEER et al., 2003) e bactérias ácido-tolerantes como algumas espécies de *Alicyclobacillus* (WITTHUHN et al., 2007).

Porém, estes métodos não apresentam a precisão necessária em determinados casos e podem tornar-se muito trabalhosos. A contagem das colônias está susceptível a erros, a interpretação dos resultados varia de acordo com o observador, partículas residuais das amostras (sólidas, principalmente) podem resultar em uma contagem errônea, entre outros fatores (SANT'ANA et al., 2002).

Desta forma, novos métodos foram desenvolvidos para minimizar essas interferências. Os chamados métodos alternativos foram elaborados para reduzir a influencia destes fatores. Um dos exemplos são as placas de Petrifilm[®] que apresentam diversas aplicações como a contagem de bactérias aeróbias totais (SOUZA et al., 2015; SANT'ANA et al., 2002), coliformes totais e *Escherichia coli* (SOUZA et al., 2015; SILVA et al., 2006), leveduras e fungos filamentosos (BIRD et al., 2015) e bactérias ácido lácticas (SOUZA et al., 2015; NERO et al., 2006).

As placas de Petrifilm AC para bactérias ácido lácticas (Figura 5) são constituídas de um cartão de papel quadriculado revestido com polietileno no qual estão presentes nutrientes desidratados, agentes gelificantes solúveis a frio e um corante indicador. A água presente na alíquota quando em contato com o gel hidrossolúvel (a frio) resulta na geleificação do meio. O indicador (tetrazólio) é reduzido no interior das células resultando na coloração avermelhada das colônias (3M, 2018; SOUZA et al., 2015).



Figura 5. Placas de Petrifilm AC Bactérias ácido lácticas. (Fonte: 3M, 2018)

Condições específicas de cultivo são sanadas pela própria placa. Para análise de bactérias lácticas, a placa possui compostos que eliminam o oxigênio do meio permitindo um ambiente anaeróbico para o crescimento das células. Elimina a etapa de preparo de meio, diluentes especiais e ajustes de pH por ser pronta para o uso. É recomendada para diversas análises como testes ambientais, de alimentos e de bebidas para uma ampla variedade de amostras. Apresenta precisão, eficiência e consistência dos resultados (3M, 2018).

Outras vantagens do método são o menor espaço ocupado, a menor quantidade de material utilizada, a praticidade de utilização, a longa vida de prateleira e conseqüentemente aumento da produtividade (SOUZA et al., 2015; TAVOLARO et al, 2005). Por outro lado, o armazenamento das placas deve ser feito a temperatura e umidade controladas. Essas condições garantem seu desempenho ao longo da análise (3M, 2018).

2.3.2 Espectrometria de massas – MALDI-TOF

A espectrometria de massas baseia-se na ionização de compostos e sua separação em virtude da relação massa/carga das moléculas ionizadas. O método de MALDI-TOF (*Matrix Associated Laser Desorption-Ionization-Time of Flight*) aplica um sistema de ionização por dessorção a laser assistida por matriz e a detecção é feita pela análise do tempo de voo das moléculas. Este método tem sido muito utilizado para identificação microbiológica por aplicar uma forma mais branda de ionização, assim as moléculas não sofrem degradação e podem ser identificadas (GOULART e RESENDE, 2013; JURINKE et al., 2004).

A Figura 6 descreve a técnica aplicada pelo MALDI-TOF. A amostra é fixada em um suporte condutor através de uma matriz (solução de ácido hidroxicinâmico). Um feixe de laser é incidido sobre as amostras e a energia cedida causa a transferência de prótons da matriz para a amostra ionizando as moléculas que são desorvidas. Um tubo a vácuo contendo um campo eletromagnético é responsável pela separação dos íons formados com base no tempo de voo de cada molécula. Esta separação é feita com base na razão massa/carga (m/z) dos íons. Moléculas com tamanhos diferentes apresentam razões m/z diferentes. As moléculas são direcionadas para o detector que, conectado ao software adequado, gera um espectro. A identificação é feita pela comparação do espectro obtido com o banco de dados disponível pelo fabricante (PASTERNAK, 2012; JURINKE et al., 2004).

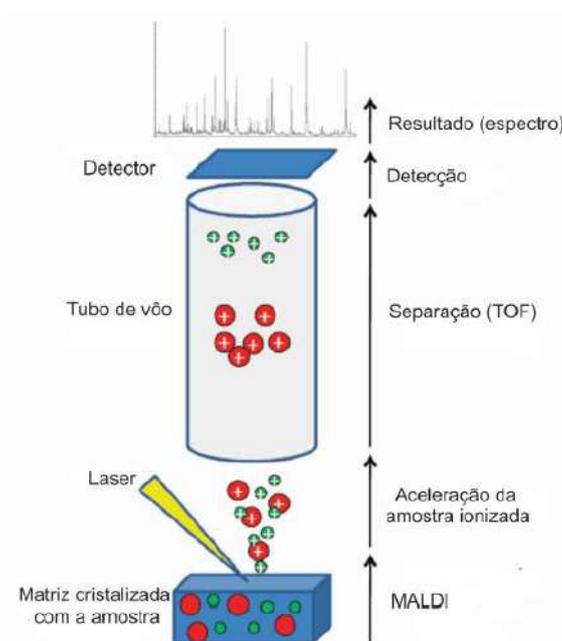


Figura 6. Esquema ilustrativo do método de MALDI-TOF.

(Fonte: GOULART e RESENDE, 2013)

Os resultados são expressos em uma tabela contendo gênero e espécie dos micro-organismos mais prováveis. Para cada espectro é feita a comparação da posição da razão massa/carga, da intensidade dos picos e da posição relativa dos picos mais relevantes originando em um *Score Value* (SV). Este parâmetro indica o grau de confiança do resultado com base nas diversas comparações feitas. Todas as identificações são acompanhadas deste valor, em base logarítmica (NAGY et al., 2012). A interpretação deste valor é feita com base em intervalos. Para valores entre: 2,300-3,000 a identificação de gênero e espécie são altamente prováveis, 2,000-2,299 há

identificação do gênero e provável identificação da espécie, 1,700-1,999 há provável identificação do gênero e 0,00-1,69 não há identificação confiável. Para todas as amostras analisadas é dada uma tabela com os dez micro-organismos que apresentam maior probabilidade de identificação classificados pelos seus respectivos SV.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Comparar a metodologia convencional com um método alternativo de isolamento de bactérias ácido lácticas (Petrifilm[®]) a partir da análise de matéria-prima, amostras ambientais e resíduo produzido em uma planta cervejeira da cidade do Rio de Janeiro.

3.2 Objetivos específicos

- Comparar a especificidade da metodologia convencional utilizando-se dois meios diferentes de culturas para crescimento de bactérias ácido lácticas, MRS e OSA, com um método alternativo de análise, o Petrifilm[®] AC Bactérias Ácido Lácticas.
- Realizar a caracterização microbiológica das colônias isoladas a partir dos meios de cultura convencionais e Petrifilm.
- Realizar a identificação taxonômica das colônias isoladas utilizando MALDI-TOF MS.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Preparo das amostras

Foram analisados grãos maltados, amostras ambientais de uma planta de produção de cervejas artesanais e o resíduo produzido. Os grãos foram cedidos por um cervejeiro artesanal, coletados em sacos esterilizados e mantidos à temperatura ambiente. A amostragem ambiental e a coleta dos resíduos foram realizadas em uma planta, localizada na cidade do Rio de Janeiro, utilizada por cervejarias ciganas. Estas são cervejarias que utilizam os equipamentos presentes na planta para a produção de seus produtos, funcionando como um contrato de aluguel (CHAVES, 2016).

As amostras ambientais foram coletadas através do método de Swab. O swab estéril e umedecido (em solução diluente constituída de água peptonada 0,1%) foi atritado sobre a superfície de forma a obter uma amostra significativa da área analisada. A haste foi manipulada pela sua extremidade, sendo esta parte eliminada ao ser inserida no frasco de transporte contendo a solução diluente (LUCIANO et al., 2012; PINHEIRO et al., 2010). A coleta dos resíduos foi feita utilizando sacos estéreis de forma análoga aos grãos de malte.

A amostragem foi executada de forma a representar os possíveis pontos de contaminação na planta (DRAGONE et al, 2007). Desta forma, os pontos de coleta, passíveis de amostragem, foram: tanque de mosturação, saída do trocador de calor utilizado para resfriar o mosto antes da fermentação, mangueira de transferência do mosto para o fermentador, dois fermentadores (válvula de saída de produto e válvula de saída do extrato de levedura) e mangueira de envase. A Figura 7 mostra os locais das coletas ambientais e do resíduo.



Figura 7. (a) Locais de coleta: tanque de mosturação, (b) saída do trocador de calor, (c) mangueiras de transferência e de envase, (d) fermentador (válvula de saída de produto e válvula de saída do extrato de levedura), (e) resíduo (Fonte: O autor, 2017)

4.2 Análise microbiológica

Tanto os grãos de malte quanto o resíduo foram pesados (10 g) e homogeneizados em 90 mL de água peptonada 0,1% (m/v). Já as amostras ambientais foram homogeneizadas no próprio meio de coleta (swab).

Em seguida, foram realizadas diluições seriadas, de forma a possibilitar a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC). A Figura 8 ilustra o procedimento utilizado. A escolha de quais diluições seriam plaqueadas foi feita com base na estimativa da população inicial de micro-organismos presentes nas amostras.

Desta forma, foram plaqueadas (em duplicata) as diluições 10^0 e 10^{-1} para as amostras ambientais e 10^{-1} e 10^{-2} para os grãos e o resíduo.

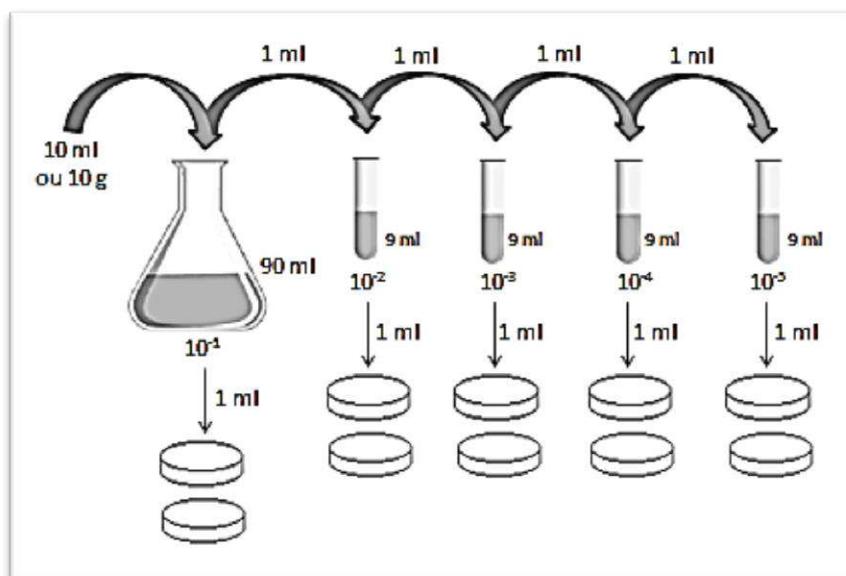


Figura 8. Esquema generalizado para realização das diluições seriadas. (Fonte: O autor, 2017)

Foram utilizados três meios de cultura para a contagem total dos micro-organismos: OSA (BBL), MRS (HIMEDIA) e Petrifilm® (3M). Nos meios OSA e MRS, o plaqueamento foi realizado em profundidade, plaqueando 1 ml de cada diluição. Para o Petrifilm, o plaqueamento foi realizado em superfície, usando também 1 ml de cada diluição. Todas as placas foram incubadas por 48 horas em estufa a 30°C (OSA) e 35°C (MRS e Petrifilm). A contagem total das unidades formadoras de colônia foi feita manualmente e os resultados expressos em logUFC/mL.

4.3 Caracterização microbiológica

Após a contagem total das UFC foi realizado o isolamento de algumas colônias a fim caracterizar os micro-organismos isolados. Esta etapa foi executada visualmente com base nas características de crescimento de cada colônia. O isolamento foi realizado utilizando-se uma alça bacteriológica e aplicando-se a técnica de esgotamento. O meio utilizado nesta etapa foi o MRS e a incubação foi feita à 35°C por 24 horas. Os isolados oriundos dos grãos, das amostras ambientais e do resíduo foram submetidos à coloração de Gram. Desta forma foi possível inferir sobre as características morfológicas.

4.4 Identificação microbiológica

A identificação dos isolados oriundos dos grãos, das amostras ambientais e do resíduo foi realizada no Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica - LIMM, localizado no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes (Centro de Ciências da Saúde - CCS/UFRJ).

Para o preparo das amostras, os isolados foram plaqueados em MRS e incubados durante 24 horas à 35°C. O método de MALDI-TOF foi aplicado para a identificação dos isolados utilizando a técnica direta, ou seja, não houve etapa prévia de tratamento das células.

Uma colônia de cada isolado foi transferida para *spots* de uma placa condutora e 1 µl da matriz foi aplicada. Esta matriz consiste de uma solução de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico, na concentração de 10mg/mL (diluição feita em uma solução contendo 50% de acetonitrila e 2,5% de ácido trifluoroacético). Após secagem da solução matriz, em temperatura ambiente, a placa foi inserida no equipamento (Microflex-LT MALDI-TOF MS, Bruker Daltonik). A calibração foi feita com um padrão externo de *Escherichia coli*. Cada *spot* foi devidamente identificado e os espectros foram obtidos. Os perfis de cada espectro foram importados para o software MALDI Biotyper Version 3.1, fornecido pelo fabricante do equipamento, que possui o banco de dados para a comparação e obtenção automática dos resultados.

4.5 Análise estatística

Para a análise estatística dos dados foi utilizado o software GraphPad Prism (versão 5.03, 2009). Os resultados de contagem total foram avaliados através da análise de variância (ANOVA) *one-way*, seguida de teste *a posteriori* de Tukey de comparação múltipla considerando o nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise microbiológica

A Tabela 1 apresenta a contagem total, em logUFC/mL, realizada nos três meios analisados (MRS, OSA e Petrifilm) dos grãos de malte, das amostras ambientais coletadas e do bagaço de malte.

Tabela 1. Contagem total média (logUFC/mL) dos grãos de malte, das amostras ambientais e do bagaço de malte.

| Origem | MRS | OSA | Petrifilm |
|----------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Matéria-prima | | | |
| Grãos de malte | 4,31 ^b | 5,03 ^a | 2,40 ^c |
| Amostras ambientais | | | |
| Tanque de mosturação | 1,99 ^a | 2,30 ^a | 1,48 ^b |
| Saída do trocador de calor | 0,59 ^b | 2,00 ^a | 0,24 ^b |
| Mangueira (transferência) | 1,11 ^b | 1,88 ^a | 0,00 ^c |
| Fermentador 1 (válvula superior) | 0,15 ^a | 0,00 ^a | 0,00 ^a |
| Fermentador 1 (válvula inferior) | 1,27 ^a | 1,22 ^a | 0,85 ^a |
| Fermentador 2 (válvula superior) | 3,52 ^b | 4,40 ^a | 1,54 ^c |
| Fermentador 2 (válvula inferior) | 0,35 ^a | 0,00 ^a | 0,00 ^a |
| Mangueira (envase) | 0,15 ^a | 0,00 ^a | 0,00 ^a |
| Resíduo | | | |
| Bagaço de malte | 3,61 ^b | 4,19 ^a | 0,00 ^c |

^{a,b,c} Valores na mesma linha seguidos de letras diferentes indicam que há diferença significativa entre as médias ($p < 0,05$) segundo ANOVA seguida pelo teste de Tukey.

A partir dos valores apresentados constata-se que houve diferença significativa entre os três meios para os grãos de malte, a válvula superior do fermentador 2, a mangueira de transferência e o bagaço. O meio OSA apresentou a maior contagem, seguida do meio MRS. O Petrifilm exibiu a menor contagem total. As maiores contagens nos meios convencionais (MRS e OSA) podem indicar que outros micro-organismos, e não apenas bactérias lácticas, encontraram condições favoráveis para seu desenvolvimento.

Bokulich e Bamforth (2013) citam que os grãos de malte podem conter diversos micro-organismos, dentre os quais estão bactérias Gram-positivas e Gram-negativas,

leveduras e fungos filamentosos. O meio OSA apresenta como única barreira o pH menor (em torno de 5,5), desta forma o maior crescimento neste meio indica a presença de micro-organismos acidófilos ou ácido tolerantes. O meio MRS, apesar de conter agentes seletivos, pode permitir o crescimento de outros micro-organismos, devido ao fato de ser um meio rico nutricionalmente e possuir pH mais neutro (por volta de 6,5). Já o Petrifilm tem uma maior seletividade, devido à presença de agentes seletivos bem como de compostos responsáveis por manter a anaerobiose do meio (3M, 2018).

O tanque de mosturação não apresentou contagens diferentes para os meios MRS e OSA, porém para o Petrifilm o resultado encontrado foi inferior. Conforme discutido acima, a presença de agentes seletivos e a manutenção de anaerobiose no Petrifilm inibem o crescimento de uma maior variedade de micro-organismos quando comparado aos meios MRS e OSA.

Para as amostras oriundas do fermentador 1 (válvulas superior e inferior), do fermentador 2 (válvula inferior) e da mangueira de envase, não houve diferença significativa na contagem dos três meios. Ortonali et al. (2007) ao analisar o crescimento de bactéria ácido láctica de leite, compararam o meio MRS com o Petrifilm. Apesar das diferentes linhagens estudadas, não houve diferença significativa no crescimento nos meios empregados. Da mesma forma, Nero et al. (2006, 2008) observaram que estes métodos não apresentaram diferença com relação à contagem total de unidades formadoras de colônia. Os autores citados analisaram uma matriz láctea cuja variedade microbiológica é menor. O presente trabalho apresenta um produto com maior diversidade microbiológica, apresentando leveduras e outros possíveis micro-organismos que possam se desenvolver nessa matriz. Desta forma, acredita-se que a baixa contagem total pode ter resultado na ausência de diferença entre os meios.

Já na saída do trocador, houve diferença entre o meio OSA e os demais (MRS e Petrifilm), com uma contagem maior no primeiro. O meio OSA apresenta o pH como único agente seletivo. Assim, o maior crescimento neste meio pode indicar a presença de micro-organismos que crescem melhor em pH baixo. Já a presença de acetato de sódio em sua composição, permite que o MRS iniba o crescimento de alguns micro-organismos. O Petrifilm por sua vez, apresenta duas barreiras seletivas: a presença de agentes seletivos e de compostos que eliminam o oxigênio disponível no meio.

5.2 Caracterização e identificação microbiológica

Foram isoladas 46 colônias das 10 fontes analisadas dos três meios aplicados. Dentre estas colônias, 39 foram caracterizadas pela coloração de Gram e/ou identificadas pelo MALDI-TOF MS.

Os isolados caracterizados e identificados estão na Tabela 2, abaixo. São dispostos os resultados encontrados para a coloração de Gram, a morfologia observada na microscopia e a identificação por espectrometria de massas MALDI-TOF dos isolados dos três meios analisados (MRS, OSA e Petrifilm) das dez fontes de análise.

Tabela 2. Caracterização por microscopia e/ou identificação a partir da análise pelo método de MALDI-TOF MS dos isolados provenientes dos grãos de malte, das amostras ambientais e do bagaço de malte e seus respectivos meios de cultura.

| Origem | Isolados | Meio | Teste de Gram | Morfologia | Identificação | SV ¹ |
|----------------------------|----------|-----------|-----------------|-----------------|------------------------------|-----------------|
| Matéria-prima | | | | | | |
| Grãos de malte | 1 | MRS | Positivo | Cocobacilos | Sem identificação | - |
| | 2 | MRS | Positivo | Cocobacilos | <i>Enterobacter cowanii</i> | 2,003 |
| | 3 | MRS | Positivo | Cocobacilos | Sem identificação | - |
| | 4 | MRS | Positivo | Cocobacilos | Sem identificação | - |
| | 5 | OSA | Positivo | Cocobacilos | Sem identificação | - |
| | 6 | OSA | Positivo | Cocobacilos | <i>Enterobacter cowanii</i> | 1,777 |
| | 7 | OSA | Positivo | Cocobacilos | <i>Enterobacter cowanii</i> | 2,065 |
| | 8 | Petrifilm | Positivo | Cocobacilos | <i>Enterobacter cowanii</i> | 1,876 |
| | 9 | Petrifilm | Positivo | Cocobacilos | <i>Enterobacter cowanii</i> | 1,768 |
| Amostras ambientais | | | | | | |
| Tanque de mosturação | 10 | MRS | SC ³ | SC ³ | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 2,265 |
| | 11 | MRS | Positivo | Cocos | <i>Enterobacter kobei</i> | 2,260 |
| | 12 | OSA | Positivo | Bastonetes | Sem identificação | - |
| | 13 | OSA | Positivo | Cocos | Sem identificação | - |
| | 14 | Petrifilm | SC ³ | SC ³ | Sem identificação | - |

Tabela 2 (continuação). Caracterização por microscopia e/ou identificação a partir da análise pelo método de MALDI-TOF MS dos isolados provenientes dos grãos de malte, das amostras ambientais e do bagaço de malte e seus respectivos meios de cultura.

| Amostras ambientais | | | | | | |
|-----------------------------|----|-----------|------------------|-----------------|--|-------|
| Saída do trocador de calor | 15 | MRS | SC ³ | SC ³ | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 2,072 |
| | 16 | MRS | Positivo | Cocos | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 2,098 |
| | 17 | OSA | SC ³ | SC ³ | <i>Staphylococcus hominis</i> | 2,219 |
| | 18 | Petrifilm | Positivo | Cocos | <i>Lactococcus lactis</i> | 2,291 |
| | 19 | Petrifilm | SCG ² | Levedura | Sem identificação | - |
| Mangueira (transferência) | 20 | MRS | Positivo | Bastonetes | <i>Staphylococcus warneri</i> | 1,807 |
| | 21 | OSA | SC ³ | SC ³ | Sem identificação | - |
| Fermentador 1 (v. superior) | 22 | MRS | SC ³ | SC ³ | Sem identificação | - |
| | 23 | OSA | SC ³ | SC ³ | Sem identificação | - |
| Fermentador 1 (v. inferior) | 24 | MRS | Positivo | Cocos | <i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> | 1,904 |
| | 25 | MRS | Positivo | Bastonetes | <i>Lactobacillus plantarum</i> | 2,218 |
| | 26 | OSA | SC ³ | SC ³ | Sem identificação | - |
| | 27 | Petrifilm | Positivo | Bastonetes | <i>Lactobacillus plantarum</i> | 2,369 |
| | 28 | Petrifilm | Positivo | Bastonetes | <i>Lactobacillus plantarum</i> | 2,354 |
| | 29 | Petrifilm | Positivo | Bastonetes | <i>Lactobacillus plantarum</i> | 1,822 |
| | 30 | Petrifilm | Positivo | Cocobacilos | Sem identificação | - |

Tabela 2 (continuação). Caracterização por microscopia e/ou identificação a partir da análise pelo método de MALDI-TOF MS dos isolados provenientes dos grãos de malte, das amostras ambientais e do bagaço de malte e seus respectivos meios de cultura.

| | | | | | | |
|-----------------------------|----|------------|------------------|-----------------|-----------------------------|-------|
| Amostras ambientais | | | | | | |
| Fermentador 2 (v. superior) | 31 | MRS | SCG ² | Levedura | <i>Candida robusta</i> | 2,040 |
| | 32 | MRS | SCG ² | Levedura | <i>Candida robusta</i> | 1,907 |
| | 33 | MRS | SCG ² | Levedura | Sem identificação | - |
| | 34 | OSA | SCG ² | Levedura | <i>Candida robusta</i> | 1,836 |
| | 35 | OSA | SC ³ | SC ³ | <i>Bacillus megaterium</i> | 2,190 |
| | 36 | Petriefilm | Positivo | Cocos | Sem identificação | - |
| | 37 | Petriefilm | SCG ² | Levedura | <i>Candida parapsilosis</i> | 1,709 |
| Fermentador 2 (v. inferior) | 38 | MRS | Positivo | Cocos | Sem identificação | - |
| Mangueira (envase) | 39 | MRS | SC ³ | SC ³ | Sem identificação | - |
| | 40 | OSA | SC ³ | SC ³ | Sem identificação | - |
| Resíduo | | | | | | |
| Bagaço de malte | 41 | MRS | SCG ² | Levedura | <i>Candida krusei</i> | 2,096 |
| | 42 | MRS | SCG ² | Levedura | <i>Candida krusei</i> | 2,147 |
| | 43 | MRS | SCG ² | Levedura | <i>Candida krusei</i> | 1,840 |
| | 44 | OSA | SCG ² | Levedura | <i>Candida robusta</i> | 1,966 |
| | 45 | OSA | SCG ² | Levedura | <i>Candida lusitaniae</i> | 2,027 |
| | 46 | OSA | SCG ² | Levedura | Sem identificação | - |

¹SV: *Score value*. Para valores entre 2,300-3,000 a identificação de gênero e espécie são altamente prováveis, 2,000-2,299 há identificação do gênero e provável identificação da espécie, 1,700-1,999 há provável identificação do gênero e 0,000-1,699 não há identificação confiável. ²SCG: Sem Coloração de Gram (as leveduras não apresentam coloração de Gram). ³SC: Sem Caracterização (referente aos isolados que não puderam ser caracterizados)

5.2.1 Grãos de malte

A partir da análise microscópica, após coloração de Gram, foram identificados cocobacilos Gram-positivos em todos os isolados obtidos pela análise dos grãos de malte (Figura 9). O desenvolvimento deste grupo de bactérias é possível nos três meios analisados visto que o MRS e o Petrifilm foram desenvolvidos para bactérias lácticas, um grupo de bactérias Gram-positivas. O OSA por sua vez, foi elaborado para a análise de micro-organismos acidófilos dentre os quais se encontram algumas bactérias Gram-positivas, como as bactérias lácticas, por exemplo.

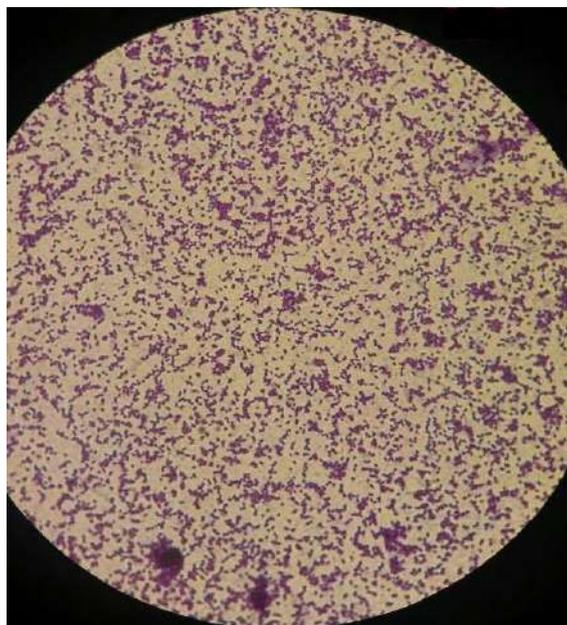


Figura 9. Cocobacilos Gram-positivos isolados dos grãos de malte. (Fonte: O autor, 2017)

Em contrapartida, a identificação taxonômica pelo método de MALDI-TOF indicou a presença de *Enterobacter cowanii* tanto nos meios convencionais (MRS e OSA) como no Petrifilm. Dado que foi observado o resultado positivo para coloração de Gram, a identificação realizada pela espectrometria de massas é inconsistente. Outro fator que deve ser considerado é o fato de bactérias Gram-positivas terem efeito antagônico sobre bactérias Gram-negativas. As condições favoráveis ao desenvolvimento das bactérias Gram-positivas, bactérias ácido lácticas, por exemplo, não são propícias ao desenvolvimento de bactérias Gram-negativas (FERNÁNDEZ-LÓPEZ et al., 2008). Técnicas moleculares de identificação seriam necessárias para esta confirmação, visto que o resultado dado pelo MALDI-TOF não foi congruente.

O MALDI-TOF é amplamente empregado na identificação de micro-organismos da área clínica. O banco de dados fornecido pelo fabricante é constituído de espécies de interesse clínico, principalmente patógenos. Assim, problemas na identificação em amostras de origem alimentar são relatados na literatura. A escassa presença de espectros de micro-organismos de origem alimentar ou até mesmo a ausência destes no banco de dados resulta na identificação equivocada destes isolados (DUNCAN et al., 2016; CAROLIS et al, 2014; CROXATTO, 2012).

5.2.2 Tanque de mosturação

No tanque de mosturação foram isoladas duas colônias do MRS e duas do OSA. A caracterização dos isolados resultou em cocos Gram-positivos no MRS e em bastonetes e cocos Gram-positivos nos respectivos isolados do OSA (Figura 10). Não foi possível caracterizar os isolados do Petrifilm. A maior variedade morfológica no OSA pode indicar a presença de micro-organismos que apresentam melhor crescimento em pH mais baixo quando comparado ao MRS mesmo não sendo encontrada diferença significativa na contagem total destes dois meios.

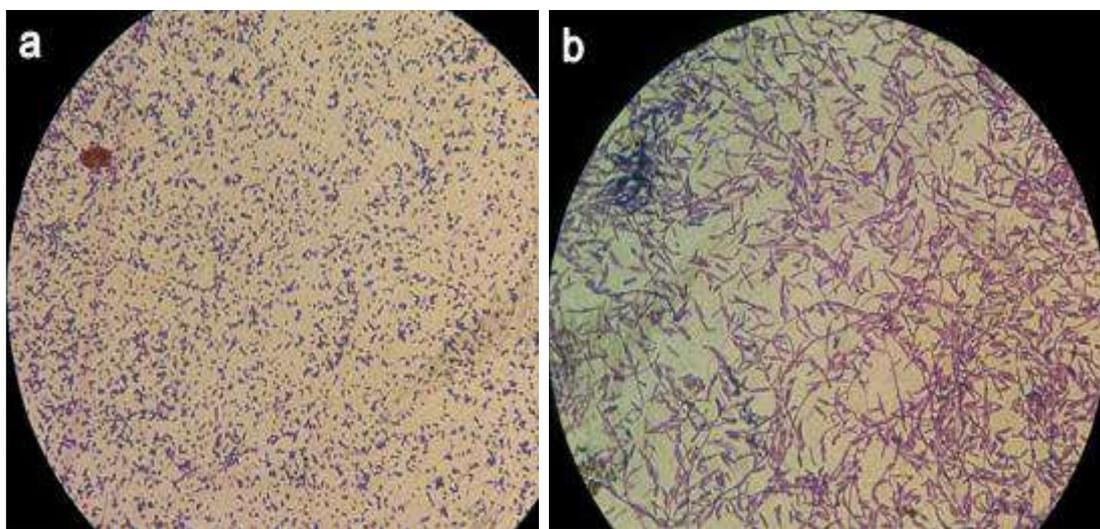


Figura 10. (a) Cocos Gram-positivos e (b) bastonetes Gram-positivos isolados do tanque de mosturação. (Fonte: O autor, 2017)

A identificação taxonômica dos micro-organismos isolados do MRS resultou em *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter kobei*. Este resultado diverge do encontrado na coloração de Gram visto que ambos os gêneros identificados são bactérias Gram-negativas. A identificação equivocada dos isolados pelo MALDI-TOF ocorre provavelmente devido à deficiência do banco de dados fornecido pelo fabricante que é

direcionado para a área clínica, conforme discutido na seção 5.2.1 (DUNCAN et al., 2016; CAROLIS et al, 2014; CROXATTO, 2012). A formação de metabólitos e alteração das condições do meio pelas bactérias Gram-positivas pode resultar, como citado anteriormente, na inibição do desenvolvimento de bactérias Gram-negativas (FERNÁNDEZ-LÓPEZ et al., 2008).

5.2.3 Saída do trocador de calor

Na saída do trocador de calor foram obtidos dois isolados do MRS, um do OSA e dois do Petrifilm. Verificou-se a presença de cocos Gram-positivos no MRS e no Petrifilm (Figura 11). Notou-se também a presença de leveduras em um dos isolados do Petrifilm (Figura 12). A identificação deste micro-organismo em um meio seletivo para bactérias lácticas indica que apesar do uso de agentes inibidores e corante diferencial para estas bactérias, esta linhagem de leveduras encontrou condições para seu desenvolvimento. A anaerobiose gerada no meio provavelmente permitiu seu desenvolvimento por apresentarem metabolismo fermentativo (HUTZLER et al., 2015).

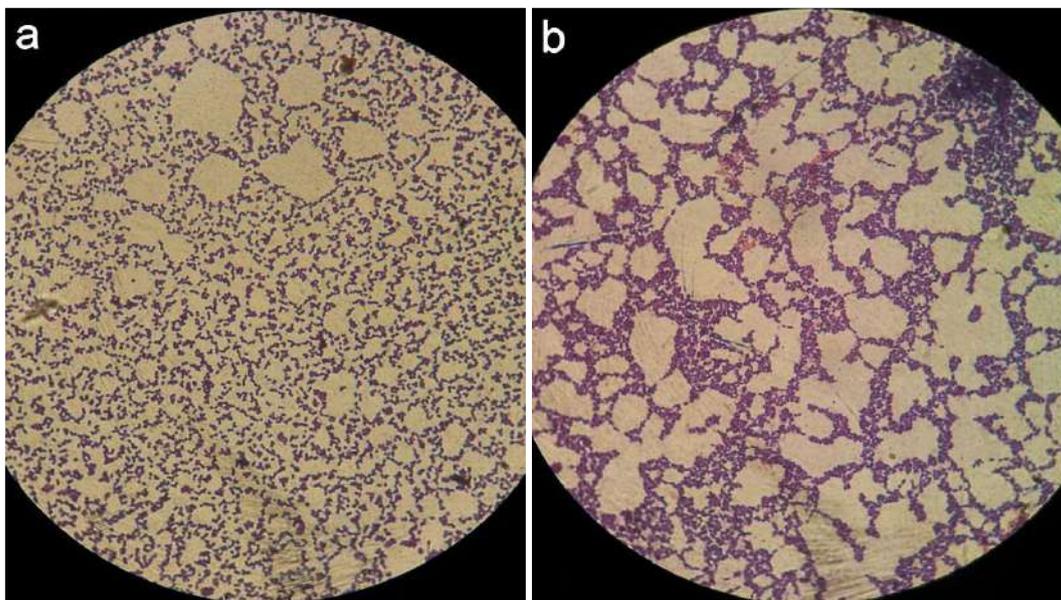


Figura 11. (a) Cocos Gram-positivos identificados no MRS e (b) no Petrifilm isolados da saída do trocador de calor. (Fonte: O autor, 2017)

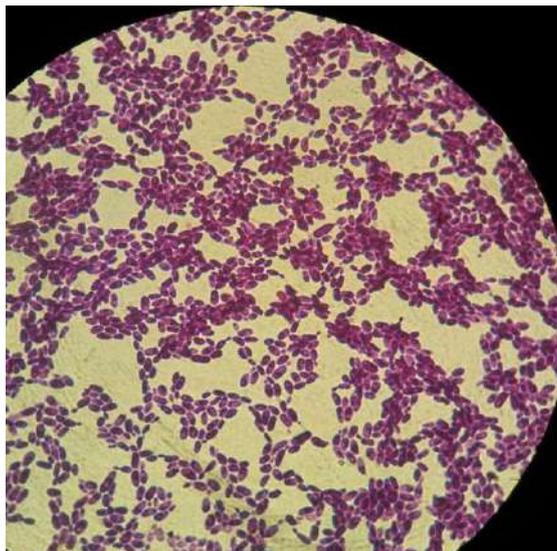


Figura 12. Leveduras identificadas no Petrifilm isolados da saída do trocador de calor.
(Fonte: O autor, 2017)

A identificação pelo MALDI-TOF mostra a presença de *Lactococcus lactis* no isolado proveniente do Petrifilm. Este gênero integra o grupo de bactérias ácido láticas, caracteriza-se por apresentar metabolismo fermentativo, morfologia de cocos, Gram-positivo e exigência nutricional (RAMÍREZ et al., 2011; BOLOTIN et al., 2001). Assim a identificação deste micro-organismo no Petrifilm reforça as condições para o crescimento deste grupo de bactérias oferecidas por este meio. *Lactococcus lactis* são naturalmente encontrados em plantas e animais, apresentando vida livre, bem como no trato gastrointestinal animal (RAMÍREZ et al., 2011; BOLOTIN et al., 2001). Sua presença na planta cervejeira é inevitável. Por outro lado, o gênero *Lactococcus* não é comumente isolado de cervejas (devido às condições adversas desta matriz), logo sua presença indica contaminação ambiental (BOKULICH e BAMFORTH, 2013).

Em contrapartida, o isolado do MRS foi identificado como *Klebsiella pneumoniae*, uma bactéria Gram-negativa. A análise microscópica permitiu a visualização clara de bactérias Gram-positivas neste isolado, logo a identificação feita pela análise espectrofotométrica não foi coerente. Os fatores discutidos na seção 5.2.1 ratificam, novamente, a ocorrência deste equívoco.

O isolado do OSA não pôde ser caracterizado, porém foi identificado pelo MALDI-TOF como *Staphylococcus hominis*. Sua presença na planta produtiva é factível, visto que este gênero faz parte da microbiota da pele e mucosas de humanos e animais. Desta forma, é comum a contaminação por este gênero caso a higienização não

seja feita corretamente (MARINO et al., 2011). Com relação ao meio em que foi identificado, o OSA apesar do pH mais baixo pode permitir o desenvolvimento deste micro-organismo uma vez que este gênero apresenta uma faixa de pH ampla (4,8-8,0) que permite seu crescimento (ALBRECHT, 2018).

5.2.4 Mangueira de transferência

Na mangueira utilizada para a transferência do mosto para os tanques de fermentação, a análise em MRS resultou em dois isolados, sendo apenas um passível de caracterização e identificação. Pela análise microscópica observaram-se bastonetes Gram-positivos (Figura 13).



Figura 13. Bacilos Gram-positivos identificadas no MRS isolados da mangueira de transferência. (Fonte: O autor, 2017)

A identificação pelo MALDI-TOF, por sua vez, sugeriu a presença de *Staphylococcus warneri*, porém com um SV baixo (1,807) indicando uma provável identificação de gênero. Desta forma, essa identificação não é inteiramente confiável. Através da morfologia observada pode-se considerar a presença de bactérias ácido lácticas, porém não é possível afirmar este resultado.

5.2.5 Fermentador 1 – Válvula inferior

No fermentador 1, na válvula inferior destinada à retirada do extrato de leveduras após o término da fermentação foram isoladas duas colônias do MRS e quatro do Petrifilm. O Petrifilm apresentou, na análise microscópica, em três isolados

bastonetes Gram-positivos (Figura 14a) e cocobacilos Gram positivos no quarto isolado (Figura 14b). Na espectrometria de massas os bastonetes foram identificados como *Lactobacillus plantarum* com valores de SV acima de 2,000 (com exceção ao isolado número 29). A identificação de bactérias ácido lácticas no Petrifilm ratifica sua proposta para o desenvolvimento deste grupo de bactérias. O quarto isolado proveniente do Petrifilm não foi identificado pelo MALDI-TOF.

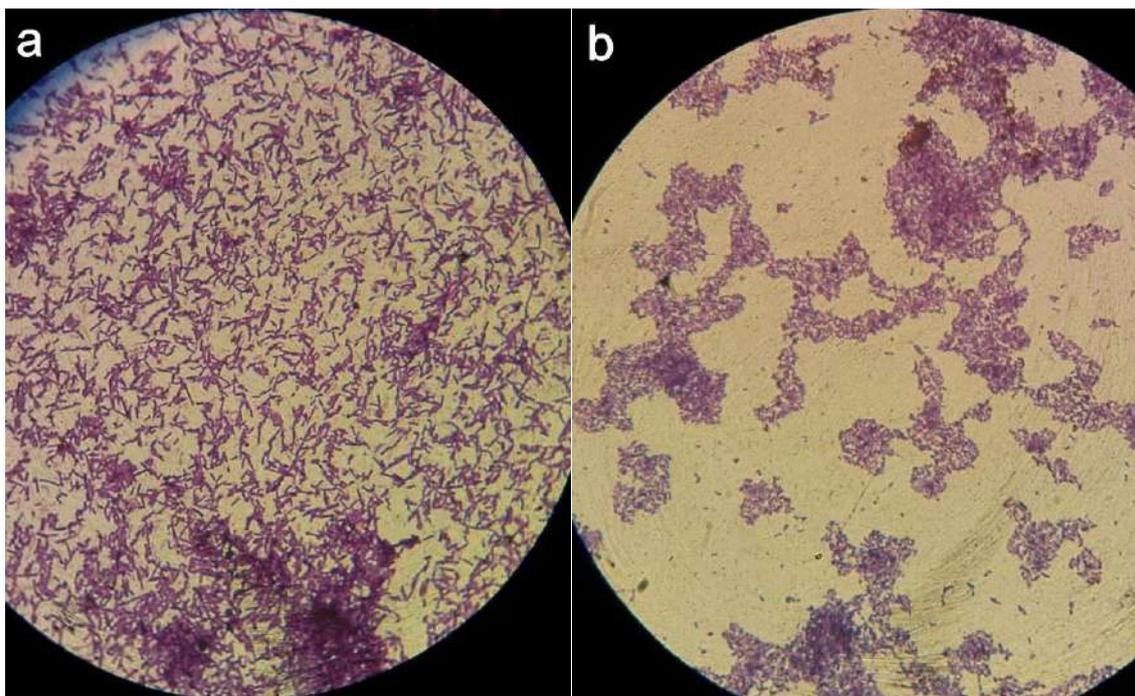


Figura 14. (a) Bastonetes Gram-positivos e (b) cocobacilos Gram-positivos no Petrifilm isolados do tanque de fermentação 1 (v. inferior). (Fonte: O autor, 2017)

No MRS foram observados cocos (em cadeia) (Figura 15) e bastonetes Gram-positivos nos respectivos isolados. O MALDI-TOF identificou os cocos Gram-positivos como *Leuconostoc pseudomesenteroides* e os bastonetes Gram-positivos como *Lactobacillus plantarum*. As identificações e as características observadas na microscopia apresentam congruência, visto que o gênero *Leuconostoc* é Gram-positivo e apresenta-se em cocos em cadeia e o gênero *Lactobacillus* é Gram-positivo e com morfologia de bastonetes.

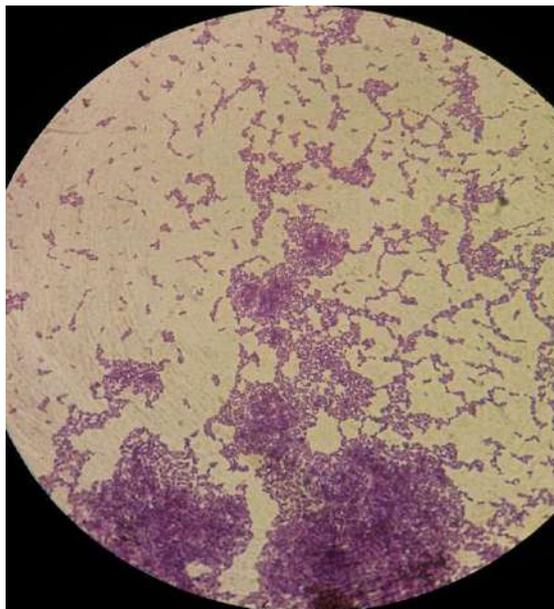


Figura 15. Cocos Gram-positivos em cadeia identificados no MRS isolados do tanque de fermentação 1 (v. inferior). (Fonte: O autor, 2017)

Uma possível origem destas bactérias ácido lácticas advém do fato da válvula encontrar-se em contato com o ambiente. Desta forma, pode haver contaminação ambiental visto que os as bactérias ácido lácticas são micro-organismos de vida livre (RAMÍREZ et al., 2011). Bokilich e Bamforth (2013) indicam a presença de bactérias lácticas como deterioradoras na etapa de fermentação. Assim, é de suma importância o controle microbiológico dos equipamentos para que não haja perda da batelada produzida devido a presença destas linhagens contaminantes.

Por outro lado, devido ao fato de ser uma planta industrial destinada a cervejarias ciganas, a cerveja produzida anteriormente à coleta pode aplicar este micro-organismo (uma linhagem específica) na sua produção, se for uma cerveja do tipo *sour*, por exemplo. A posterior higienização pode não ter sido feita corretamente resultando na permanência deste micro-organismo no local.

De modo geral, o crescimento dos isolados apresentou-se nos meios destinados às bactérias ácido lácticas, MRS e Petrifilm, e foram identificadas como tais pela espectrometria de massas. Desta forma, percebe-se a validade das condições destes meios para o desenvolvimento deste grupo de bactérias.

5.2.6 Fermentador 2 – Válvula superior e inferior

No fermentador 2, na válvula superior, destinada à retirada do produto, foram isoladas três colônias do MRS, duas do OSA e duas do Petrifilm.

Nos três isolados do MRS e em um do OSA, a análise microscópica permitiu a verificação da presença de leveduras (Figura 16). Por serem meios menos complexos, o MRS e OSA apresentam condições favoráveis de crescimento a uma maior variedade de micro-organismos. A identificação pelo MALDI-TOF condiz com o observado, sendo identificado *Candida robusta* em três dos quatro isolados citados (um dos isolados não foi identificado).

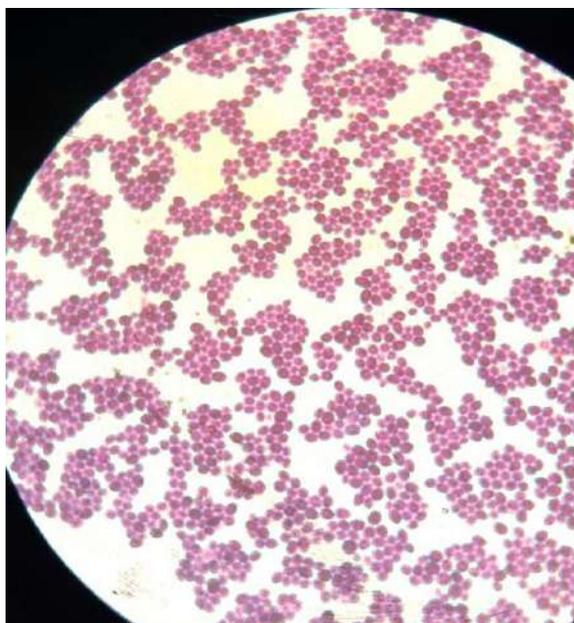


Figura 16. Leveduras identificados no MRS e OSA isolados do tanque de fermentação 2 (v. superior). (Fonte: O autor, 2017)

A identificação de *Candida robusta* no tanque de fermentação pode provir de sua semelhança genética com a *Saccharomyces cerevisiae* (sendo, inclusive, tratados como pseudônimos) (TORNARI-LEHOCKI, 2000). Desta forma, sua identificação na válvula do tanque deve-se à aderência de células no momento de retirada do mosto fermentado. Porém, por apresentar-se em vida livre, pode indicar uma contaminação ambiental, posto que a válvula se encontrava aberta em contato com o ambiente. O meio MRS é rico nutricionalmente e possui pH próximo ao neutro, desta forma apresentou condições favoráveis ao desenvolvimento deste micro-organismo.

O segundo isolado do OSA não pôde ser caracterizado, porém foi identificado pelo MALDI-TOF como *Bacillus megaterium*. A possível presença de *Bacillus megaterium* pode indicar a contaminação do mosto. Estes micro-organismos são formadores de esporos e podem estar presentes em diversos ambientes, inclusive em plantações. Assim, a contaminação dos grãos pode ter ocorrido gerando a contaminação do mosto e conseqüentemente este micro-organismo foi identificado na válvula do tanque de fermentação. Bokulich e Bamforth (2013) apontam a presença de *Bacillus* spp. causando a deterioração do mosto devido a sua acidificação e à formação de nitrosaminas. O meio OSA permite a entrada de oxigênio por não apresentar nenhum agente de barreira deste tipo, assim o *B. megaterium* não encontrou inibição para desenvolver-se neste meio por ser um micro-organismo aeróbio (VARY et al., 2007).

Um dos isolados do Petrifilm apresentou-se como cocos Gram-positivos ao ser observado em microscópio (Figura 17a). As bactérias Gram-positivas analisadas podem ser bactérias ácido lácticas, características deste meio, por agruparem micro-organismos que apresentam a morfologia observada (*Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*). Por outro lado, verificou-se a presença de leveduras no segundo isolado analisado (Figura 17b). Como discutido anteriormente, estas leveduras encontraram condições para seu desenvolvimento apesar das barreiras seletivas de crescimento empregadas no Petrifilm.

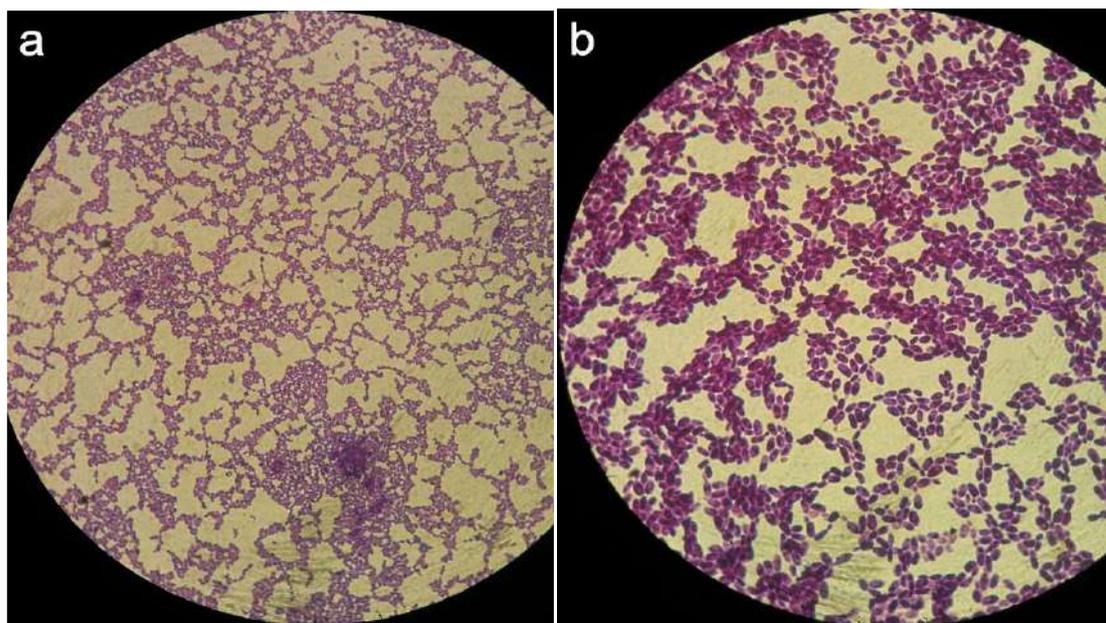


Figura 17. (a) Cocobacilus Gram-positivos e (b) leveduras identificados no Petrifilm isolados do tanque de fermentação 2 (v. superior). (Fonte: O autor, 2017)

A válvula inferior do fermentador 2 apresentou crescimento apenas no MRS, originando um isolado deste meio. Através da microscopia, a morfologia observada foi cocos, em cachos, Gram-positivos.

5.2.7 Bagaço de malte

Do bagaço de malte foram obtidos três isolados do MRS e três do OSA. Na análise microscópica, os seis foram caracterizados como leveduras. Porém, foram observadas células alongadas (Figura 18a) nos isolados 41, 42, 43 e 46 e células arredondadas (Figura 18b) nos isolados 44 e 45. A identificação pelo MALDI-TOF coincide com o observado. As células alongadas foram identificadas como *Candida krusei* enquanto as células arredondadas foram identificadas como *Candida robusta* e *Candida lusitaniae*.

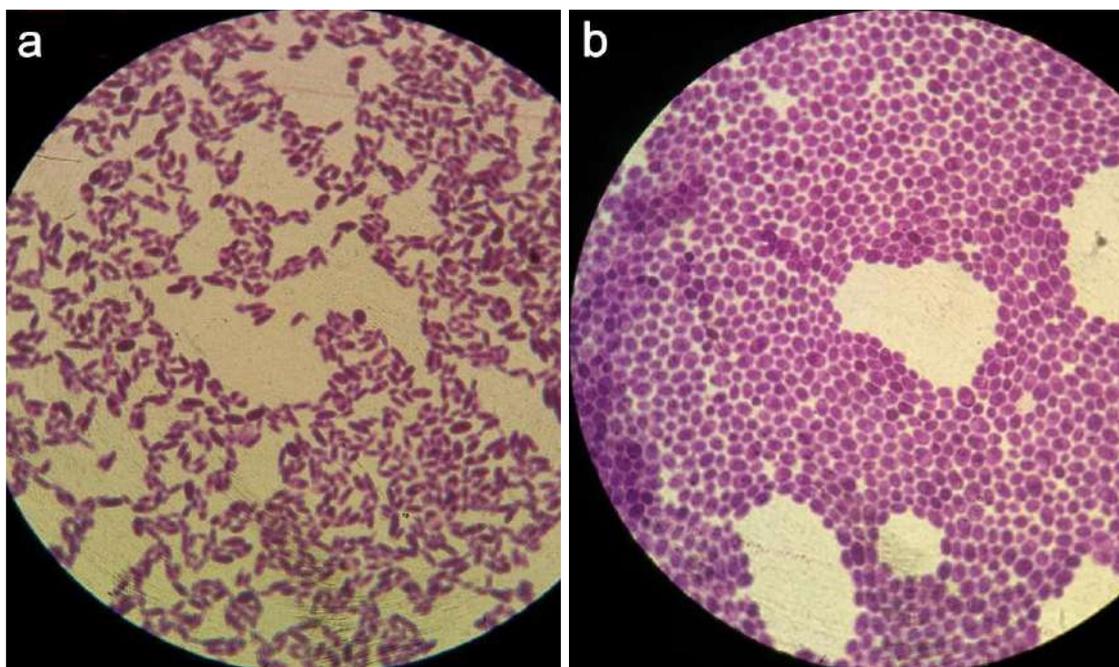


Figura 18. (a) Leveduras identificadas no MRS e (b) OSA isolados do bagaço de malte.
(Fonte: O autor, 2017)

Os meios MRS e OSA não contêm barreiras tecnológicas específicas para o crescimento destas leveduras, desta forma as condições encontradas foram favoráveis para seu desenvolvimento.

Hutzler et al. (2015) indicam a presença de *Candida krusei* na produção de cervejas, porém quando fermentação espontânea é aplicada. Neste caso, as leveduras responsáveis por fermentar o mosto provêm do ambiente. Os fungos em geral apresentam-se em vida livre, sendo encontrados na natureza de forma geral, bem como

na pele humana, mucosas, trato gastrointestinal e reprodutor (LEITE JR et al., 2011; SILVA, 2011). A presença destas espécies no bagaço de malte analisado indica contaminação ambiental visto que não é utilizada a fermentação natural. Assim, esta contaminação deve-se, provavelmente, ao fato deste resíduo ser armazenado em reservatórios abertos, em contato com o ambiente.

Em síntese, o Petrifilm permitiu a maior seletividade de crescimento quando comparado aos meios convencionais (MRS e OSA). Em virtude da presença de agentes seletivos e do controle de anaerobiose através de compostos que eliminam o oxigênio este meio é capaz de selecionar um grupo restrito de micro-organismos. Dentre os dez isolados provenientes do Petrifilm, 80% foram caracterizados como bactérias Gram-positivas. Dentre estas, 50% foram identificadas pelo MALDI-TOF como bactérias ácido lácticas apresentando um *Score Value* acima de 2,000 na maior parte dos casos.

Por outro lado, a identificação de leveduras em dois isolados indica certa vulnerabilidade do método. A anaerobiose do meio foi, possivelmente, responsável por permitir o desenvolvimento deste micro-organismo. A presença de agentes inibidores não foi suficiente para reprimir seu crescimento.

Os métodos convencionais apresentam maior simplicidade em sua formulação com relação a estes agentes seletivos. O MRS possui acetato de sódio que atua como uma barreira inibitória para o crescimento de alguns micro-organismos, porém ainda permite o desenvolvimento de uma maior variedade de gêneros por apresentar pH mais neutro e ser rico nutricionalmente. O OSA não apresenta nenhum composto em sua formulação responsável por atuar como inibidor. Possui apenas o pH reduzido (em torno de 5,5) e este é seu único fator de barreira. Dos 29 isolados provenientes dos meios convencionais, 51,7% foram caracterizados com bactérias Gram-positivas das quais apenas 13,3% foram identificadas como bactérias ácido lácticas pelo MALDI-TOF.

O uso da espectrometria de massas permitiu a identificação de aproximadamente 50% de todos os isolados analisados de forma congruente a análise microscópica. O uso do banco de dados fornecido pelo fabricante apresenta espectros de micro-organismos de interesse clínico. Assim amostras de origem alimentar e ambiental estão susceptíveis a identificação equivocada ou a não identificação devido a ausência de um espectro de referência. Existe a escassez de dados referentes aos micro-organismos ambientais e de

agentes de importância alimentar, principalmente contaminantes e deterioradores (DUNCAN et al., 2016; AGUSTINI, 2014; CROXATTO, 2012). Para a análise destas matrizes se faz necessário um banco de dados complementar com um número de espectros representativo dos micro-organismos de interesse. Este banco de dados deve ser implementado a partir da inserção de espectros de micro-organismos identificados por outros métodos, como a biologia molecular (AGUSTINI, 2014).

Dentre os resultados encontrados, algumas identificações indicam possíveis pontos de contaminação. A manipulação inadequada, a limpeza ineficiente dos equipamentos e o contato com o ambiente são fontes de entrada de micro-organismos deterioradores na planta produtiva. Tanto a higiene pessoal como a limpeza dos equipamentos devem garantir a segurança no processo. Até mesmo o armazenamento do resíduo deve ser feito de forma adequada por poder ser, posteriormente, destinado à produção de ração animal. A contaminação por fungos filamentosos pode causar a formação de micotoxinas que não são eliminadas no tratamento térmico. Assim, a análise de perigos e pontos críticos de controle (APPCC) ao longo da cadeia produtiva torna-se imprescindível para a garantia da qualidade do produto e sua segurança. Frente a estas observações fica clara a importância das boas práticas de fabricação na produção alimentícia de modo geral.

6 CONCLUSÕES

- A contagem total no meio Petrifilm foi menor, na maior parte dos casos, quando comparada aos meios convencionais, apresentando maior seletividade quando as colônias isoladas foram identificadas.
- Apesar da maior seletividade, a tecnologia aplicada no Petrifilm parece não ser suficiente para o desenvolvimento exclusivo de bactérias ácido lácticas, uma vez que leveduras foram detectadas neste meio.
- A análise microscópica permitiu a caracterização dos isolados de forma satisfatória.
- A identificação pelo MALDI-TOF MS apresentou baixa eficiência na identificação dos isolados analisados, visto que resultados equivocados foram detectados.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

3M Petrifilm Lactic Acid Bacteria Count Plate. Disponível em:

<https://www.3m.com/3M/en_US/company-us/all-3m-products/~3M-Petrefilm-Lactic-Acid-Bacteria-Count-Plates/?N=5002385+3291809224&rt=rud>. Acesso em: 21 nov. 2017

AGOSTINI, B. C. **Identificação molecular de leveduras vínicas e implantação de um banco de dados suplementar fundamentado em espectrometria de massa MALDI-TOF.** 2014. 125f. Tese de Doutorado-Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

ALBRECHT, J. A. **Staphylococcus aureus.** Disponível em:

<<https://food.unl.edu/staphylococcus-aureus>>. Acesso em: 18 jan. 2018.

ALWAZEER, D.; DELBEAU, C.; DIVIES, C.; CACHON, R. Use of redox potential modification by gas improves microbial quality, color retention and ascorbic acid stability of pasteurized orange juice. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 89, p. 21-29, 2003.

BIRD, P.; FLANNERY, J.; CROWLEY, E.; AGIN, J.; GOINS, D.; JECHOREK, R. Evaluation of the 3M Petrifilm rapid yeast and mold count plate for the enumeration of yeast and mold in food: collaborative study. **J. AOAC Int.**, v. 98, n. 3, p. 767-783, 2015.

Blog O Caneco. Disponível em: <<http://www.ocaneco.com.br/afinal-o-que-e-malte/>>. Acesso em: 4 dez. 2017.

BOKULICH, N. A. e BAMFORTH, C. W. The microbiology of malting and brewing. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 77, n. 2, p. 157-172, 2013.

BOLOTIN, A.; WINCKER, P.; MAUGER, S.; JAILLON, O.; MALARME, K.; WEISSENBACH, J.; EHRLICH, S. D.; SOROKIN, A. The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis* IL1403. **Genome Res.**, v. 11, n. 5, p. 731-753, 2001.

BRASIL. **Decreto nº 6.871, de junho de 2009.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 4 jun. 2009

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 54, de 5 de novembro de 2001.** Regulamento técnico Mercosul de produtos de cervejaria. Diário Oficial da União, seção I, p. 42, 7 de novembro de 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria de consolidação nº 5, de 28 de setembro de 2017, anexo XX, capítulo V.** Diário Oficial da União nº 190, seção I, página 360, 3 de outubro de 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Resolução nº 12, de 24 de julho de 1978. Normas técnicas especiais.** Brasília: Diário Oficial da União, seção I, parte I, página 11.528, 24 de julho de 1978

BROOKS, J. R.; BUCHMANN, N.; PHILLIPS, S.; EHLERINGER, B.; EVANS, R. D.; LOTT, M.; MARTINELLI, L. A.; POCKMAN, W. T.; SANDQUIST, D.; SPARKS, J. P.; SPERRY, L.; WILLIAMS, D.; EHLERINGER, J. R. Heavy and light beer: A carbono isotope approach to detect C₄ carbon in beers of different origins, styles and prices. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, n. 22, p. 6413-6418, 2002.

CAROLIS, E.; VELLA, A.; VACCARO, L.; TORELLI, R.; SPANU, T.; FIORI, B.; POSTERARO, B.; SANGUINETTI, M. Application of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. **J. Infect. Dev. Ctries.**, v. 8, n. 9, p. 1081-1088, 2014.

Cerveja Pura. Disponível em: <<http://cervejapura.blogspot.com.br/2014/02/>>. Acesso em: 4 dez. 2017.

CHAVES, R. L. P. **Reinventing a business model**: how contract breweries became a permanente form of organization. 2016. 69f. Dissertação de Mestrado – FGV, Rio de Janeiro, 2016.

CROXATTO, A.; PROD'HOM, G.; GREUB, G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 36, p. 380-407, 2012.

DE MAN, J. C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M. E. A médium for the cultivation of Lactobacilli. **J. Appl. Bact.**, v. 23, n. 1, p. 130-135, 1960.

DILAY, E.; VARGAS, J. V. C.; AMICO, S. C.; ORDONEZ, J. C. Modeling, simulaton and optimization of a beer pasteurization tunnel. **J. Food Eng.**, v. 77, p. 500-513, 2006.

DRAGONE, G.; MUSSATTO, S. I.; NOGUEIRA, A. D.; ALMEIDA e SILVA, J. B. Produção de cerveja: Microrganismos deteriorantes e métodos de detecção. **Braz. J. Food Technol.**, v. 10, n. 4, p. 240-251, 2007.

DUNCAN, M. W.; NEDELKOV, D.; WALSH, R.; HATTAN, S. J. Applications of MALDI mass spectrometry in clinical chemistry. **Clin. Chem.**, v. 62, n. 1, p. 134-143, 2016.

Encyclopedia of Life. Disponível em: <<http://eol.org/pages/595013/overview>>. Acesso em: 4 dez. 2017.

FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; SENDRA, E.; SAYAS-BARBERÁ, E.; NAVARRO, C.; PÉREZ-ALVAREZ, J. A. Physico-chemical and microbiological profiles of “salchichón” (Spanish dry-fermented sausage) enriched with orange fiber. **Meat Sci.**, v. 80, p. 410-417, 2008.

FERREIRA, I. M. P. L. V. O.; PINHO, O.; VIEIRA, E.; TAVARELA, J. G. Brewer's Saccharomyces yeast biomass: characteristics and potential applications. **Trends Food Technol.**, v. 21, p. 77-84, 2010.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança de alimentos**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

FURTADO, D. N. **Isolamento de bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas e sua aplicação no controle de *Listeria monocytogenes* em queijo frescal de leite de cabra.** 87p. Dissertação de Mestrado. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

GOLDIN, B. R.; GORBACH, S. L.; SAXELIN, M.; BARAKAT, S.; GUALTIERI, L.; SALMINEN, S. Survival of *Lactobacillus* species (strain GG) in human gastrointestinal tract. **Dig. Dis. Sci.**, v. 37, n. 1, p. 121-128, 1992

GOULART, V. A. M.; RESENDE, R. R. **MALDI-TOF: uma ferramenta revolucionária para as análises clínicas e pesquisa do câncer.** Nanocell News, v. 1, n. 3, 2013. Disponível em: <<http://www.nanocell.org.br/maldi-tof-uma-ferramenta-revolucionaria-para-as-analises-clinicas-e-pesquisa-do-cancer/>>. Acesso em: 18 jan. 2018.

HAYS, G. L. The isolation, cultivation and identification of organisms which have caused spoilage in frozen concentrated orange juice. **Florida State Horticultural Society**, v. 54, p. 135-137, 1951.

HILL, A. E. **Traditional methods of detection and identification of brewery spoilage organisms.** Brewing Microbiology, p. 271-286, 2015.

HORN, C. S.; FRANKE, M.; BLAKEMORE, F. B.; STANNEK, W. Modeling and simulation os pasteurization and staling effects during tunnel pasteurization of bottled beer. **Food Bioprod Process.**, v. 75, p. 23-33, 1997.

HUERTAS, R. A. P. Bacterias acido lácticas: papel funcional em los alimentos. **Biotecnologia em el Sector Agropecuario y Agroindustrial**, v. 8, n. 1, p. 93-105, 2010.

HUGHES, P. The significance of iso- α -acids for beer quality. **J. Inst. Brew.**, v. 106, n. 5, p. 271-276, 2000.

HUTZLER, M.; KOOB, J.; RIEDL, R.; SCHNEIDERBANGER, H.; MUELLER-AUFFERMANN, K.; JACOB, F. **Yeast identification and characterization.** Brewing Microbiology, p. 65-104, 2015.

Juan Brew. Disponível em: <<https://juanbrew.com/shop/beer-ingredients-and-raw-materials/hops/centennial-hop-pellets/>>. Acesso em: 4 dez. 2017.

JURINKE, C.; OETH, P.; VAN DEN BOOM, D. MALDI-TOF Mass Spectrometry. **Mol. Biotechnol.**, v. 26, p. 147-163, 2004.

KELLNER, V.; JURKOVÁ, M.; CULIK, J.; HORÁK, T.; CEJKA, P. Some phenolic compounds in Czech hops and beer of Pilsen type. **Brewing Science**, jan/fev, p. 5-10, 2007.

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

KOURTIS, L. K.; ARVANITTOYANNIS, I. S. Implementation of hazard analysis critical control point (HACCP) system to the alcoholic beverages industry. **Food Rev. Int.**, v. 17, n. 1, p. 1-44, 2001.

Lab Network. Disponível em: <<http://labnetwork.com.br/noticias/enzima-da-levedura-do-pao-mostra-potencial-contracelulas-de-leucemia-linfoide-aguda/>>. Acesso em: 4 dez. 2017.

LEITE JR, D. P.; YAMAMOTO, A. C. A.; MARTINS, E. R.; TEIXEIRA, A. F. R.; HAHN, R. C. Species of *Candida* isolated from anatomically distinct sites in military personnel in Cuiabá, Mato Grosso, Brazil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 4, p. 675-680, 2011.

LUCIANO, P. R. S.; OKAZAKI, M. M.; MALLER, G. S.; SILVEIRA, N. F. A.; CARDOZO, G. M. B. Q. Avaliação microbiológica das condições higiênico-sanitárias de restaurantes da região metropolitana de Campinas, SP. In: Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica, 6., 2012, Jaguariúna/SP. **Anais...** Embrapa, 2012.

MARINO, M.; FRIGO, F.; BARTOLOMEOLI, I.; MAIFRENI, M. Safety-related properties of staphylococci isolated from food and food environments. *Journal of Applied Microbiology*, v. 110, n. 2, p. 550-561, 2011.

MENZ, G.; ANDRIGHETTO, C.; LOMBARDI, A.; CORICH, V.; ALDRED, P.; VRIESEKOOOP, F. Isolation, identification and characterisation of beer-spoilage lactic acid bacteria from microbrewed beer from Victoria, Australia. **J. Inst. Brew.**, v. 116, n. 1, p. 14-22, 2010.

MIRANDA, M. Z. **Trigo:** germinação e posterior extrusão para obtenção de farinha integral extrusada de trigo germinado. Embrapa, 2006.

NUNES, N. M.; BRITO, T. C.; DA FONSECA, N. D.; DE AGUIAR, P. F.; MONTEIRO, M.; PERRONE, D.; TORRES, A. G. Phenolic compounds of Brazilian beers from different types and styles and application of chemometrics for modeling antioxidant capacity. **Food Chem.**, p. 105-113, 2016.

NAGY, E.; BECKER, S.; KOSTRZEWA, M.; BARTA, N.; URBÁN, E. The value of MALDI-TOF MS for the identification of clinically relevant anaerobic bacteria in routine laboratories. **J. Med. Microbiol.**, v. 61, p. 1393-1400, 2012.

NEOGEN CORPORATION. **Lactobacilli MRS agar.** Disponível em: http://foodsafety.neogen.com/pdf/acumedia_pi/7543_pi.pdf. Acesso em: 16/01/2018.

NERO, L. A.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; ORTOLANI, M. B. T.; TAMANINI, R.; FRANCO, B. D. G. M. Comparison of Petrifilm aerobic count plates and de Man-Rogosa-Sharpe agar for enumeration of lactic acid bacteria. **J. Rapid Meth Auto Microbiol.**, v. 14, p. 249-257, 2006.

NERO, L. A.; RODRIGUES, L. A.; VIÇOSA, G. N.; ORTOLANI, M. B. T. Performance of Petrifilm Aerobic Count Plates on numeration of lactic acid bacteria in fermented milks. **J. Rapid Meth Auto Microbiol.**, v. 16, p. 132-139, 2008

NOGUEIRA, V. C. **Culturas de bactérias lácticas com propriedades probióticas e tecnológicas para aplicação como bioconservantes.** 104p. Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

ORTOLANI, M. B. T.; VIÇOSA, G. N.; BELOTI, V.; NERO, L. A. Screening and enumeration of lactic acid bacteria in milk using three different culture media in Petrifilm Aerobic Count plates and conventional pour plate methodology. **J. Dairy Res.**, v. 74, n. 4, p. 387-391, 2007.

PASTERNAK, J. Novas metodologias de identificação de micro-organismos: MALDI-TOF. **Einsten** (São Paulo), v. 10, n. 1, p. 118-119, 2012.

PATERNOSTER, A.; CAMP, J. V.; VANLANDUIT, S.; WEEREN, A.; SPRINGAEL, J.; BRAET, J. The performance of beer packaging: Vibration damping and thermal insulation. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 11, p. 91-97, 2017.

PELEMBE, L. A. M.; DEWAR, J.; TAYLOR, J. R. N. Effect of malting conditions on pearl millet malt quality. **J. Inst. Brew.**, v. 108, n. 1, p. 7-12, 2002.

PEYER, L. C.; ZANNINI, E.; ARENDT, E. K. Lactic acid bacteria as sensory biomodulators for fermented cereal-based beverages. **Trends Food Sci. Technol.**, 2016.

PINHEIRO, M. B.; WADA, T. C.; PEREIRA, C. A.M. Análise microbiológica de tábuas de manipulação de alimentos de uma instituição de ensino superior em São Carlos, SP. **Revista Simbio-Logias**, v. 3, n. 5, p. 115-124, 2010.

RAMÍREZ, J. C. R.; ULLOA, P. R.; GONZÁLEZ, M. Y. V.; ULLOA, J. A.; ROMERO, F. A. Bactérias lácticas: importancia en alimentos y sus efectos en la salud. **Revista Fuente**, ano 2, n. 7, 2011.

RIBEIRO, M. W.; RODRIGUEZ-GONZÁLEZ, O.; JAYARAM, S. H.; GRIFFITHS, M. W. Processing temperature, alcohol and carbonation levels and their impact on pulsed electric fields (PEF) mitigation of selected characteristic microorganisms in beer. **Food Res. Int.**, v. 44, p. 2524-2533, 2011.

ROSELINO, M. N. **Desenvolvimento de um embutido cárneo fermentado, com teores reduzidos de gordura e sais de cura, através da utilização de culturas probióticas**. 197f. Tese de Doutorado em Alimentos e Nutrição – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2016.

SANT’ANA, A. S.; CONCEIÇÃO, C.; AZEREDO, D. R. P. Comparação entre métodos rápidos Simplate® TPC-CI e Petrifilm® AC e os métodos convencionais de contagem em placas para a enumeração de aeróbios mesófilos em sorvetes. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 22, n. 1, p. 60-64, 2002.

SANTOS, I. J.; SANTOS, Y. L.; OLIVEIRA, M. G. A.; SILVA, P. H. A. Expressão da alfa e beta amilase durante a germinação de cevada. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 12, n. 1, p. 67-73, 2010.

SILVA, H. M. **Caracterização e identificação de leveduras do gênero *Candida* em pacientes transplantados de medula óssea**. 2011. 53f. Dissertação de Mestrado – UFG, Goiânia. 2011.

SILVA, J. B. A. **Cerveja**. In: Venturini Filho, W. G. Tecnologia de bebidas: matéria-prima, processamento, BPF/APPCC, legislação e mercado. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., 2005. p. 347-382.

SILVA, M. P.; CAVALLI, D. R.; OLIVEIRA, T. C. R. M. Avaliação do padrão coliformes a 45°C e comparação da eficiência das técnicas dos tubos múltiplos e Petrifilm EC na detecção de coliformes totais e *Escherichia coli* em alimentos. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 26, n. 2, p. 352-359, 2006.

SOUZA, L. M. J.; COSTA, A. C.; NERO, L. A.; COUTO, E. P.; FERREIRA, M. A. Evaluation of Petrifilm system compared with traditional methodology in count of indicators of sanitary-hygienic quality and pathogenic microorganisms in sheep milk. **Food Sci. Technol.**, v. 35, n. 2, p. 375-379, 2015.

SRINIVASAN, V.; GOLDBERG, D.; HAAS, G. J. Contributions to the antimicrobial spectrum of hop constituents. **Economy Botany**, v. 58, p. s230-s238, 2004.

SUZUKI, K. Microbiological instability of beer caused by spoilage bacteria. **J. Inst. Brew.**, v. 117, n. 2, p. 131-155, 2011.

TAVOLARO, P.; FERRATI, A. R.; DESTRO, M. T.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B. D. G. M. Performance of two ready-to-use systems for enumeration of aerobic mesophilic microorganisms in frozen goat milk. **Braz. J. Microbiol.**, v. 36, n. 3, p. 295-300, 2005.

TORNARI-LEHOCZKI, J.; DLAUCHY, D. Delimitation of brewing yeast strains using different molecular techniques. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 62, n. 1-2, p. 37-45, 2000.

TSAROUHAS, P. H.; ARVANITOYANNIS, I. S. Assessment of operation management for beer packaging line based on field failure data: a case study. **J. Food Eng.**, v. 98, p. 51-59, 2010.

VARY, P. S.; BIEDENDIECK, R.; FUERCH, T.; MEINHARDT, F.; ROHDE, M.; DECKWER, W.; JAHN, D. Bacillus megaterium-from simple soil bacterium to industrial protein production host. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 76, n. 5, p. 957-967, 2007.

VENTURINI FILHO, W. G.; CEREDA M. P. **Cerveja**. In: Aquarone, E., Borzani, W., Schmidell, W., Lima, U. A. Biotecnologia industrial. 1. ed., v. 4. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., 2001. p. 91-144.

WITTHUHN, R. C.; DUVENAGE, W.; GOUWS, P. A. evaluation of different growth media for the recovery of the species of *Alicyclobacillus*. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 45, n. 2, p. 224-229, 2007.

WOFFENDEN, H. M.; AMES, J. M.; CHANDRA, S. Relationships between antioxidante activity, color and flavor compounds of crystal malt extracts. **J. Agric. Food Chem.**, v. 49, n. 11, p. 5524-5530, 2001.