

Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP
Faculdade de Engenharia de Alimentos - FEA
Departamento de Tecnologia de Alimentos - DTA

**Estabilização Microbiológica de Cerveja por Alta Pressão
Dinâmica e Tratamento Combinado Utilizando Bioprotetores**

Mark Alexandrow Franchi
Farmacêutico

Prof. Dr. Marcelo Cristianini
Orientador

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de
Campinas para a obtenção do título de Doutor em Tecnologia de Alimentos

Campinas – SP

2006

i

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

F846e Franchi, Mark Alexandrow
Esatabilização microbiológica de cerveja por alta pressão dinâmica e tratamento combinado utilizando bioprotetores / Mark Alexandrow Franchi. -- Campinas, SP: [s.n.], 2006.

Orientador: Marcelo Cristianini
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Homogeneização por alta pressão. 2. Cerveja. 3. Bactérias produtoras de ácido láctico. I. Cristianini, Marcelo. II. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

(cars/fea)

Titulo em inglês: Microbiological stabilization of beer by dynamic high pressure and combined treatments using bioprotectants

Palavras-chave em inglês (Keywords): High pressure homogenization, Beer, Lactic Acid Bacteria

Titulação: Doutor em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora: Marcelo Cristianini

Hilary Castle de Menezes

Amauri Rosenthal

Ranulfo Monte Alegre

Flávio Luis Schmidt

Carlos Alberto Rodrigues dos Anjos

Programa de Pós Graduação: Programa em Tecnologia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Cristianini
Orientador
Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP

Prof^a. Dr^a. Hilary Castle de Menezes
Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP

Dr. Amauri Rosenthal
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa – Rio de Janeiro

Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre
Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP

Prof. Dr. Flávio Schmidt
Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP

Prof. Dr. Carlos Alberto Rodrigues Anjos
Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP

AGRADECIMENTOS

- À minha mulher Márcia e minha filha Verônica pelo amor e apoio.
- Ao Prof. Marcelo Cristianini pela orientação, amizade, apoio e incentivo.
- Aos meus pais pelo apoio, amor e compreensão.
- Aos colegas do laboratório sempre prestativos, especialmente, Claudia Pinho, Gustavo Levi, Flávio Campos,
- Aos estagiários de iniciação científica diretamente envolvidos na pesquisa Patrícia Levi, Alline A. Lima e Flávia Marinho.
- À Ana Lourdes, Ana Maria, Judite e José Roberto pela prontidão em ajudar e colaboração.
- À minha querida avó, Dra. Olga Alexandrow.

ÍNDICE

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	1
1.1 OBJETIVO GERAL:.....	2
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	2
CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 CONTAMINAÇÃO MICROBIOLÓGICA DA CERVEJA.....	3
2.2 ESTABILIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE CERVEJA.....	4
2.3 TRATAMENTO TÉRMICO E QUALIDADE DE CERVEJA.....	5
2.4 PROCESSAMENTO POR ULTRA-ALTA PRESSÃO (UAP)	6
2.5 TRATAMENTO POR ALTA PRESSÃO DINÂMICA	8
2.6 BIOPROTETORES	11
2.6.1 Bacteriocinas	12
2.6.2 Extrato de lúpulo	15
2.6.3 Lisozima	16
CAPÍTULO 3 - PASTEURIZAÇÃO DE CERVEJA TIPO PILSEN POR ALTA PRESSÃO DINÂMICA - DETERMINAÇÃO DO MICROORGANISMO ALVO, ESTUDO DA CINÉTICA DE DESTRUIÇÃO E DO EFEITO DE MÚLTIPLAS PASSAGENS.	19
3.1 INTRODUÇÃO.....	19
3.2 MATERIAL E METODOS.....	21
3.2.1 Matéria Prima	21
3.2.2 Microrganismos.....	21
3.2.3 Meios de Cultura	21
3.2.4 Estabilização microbiológica da cerveja (seleção de microrganismo alvo).....	22
3.2.5 Determinação da cinética de destruição do microrganismo alvo	23
3.2.6 Ensaio de múltiplas passagens	23
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
3.3.1 Determinação da cinética de destruição do microrganismo alvo	28
3.3.2 Ensaio de múltiplas passagens	30
3.4 CONCLUSÃO.....	32
3.5 BIBLIOGRAFIA	32
CAPÍTULO 4 - EFEITO DA TEMPERATURA INICIAL DE PROCESSAMENTO POR ALTA PRESSÃO DINÂMICA E CONCENTRAÇÃO INICIAL DE CO₂ SOBRE A DESTRUIÇÃO DE L. DELBRUECKI EM CERVEJA TIPO PILSEN.	35
4.1 INTRODUÇÃO.....	35
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.2.1 Matéria Prima	36
4.2.2 Microrganismo	36
4.2.3 Meios de Cultura	36
4.2.4 Estabilização microbiológica da cerveja	37
4.2.5 Efeito da temperatura de entrada.....	37
4.2.6 Efeito da concentração de CO ₂ na cerveja.	38
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.3.1 Efeito da temperatura de entrada.....	38

4.3.2	Efeito da concentração de CO ₂ na cerveja.....	41
4.4	CONCLUSÃO.....	42
4.5	BIBLIOGRAFIA.....	43
CAPÍTULO 5 - COMBINAÇÃO DE ALTA PRESSÃO DINÂMICA E DE LISOZIMA PARA TRATAMENTO DE <i>L. BREVIS</i> EM UM SISTEMA MODELO DE ALIMENTO - TAMPÃO FOSFATO PH 6,0.....		45
5.1	INTRODUCTION.....	45
5.2	MATERIAL AND METHODS.....	47
5.2.1	Bacteria and growth media.....	47
5.2.2	Muramidase activity.....	47
5.2.3	Dinamic high pressure treatment.....	48
5.2.4	Minimal inhibitory concentration (MIC).....	48
5.2.5	Dynamic high pressure treatment of lysozyme.....	48
5.2.6	Effect of lysozyme in a <i>Lactobacillus brevis</i> suspension.....	49
5.2.7	Effect of dynamic high pressure on <i>L. brevis</i> suspension.....	49
5.2.8	Combined treatment of <i>L. brevis</i> suspension and storage cell count.....	49
5.3	RESULTS AND DISCUSSION.....	50
5.3.1	MIC and Growth Curve.....	50
5.3.2	High pressure homogenisation treatment of lysozyme.....	54
5.3.3	Effects of dynamic high pressure on a <i>L. brevis</i> suspension.....	56
5.3.4	Combined treatment of the <i>L. brevis</i> suspension and storage cell count.....	57
5.4	CONCLUSION.....	59
5.5	REFERENCES.....	60
CAPÍTULO 6 - ESTABILIZAÇÃO DE CERVEJA TIPO PILSEN POR ANTIMICROBIANOS BIOPROTETORES E ESTUDO DE TRATAMENTO COMBINADO COM ALTA PRESSÃO DINÂMICA.....		64
6.1	INTRODUÇÃO.....	64
6.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	66
6.2.1	Matéria Prima.....	66
6.2.2	Microrganismos.....	66
6.2.3	Meios de Cultura.....	67
6.2.4	Bioprotetores.....	67
6.2.5	Produção de sakacina.....	68
6.2.6	Determinação da eficácia de bacteriocinas sobre os contaminantes de cerveja e determinação de MIC (concentração mínima inibitória).....	69
6.2.7	Determinação da atividade residual de nisina e lisozima.....	70
6.2.8	Tratamento por ultra alta pressão dinâmica.....	70
6.2.9	Tratamento combinado por alta pressão e lisozima.....	71
6.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	72
6.4	CONCLUSÃO.....	81
6.5	BIBLIOGRAFIA.....	83
CAPÍTULO 7 - ESTUDO DOS EFEITOS DO TRATAMENTO POR ALTA PRESSÃO DINÂMICA SOBRE A QUALIDADE DA CERVEJA – COR, TURBIDEZ E POTENCIAL DE ÓXIDO REDUÇÃO.....		88
7.1	INTRODUÇÃO.....	88
7.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	90

7.2.1	Matéria Prima	90
7.2.2	Tratamento por ultra alta pressão dinâmica	90
7.2.3	Efeito da pressão de tratamento sobre a cor e turbidez da cerveja.....	90
7.2.4	Análise da qualidade de cerveja durante a vida útil	91
7.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	91
7.3.1	Efeito da pressão de tratamento sobre a cor e turbidez da cerveja.....	91
7.3.2	Análise da qualidade de cerveja durante a vida útil do produto.....	95
7.4	CONCLUSÃO.....	96
7.5	BIBLIOGRAFIA	97
	CAPÍTULO 8 - CONCLUSÕES GERAIS.....	100
	CAPÍTULO 9 - BIBLIOGRAFIA.....	104
	ANEXOS.....	119

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.1 – Resultados de número de reduções decimais (NRD) de tratamento de <i>L. delbruecki</i> por alta pressão dinâmica.	28
Table 5.1 - Values of μ_{21h}	55
Table 5.2 - Average values and significance (p) for the Tuckey mean test for μ_{21h}	55
Tabela 6.1 – Meio de produção de sakacina (LISERE <i>et al.</i> , 2002)	68
Tabela 6.2 – Concentrações inibitórias mínimas de bioprotetores sobre suspensões de microrganismos contaminantes de cervejas.	72
Tabela 6.3 – Atividade antimicrobiana de lisozima tratada por alta pressão dinâmica sobre a duração da fase lag (λ) de culturas de <i>L. brevis</i>	78

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 – Perfil de velocidades a diferentes pressões de homogeneização na fenda da válvula (FLOURY <i>et al.</i> , 2004).....	10
Figura 2.2 – Representação da molécula de nisina (BOWER <i>et al.</i> , 2001).....	14
Figura 3.1 – Número de reduções decimais de bactérias em função da pressão de tratamento por ultra alta pressão dinâmica.	24
Figura 3.2 - Número de reduções decimais de leveduras selvagens em função da pressão de tratamento por ultra alta pressão dinâmica.	26
Figura 3.3 - Número de reduções decimais de <i>L. delbruecki</i> em função da pressão de tratamento aplicada e curva da função adaptada.	29
Figura 4.1 – Destruição por alta pressão dinâmica a 150 MPa de <i>L. delbruecki</i> em cerveja em função da temperatura de entrada da válvula de homogeneização.	39
Figura 4.2 – Temperaturas no processamento por alta pressão (150 MPa) em função das temperaturas de entrada. As posições da legenda referem-se: A - Temperatura de entrada no sistema; B – Temperatura de entrada (após compressão adiabática e imediatamente antes da válvula de homogeneização); C – Temperatura após a válvula de homogeneização; D – Temperatura após o trocador de calor (água a 25oC).	40
Figura 4.3 – Número de reduções decimais (NRD) de <i>L. delbruecki</i> por tratamento por alta pressão dinâmica (150 e 170 MPa) em função da concentração de CO ₂ em cerveja.	41
Figure 5.1 - Time (h) necessary to obtain a <i>L. brevis</i> count of 10 ⁷ CFU.mL ⁻¹ versus lysozyme concentration.....	51

Figure 5.2 – Antimicrobial effect of 100 mg.L ⁻¹ of lysozyme on a <i>L. brevis</i> cell suspension.	52
Figure 5.3 - Muramidase activity of lysozyme after high pressure treatment.....	54
Figure 5.4 - <i>L. brevis</i> reduction curves caused by dynamic high pressure (DHP) treatment – values at 200 MPa and over are total destruction of the populations and deviation bars taking to account the initial loads.	56
Figure 5.5 - Hurdle Test: combination of lysozyme pre-treatment and dynamic ultra high pressure treatment against <i>L. brevis</i> in a pH 6.0 buffer system.....	58
Figura 6.1 – Efeito do tratamento por alta pressão dinâmica sobre a atividade de nisina em cerveja.	76
Figura 6.2 - Atividade de muramidase de lisozima tratada a alta pressão dinâmica em cerveja.....	77
Figura 6.4 – Contagem de UFC.mL ⁻¹ de <i>Lactobacillus brevis</i> em cerveja pilsen submetida ao tratamento com 100 mg.L ⁻¹ de lisozima combinado com ultra alta pressão dinâmica a 100 e 140 MPa.	80
Figura 7.1 – Turbidez permanente de chopp tratado por ultra alta pressão dinâmica nas temperaturas de entrada de 6 e 25°C.	92
Figura 7.2 – Turbidez (padrão Hunterlab) em função da pressão de tratamento por ultra alta pressão dinâmica de chopp tipo pilsen.....	93
Figura 7.3 – Cor padrão Cie L*a*b* de chopp tipo pilsen tratado por ultra alta pressão dinâmica.	94

Resumo

A utilização de métodos inovadores de estabilização microbiológica em alimentos como alternativa ao método térmico tem se mostrado promissora para a obtenção do melhor compromisso entre segurança e qualidade. Alta pressão dinâmica e bioproteção são tecnologias inovadoras: alta pressão dinâmica (APD) ou homogeneização por ultra alta pressão (HUAP) utiliza-se de sistemas de compressão de fluido a pressões superiores a 100MPa, para então forçar o fluido através de uma estreita fenda causando brusca aceleração e forças de cisalhamento resultando na ruptura de células de microrganismos; bioproteção, por sua vez, consiste no emprego de substâncias naturais ou produzidas a partir de fontes alimentícias com atividade antimicrobiana para a estabilização microbiológica de alimentos e processos.

Concentrações inibitórias mínimas (MIC) de nisina, lisozima, extrato de lúpulo e sakacina foram medidas contra *Lactobacillus brevis* e *delbruecki*, *Acetobacter aceti*, *Pediococcus sp.* e duas cepas de leveduras selvagens. Nisina foi capaz de inibir o crescimento de *Pediococcus sp* (2,0 mg.L⁻¹), *L. brevis* (3,0 mg.L⁻¹) e *L. delbruecki* (0,8 mg.L⁻¹), no entanto, o *A. aceti* não foi inibido até concentrações de 0,2 g.L⁻¹. Lisozima inibiu *L. delbruecki* (1,0 mg.L⁻¹) e exibiu uma inibição transitória sobre *L. brevis* (50 mg.L⁻¹).

Alta pressão dinâmica foi empregada sobre os mesmos microrganismos a pressões de 60, 100, 150, 250 MPa em cerveja (pH 4,5; 2,5°P; 4,7°GL). O valor de D_p, taxa de redução logarítmica do microrganismo mais resistente foi calculada. Um experimento de múltiplas passagens foi realizado a pressões subletais até 3 passagens pelo sistema.

Todas as linhagens foram inativadas a pressões de até 250 MPa, mesmo em contagens iniciais altas da ordem de (10⁶UFC/mL). *L. delbruecki* foi a linhagem mais resistente com um D_p de 38,9 MPa. No ensaio de múltiplas passagens pelo sistema foi observado que o efeito de tratamentos consecutivos resultou em um

efeito aditivo, não tendo sido observado sinergismo ou antagonismo por seleção de bactérias resistentes.

Foi avaliado o efeito da temperatura de entrada (6, 10, 20, 23, 30, 44, 50°C) e concentração de CO₂ na cerveja (0; 0,5; 1,0 e 2,0 volumes a 25°C) na destruição de *L. delbruecki*, a 150 e 170 MPa. A temperatura de entrada causou um efeito positivo sobre a destruição e 3 ciclos logarítmicos de diferença no número de reduções decimais foi observado entre 6 e 50°C. Por sua vez, a concentração de CO₂ causou um efeito negativo sobre a destruição.

Lactobacillus brevis, um dos microrganismos mais resistentes ao tratamento de cerveja por alta pressão, foi utilizado nos estudos de efeito combinado entre alta pressão dinâmica e bioproteção, uma vez que *L. delbruecki* apresentou alta sensibilidade aos antimicrobianos. A inibição pela lisozima foi transitória e a adição de 50 mg.L⁻¹ foi capaz de reduzir um ciclo logarítmico da contagem após duas horas de contato. O tratamento por alta pressão dinâmica da suspensão de *L. brevis* resultou em uma redução de sete ciclos logarítmicos a 200 MPa. Lisozima mostrou-se resistente ao processo APD, não perdendo atividade enzimática ou antimicrobiana até a pressão de 200 MPa. Um tratamento combinado utilizando 50 mg.L⁻¹ e APD (150 a 170 MPa) resultou em uma redução de 6 ciclos logarítmicos estabilizando a contagem após o tratamento por uma semana em tampão fosfato, a temperatura ambiente (25°C).

L. brevis foi inoculado a seguir em cerveja a uma concentração de 10⁶ UFC/mL, em presença de 100mg.L⁻¹ de lisozima e reservado por uma hora. A suspensão foi dividida em alíquotas e cada uma tratada por alta pressão dinâmica a 100 e 140 MPa. A contagem de viáveis em cada uma das etapas mostrou que a lisozima promoveu uma destruição de um ciclo seguida de um e quatro ciclos logarítmicos devido ao tratamento por alta pressão a 100 e 140 MPa, respectivamente. Uma completa redução da carga inicial foi observada ao final de 10 dias a temperatura ambiente em cerveja nas amostras tratadas por pressão.

Nisina por si só provou ser um bioprotetor eficaz no controle de *Lactobacillus* em cerveja, e mostrou-se resistente ao processo de alta pressão.

O efeito do processo de alta pressão dinâmica sobre a qualidade da cerveja foi avaliado. Cerveja tipo pilsen, não filtrada e não estabilizada físico-quimicamente foi submetida ao tratamento por alta pressão entre 100 e 300 MPa. Foi medida a cor e turbidez segundo os padrões Cie L*a*b* e ASBC/Hunterlab. Foi realizado um teste de vida útil por 100 dias após tratamento de cerveja a 250 MPa, medindo-se o potencial óxido redutor, a turbidez e cor (ASBC), periodicamente (aproximadamente mês a mês).

Os resultados mostraram que o processo foi efetivo na retenção da cor mas a turbidez foi aumentada em 5 vezes em tratamentos a pressão de 300 MPa. Também o teste de vida útil resultou em boa retenção da cor durante o período e do potencial de óxido redução, mas a turbidez aumentou a 140 FTU (Formazin Turbidity Units) em um mês e um precipitado foi formado.

Alta pressão dinâmica provou ser um método eficiente na estabilização microbiológica de cervejas, e pode ser eficientemente associada a outros métodos de controle como a bioproteção. Se por um lado microrganismos Gram negativos foram resistentes aos bioprotetores utilizados, esses se mostraram mais susceptíveis ao tratamento por alta pressão tornando os métodos combinados complementares.

Novos trabalhos devem ser realizados com cerveja filtrada e estabilizada físico-quimicamente, para se avaliar se a redução de pressão devido à combinação de tratamentos resultaria em produtos com boa qualidade, principalmente no que se refere à turbidez.

Summary

The use of novel microbial stabilization techniques as alternatives to thermal treatments are promising solutions for a compromise between quality and safety. As such, dynamic high pressure and biopreservation are novel techniques: dynamic high pressure (DHP or ultra high pressure homogenization (UHPH) is a technology that uses fluid compression to reach pressures higher than 100 MPa in order to accelerate the passage of the fluid through a narrow gap, causing shear and stress to the microorganism cell structure and resulting in cell disruption; biopreservation consists in the employment of naturally occurring or biologically produced substances with antimicrobial activity in order to impart microbiological stability to a food product or food manufacturing process. This work aimed to evaluate the use of dynamic high pressure treatment and biopreservation to achieve microbial stability in lager beer.

Minimum inhibitory concentrations (MIC) of nisin, lysozyme, hop aroma extract and sakacin were measured against two wild yeast strains from a brewery. Nisin was able to inhibit the growth of *Pediococcus sp* (2.0 mg.L⁻¹), *L. brevis* (3.0 mg.L⁻¹) and *L. delbruecki* (0.8 mg.L⁻¹), although the wild yeasts and *A. aceti* were not inhibited up to 0.2 g.L⁻¹. Lysozyme inhibited *L. delbruecki* (1.0 mg.L⁻¹) and showed a transitory inhibition of *L. brevis* (50 mg.L⁻¹). None of the biopreservatives inhibited the wild yeasts.

High dynamic pressure was applied to the same strains at 60, 150, 100, 250 MPa in beer (pH 4.5, 2.5°P, 4.7°GL). The logarithmic number of reductions rate (Dp) was calculated. A multiple pass experiment was performed at sublethal pressures for up to 3 passes for the most resistant strain.

All strains were totally inactivated at pressures of up to 250 MPa even at high initial counts (10⁶CFU/mL). *L. delbruecki* was the most resistant strain. The Dp was 38.9 MPa. The multiple pass assays showed an additive effect, synergism or the selection of resistant bacteria not being observed.

The effect of the inlet temperature (6, 10, 20, 23, 30, 44, 50°C) and CO₂ content in beer (0, 0.5, 1.0 and 2.0 volumes at 25°C) on the destruction of *Lactobacillus delbruecki* by dynamic high pressure at 150 MPa and 170 MPa was evaluated: the inlet temperature showed a significant positive effect on the destruction of the strain and a 3 log destruction difference was observed between 6 and 50°C. The increase in concentration of CO₂ showed a negative effect on the destruction.

Lactobacillus brevis was used in the combination of high pressure and lysozyme assay, because it showed higher resistance to antimicrobials than *L. delbruecki*, and was the second microorganism in resistance to the high pressure treatment. The inhibition by lysozyme was transitory. Lysozyme alone, added at 50 mg.L⁻¹ to the suspension, caused a reduction of 1 logarithmic cycle after two hours of contact.

The DHP treatment against *L. brevis* resulted in a reduction of 7 log cycles at 200 MPa. Lysozyme was resistant to DHP, with no loss of muramidase activity until 200 MPa or significant loss of antimicrobial power.

A combined treatment was applied using 50 mg.L⁻¹ of lysozyme and a pressure between 150 and 170 Mpa. The somatic effect showed a reduction of about 6 logarithmic cycles and the *L. brevis* count remained stable after the pressure treatment for a week with the samples stored at room temperature (25°C).

L. brevis was inoculated into beer (10⁶ CFU.mL⁻¹), containing 100 mg.L⁻¹ of lysozyme, left for one hour and then treated by dynamic high pressure at 100 or 140 MPa. Samples were taken for survivor enumeration.

Lysozyme promoted a destruction of one log cycle in *L. brevis* after one hour of contact and the subsequent DHP treatment reduced a further one log cycle and 4 log cycles at 100 and 140 MPa, respectively. The treated samples showed complete reduction of the initial load of microorganisms after 10 days of storage.

Nisin alone proved to be useful in the control of *Lactobacilli* in beer, and was shown to be resistant to the high pressure treatment.

The effect of the dynamic high pressure treatment was evaluated in the quality parameters of turbidity, colour and redox potential of Lager beer.

Lager beer, unfiltered and not physico-chemically stabilized, was treated by dynamic high pressure from 100 to 300 MPa at 25°C. The colour and permanent turbidity were measured using the Ciel*a*b* and ASBC/Hunterlab standards. The redox potential was determined by the indicator time test method for the 250 MPa treatments. Samples treated at 250 MPa were stored under ambient conditions for 100 days and the turbidity (ASBC), colour (ASBC) and redox potential value measured periodically.

The results showed that the process was effective in retaining the beer colour, although higher pressures (>200MPa) caused the turbidity to increase up to five fold (300 MPa). The storage results showed good colour stability and redox potential evolution, however the turbidity increased to 140 FTU in one month, and a precipitate formed.

DHP proved itself to be an effective method for microbial stabilization of beer, and can be effectively associated with other control methods, such as biopreservatives. Gram negative strains and wild yeasts although resistant to biopreservatives, were clearly sensitive to pressure treatment. Further work should be performed with filtered beer to evaluate if a reduction in the pressure due to the combined use of treatments would improve the quality with respect to turbidity, which was negatively affected by the dynamic high pressure treatment, and shown to be a major drawback.

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

Os volumes de produção de cerveja no país têm crescido ano a ano em uma nítida recuperação do mercado a partir de 2000, com produção de cerca de 90 bilhões de litros para o ano de 2002. O consumo *per capita* é de 50 L/ano e o potencial de crescimento do mercado é estimado para um consumo de 65 L/ano *per capita* no país.

O tempo de prateleira de cervejas é limitado não pela sua estabilidade microbiológica, mas pela estabilidade físico-química e sensorial, graças à tecnologia empregada em cervejarias e às características inerentes das cervejas. Assim, processos de estabilização microbiológica que minimizem as alterações de qualidade sensorial e físico-química podem ser desenvolvidos para a indústria cervejeira com grande potencial de aplicação.

A combinação de técnicas de estabilização microbiológica é uma alternativa de aplicação crescente na produção de alimentos e baseia-se na teoria de barreiras múltiplas, com a vantagem de minimizar perdas nutricionais e de qualidade no alimento mantendo sua segurança e a vida de prateleira. O processo de ultra-alta pressão vem sendo cada vez mais estudado para a estabilização microbiológica de alimentos. Equipamentos de alta pressão têm sido desenvolvidos para atender a indústria de alimentos do ponto de vista da capacidade produtiva, custos de produção e segurança, e gradativamente esta tecnologia vem se estabelecendo principalmente no Japão (KNORR, 1993; ZIMMERMAN, 1993).

Bioprotetores são substâncias extraídas ou produzidas de alimentos, com atividade antimicrobiana, capazes de aumentar a vida de prateleira de produtos, ou assegurar processos contra contaminações microbiológicas. As bacteriocinas, classe de antimicrobianos produzidos por bactérias são de origem protéica e têm sido utilizadas para a bioproteção de alimentos. Seu uso tem se mostrado vantajoso para o controle de microrganismos contaminantes em combinação com

outros processos, como processos térmicos brandos (KIM, 1993; YAMAZAKI *et al.*, 2000), campo de pulso elétrico (DUTREUX, 2000), e outros tipos de bioprotetores (PERIAGO, 2001; CHUNG, 2000). A aplicação de tecnologia de múltiplas barreiras, utilizando-se conjuntamente bioprotetores e processamento por alta pressão, pode minimizar a perda de qualidade da cerveja no processo de estabilização microbiológica.

1.1 OBJETIVO GERAL:

Aplicar a tecnologia de múltiplas barreiras, combinando as bacteriocinas nisina e sakacina, o bioprotetor lisozima e processamento por ultra-alta pressão dinâmica para a estabilização microbiológica de cerveja.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Determinar o microrganismo alvo dentre os contaminantes da cerveja para o processo de homogeneização a ultra-alta pressão.
- Estudar a destruição do microrganismo alvo por alta pressão dinâmica.
- Determinar o efeito de variáveis: pressão, número de passagens pelo sistema, teor de dióxido de carbono da cerveja e temperatura de entrada na destruição do microrganismo alvo.
- Selecionar bioprotetores eficazes para estabilização microbiológica de cerveja.
- Determinar, utilizando microrganismos selecionados anteriormente como relevantes para os processos do ponto de vista da resistência apresentada, os efeitos dos tratamentos combinados de bioprotetores previamente selecionados pela sua eficácia.
- Avaliar a qualidade físico-química da cerveja processada por alta pressão dinâmica nas condições de eficiência de destruição microbiológica.

CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CONTAMINAÇÃO MICROBIOLÓGICA DA CERVEJA

Devido às características de composição, a destacar o teor de álcool, baixos teores de açúcares simples, presença de compostos de lúpulo e baixo pH, poucos microrganismos são capazes de se desenvolver na cerveja. Patogênicos e esporulados não são capazes de crescer ou produzir toxinas, ou sequer sobreviver em períodos prolongados neste meio.

Assim, o problema microbiológico da cervejaria refere-se a alguns microrganismos geralmente deteriorantes: *Lactobacillus* produzem acidez láctica, gomas e aromas indesejáveis (produção de diacetil pelo *L. diacetylactis*, por exemplo), *Pediococcus*, formam ácido láctico a partir de glicose, bactérias acéticas são capazes de oxidar o etanol produzindo ácido acético, aromas indesejáveis e “rope” (filamentos de polissacarídeos). *Acetobacter*, *Acetomonas*, *Enterobacteriaceae* produzem aromas adocicados; *Klebsiella* e *Pectinatus* promovem turvação e formação de ácido acético, propiônico e H₂S; *Zymomonas* formam acetaldeído e H₂S; leveduras selvagens, que são microrganismos dos gêneros *Saccharomyces*, *Torulopsis*, *Pichia*, *Candida*, *Hansenula* e *Rhodotorula* promovem turbidez e aromas indesejáveis de mofo (ASSCHE, 1992; BRIGGS *et al.*, 1981).

Lactobacillus brevis foi descrito por HOLLEROVA e KIBIZNIAKOVA (2001), como uma bactéria comum na deterioração, especialmente cervejas e vinhos, causando aromas indesejáveis e turbidez (PRIENST e CAMPBELL, 1999).

Alguns microrganismos contaminantes têm sido identificados como importantes deteriorantes de cerveja, como *Megasphaera cerevisiae* presente em

cervejas de baixo teor de álcool, *Pectinatus cerevisiiphilus*, *Pectinatus frisingensis*, *Selenomonas lactificifex* (JESPERSEN, 1996; SATOKARI, 1998).

2.2 ESTABILIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE CERVEJA

Os tratamentos térmicos na cerveja são desenhados segundo parâmetros de destruição térmica dos microrganismos contaminantes (bactérias lácticas e leveduras selvagens) e enzimas indicadoras (invertase e melibiase). Define-se UP, unidade de pasteurização, um tratamento térmico equivalente ao de 60°C por um minuto. O cálculo do número de UP aplicado sobre a cerveja é realizado pela história térmica do processo, medindo-se as letalidades ao longo do tempo, considerando-se $z = 7^\circ\text{C}$; o tratamento $F_{60^\circ\text{C}}$ é dado pela letalidade acumulada no decorrer do tempo de processo (t).

$$L = 10^{\frac{(T-T_{ref})}{z}}$$
$$F_{60^\circ\text{C}}^{7^\circ\text{C}} = \int_0^t L \cdot dt$$

Onde L é a letalidade, T a temperatura no ponto de medição, T_{ref} equivale a 60°C, e z é o coeficiente térmico, que para os infectantes da cerveja equivale a 7°C.

ZUFALL e WACKERBAUER (2000) realizou medidas dos parâmetros cinéticos de destruição térmica em cerveja turva, para os microrganismos contaminantes de cervejarias: *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Pediococcus damnosus* e *Lactobacillus brevis*. *Pediococcus damnosus* foi o mais resistente a 60°C ($D_{60} = 2,07$ minutos) e o valor de z foi de 6,911°C entre 60 e 72°C e 6,791°C entre 72 e 84°C. Assim, o processo de pasteurização “flash” (tratamento térmico em trocador de calor a placas) a temperaturas mais altas e tempos reduzidos, benéficos para a qualidade de cerveja e estabilidade de aroma, pode ser conduzido com segurança levando-se em conta as variações de z em faixas mais altas de temperatura.

2.3 TRATAMENTO TÉRMICO E QUALIDADE DE CERVEJA

WACKERBAUER e ZUFALL (1998) pasteurizaram amostras de cerveja em equipamento flash, promovendo tratamentos de 15, 80 e 500 UP, em temperaturas entre 50 e 90°C, e analisaram os efeitos sobre a qualidade sensorial da mesma, relacionando com análises cromatográficas de aldeídos (cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa) e luminescência química. Uma forte influência do tempo de retenção na pasteurização sobre os teores de aldeídos foi constatada, assim como na luminescência química. Não foram descritos pela análise sensorial os aromas de pão e de pão torrado, associados à pasteurização, mas foram detectados aromas de papel, papelão relativos aos aldeídos de cadeias longas. Tempos de retenção pequenos e temperaturas altas foram preferidos na análise sensorial a longas retenções a baixas temperaturas indicando que o número de UP simplesmente não é um bom indicador para a qualidade sensorial da cerveja. Também foram realizadas análises após oito semanas de estocagem revelando que as amostras pasteurizadas a maiores UPs foram mais sensíveis ao envelhecimento.

Os métodos de filtração por membranas (porosidade de 0,45 µm) e pasteurização (72°C por 0,5 minuto ou 27 unidades de pasteurização) foram comparados para a qualidade da cerveja resultante. As mudanças de qualidade após o tratamento foram pequenas segundo a análise sensorial, de turbidez e estabilidade de espuma. No decorrer do tempo de estocagem foi observado aumento da turbidez reversível na amostra pasteurizada e perda da estabilidade de espuma da amostra microfiltrada (HAERNULV e LARSSON, 1992).

FURUSHU *et al.* (1998) utilizaram a técnica de análise sensorial descritiva para levantar atributos sensoriais de cervejas em diferentes etapas de envelhecimento e observaram que atributos como aroma a papelão, a couro e amargor evoluíram com o envelhecimento das cervejas. Em particular, o aroma a papelão teve grande aumento nos primeiros meses e declínio no decorrer da

estocagem. O t-2-nonenal e outros compostos de carbonila são comumente associados ao desenvolvimento deste tipo de perfil aromático.

HAERNULV e LARSSON (1992) compararam processos térmicos e não térmicos de estabilização microbiológica de cerveja utilizando os seguintes parâmetros: análises sensoriais (teste triangular), turbidez reversível e permanente, estabilidade de espuma, além de caracterização da cerveja (extrato primitivo, extrato real, teor alcoólico, pH, cor EBC, oxigênio dissolvido e amargor-BU). Foi observado que o teor alcoólico não influenciou significativamente a qualidade da cerveja, ao passo que o teor de oxigênio inicial foi importante para a deterioração da qualidade sensorial das amostras.

2.4 PROCESSAMENTO POR ULTRA-ALTA PRESSÃO (UAP)

CASTELLARI *et al.* (2000) utilizaram alta pressão hidrostática (600 MPa, 5 minutos) para estabilizar microbiologicamente amostras de cerveja. O tratamento promoveu a redução de quatro ciclos logarítmicos de bolores e leveduras e também das bactérias lácticas estabilizando o produto durante a vida de prateleira de 49 dias. Não foram observadas alterações significativas na qualidade da cerveja após o processamento, que reteve seus parâmetros de qualidade como o amargor (de 11,6 para 11,7 B.U.) ou cor.

KNORR (1993) utilizou alta pressão isostática (15 minutos a 400 MPa) para processamento de batatas em cubos e obteve redução de contagens microbianas da ordem de 4 ciclos logarítmicos. O tratamento por alta pressão tem por característica a manutenção das ligações covalentes, agindo apenas na ruptura de interações o que preserva a qualidade do alimento processado.

A combinação entre UAP a 6.000 atm (607,95 MPa) por 20 a 60 minutos e temperatura moderada (60°C) mostrou ser eficaz na inativação de *Bacillus liquiniformis*, e a 6000 atm por 5 minutos; a temperatura de 70°C, promoveu uma redução de seis ciclos logarítmicos em *Bacillus stearothermophilus* (SANGRONIS *et al.*, 1997).

SHEARER *et al.* (2000) utilizou a tecnologia de barreiras múltiplas, combinando lauricidina e outros compostos com ação antimicrobiana com tratamento térmico brando (45°C por 10 a 15 min) e alta pressão (392 MPa) para reduzir de 3 a 5,5 ciclos logarítmicos de UFC/mL de *Bacillus subtilis* em leite, *Bacillus cereus* em carnes, *Bacillus coagulans* em suco de tomate e *Alicyclobacillus sp.* em suco de maçã.

FISCHER *et al.*(2000) utilizou alta pressão para tratar cerveja durante diferentes estágios de produção e verificou a possibilidade de utilizar a técnica para estabilização microbiológica e coloidal, isomerização de α -ácidos, e melhora de filtrabilidade da cerveja para valores próximos aos da água pura, pela ação da alta pressão sobre os β -glucanos e seus géis, utilizando 300 e 500 MPa por 5 minutos.

A cinética de inativação de *Saccharomyces cerevisiae* foi estudada por HASHIZUME *et al.* (1995) em pressões de 120 a 300 MPa e temperaturas entre – 20 e 50°C. Foi observado que em temperaturas baixas, particularmente abaixo dos 0°C, houve maior inativação do microrganismo pela alta pressão isostática que em altas temperaturas, o que favorece a retenção da qualidade dos alimentos.

Um parâmetro de qualidade importante no processamento de cerveja é o escurecimento resultante da reação de Maillard: TAMAOKA *et al.*, (1991) utilizou alta pressão para estudar seus efeitos neste mecanismo químico. Aplicando 50 a 500 MPa a 50°C na fase da reação de condensação de aminas com carbonilas, não foram observadas diferenças significativas nas reações. Pressões de 50 a 200 MPa foram suficientes para suprimir as reações de escurecimento, a um volume de ativação de 13 a 27 mL/mol. A ionização e formação de ligações foram favorecidas pela compressão e volumes de ativação ΔV negativos, ao passo que neutralização e quebra de ligações são favorecidas por ΔV positivos.

2.5 TRATAMENTO POR ALTA PRESSÃO DINÂMICA

O termo tratamento por alta pressão dinâmica refere-se ao processo de homogeneização por ultra-alta pressão e difere mecanisticamente do sistema de alta pressão hidrostática (FANTIN *et al.* 1996; WUYTACK *et al.*, 2002). Na homogeneização por ultra alta pressão um fluido é forçado através de um orifício de dimensões muito reduzidas (da ordem de micrometros) e ajustáveis a pressões e velocidades altíssimas, superiores a 100 MPa e 200 m/s respectivamente, resultando em efeitos físicos sobre o fluido de origem reológica, tais como cavitação, fricção, cisalhamento e turbulência (LACROIX *et al.*, 2005).

Estes efeitos físicos que agem sobre os fluidos submetidos à homogeneização ou processo de alta pressão dinâmica, foram utilizados para gerar ruptura de células e conseqüente redução de contagens de microrganismos presentes no meio. Um dos estudos relacionando a ruptura celular aos efeitos físicos mencionados, foi o trabalho apresentado por BROOKMAN (1974), que atribuiu à magnitude da queda de pressão a extensão da ruptura celular e observou que a turbulência não afetou a ruptura, sendo que mesmo em condições de escoamento laminar, em que a velocidade máxima é atingida somente no centro do perfil de escoamento, pôde-se obter 100% de ruptura a pressão de 25.000 psi (172,37 MPa).

Segundo DIELS *et al.* (2004), que estudou o efeito da temperatura de entrada na destruição de *Escherichia coli*, a temperatura exerce uma importante ação sobre as taxas de destruição do microrganismo: em temperaturas de saída do bloco de homogeneização não superiores aos 65°C, a ação do aumento da temperatura resulta em modificações de viscosidade nos fluidos causando mudanças em efeitos mecânicos envolvidos na destruição dos microrganismos, tais como cavitação e turbulência. Em temperaturas baixas, a cavitação é menor devido às menores pressões de vapor, mas na medida que a cavitação aumenta, efeitos mais drásticos ocorrem devido ao violento colapsamento dessa cavitação em baixas pressões de vapor. A turbulência aumenta com a temperatura,

resultado da diminuição da viscosidade, levando assim a uma maior cavitação e ambos a uma maior destruição microbiológica.

Em um sistema de homogeneização por alta pressão (até 50 MPa), KLENIG *et al.* (1996, 1998) investigou o comportamento de fluidos forçados através de válvulas de homogeneização e os efeitos resultantes sobre leveduras, utilizando modelagem matemática. Em seu estudo, concentrando-se na região da fenda da válvula, atribuiu ao gradiente de pressões, e ao curto espaço em que este gradiente ocorria, uma grande variação das acelerações deste fluido. Excluiu de seu trabalho as possibilidades de ruptura celular por impactos, cavitação e deformação devido à possibilidade das células serem menores em diâmetro que a fenda da válvula (devido às pressões baixas do experimento). Modelando uma célula de levedura, estrutura membranosa, esférica indeformável, atribuiu à tensão sofrida na superfície da levedura a ruptura celular.

Em trabalho semelhante FLOURY *et al.*, (2004) modelou o comportamento dinâmico de um fluido em um sistema de homogeneização ultra-alta pressão (até 340 MPa) marca Stansted Fluid Power Ltd. (Essex, Reino Unido), determinando as velocidades desenvolvidas devido ao gradiente de pressão na válvula de homogeneização. Para tanto a autora definiu o regime de escoamento através da avaliação do número de Reynolds obtendo na fenda valores menores que 550. Definido o regime laminar a autora utilizou-se das equações de perda de carga (FLOURY *et al.*, 2004 *apud* NAKAYAMA, 1964 e FLOURY *et al.*, 2004 *apud* PHIPPS, 1975) para determinar a altura da fenda, obtendo cerca de 2 μm a pressão de 350 MPa (dados para a água a 20°C). Por fim, utilizando um método computacional de modelagem (Fluent, 1998) determinou a velocidade máxima na válvula de homogeneização, especificamente na fenda em que ocorre a formação do gradiente de despressurização, obtendo o valor de 200 $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ a 340 MPa. A Figura 2.1 mostra o perfil de velocidades em função da pressão de homogenização:

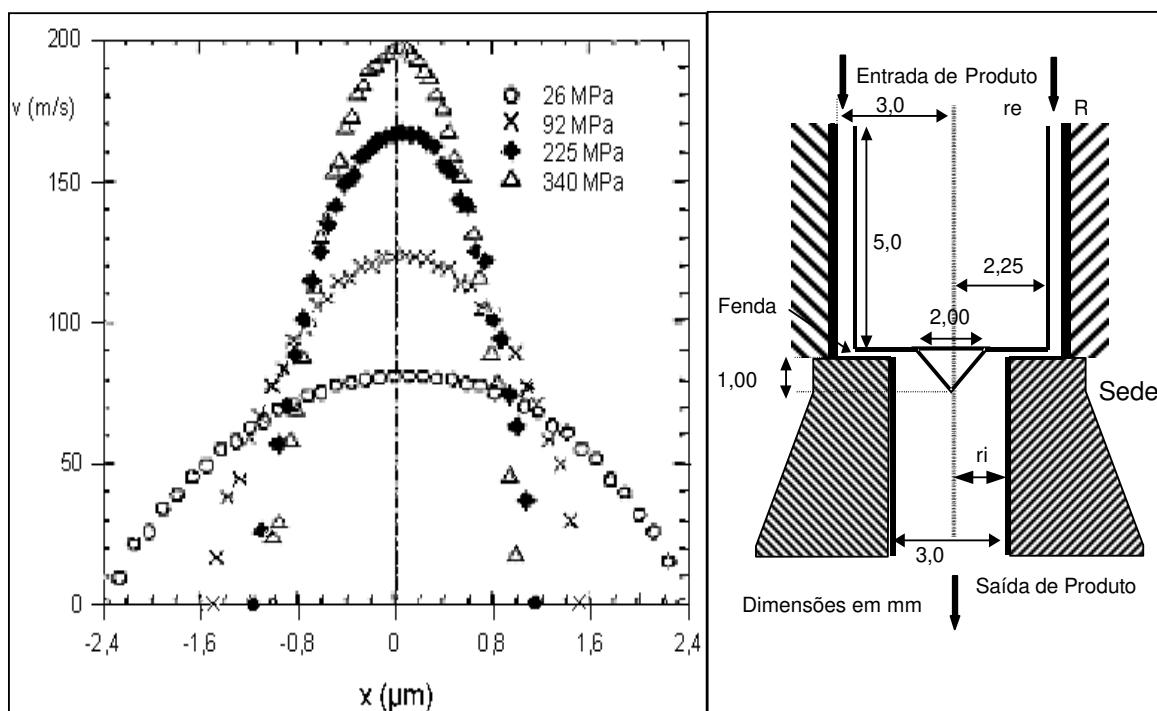


Figura 2.1 – Perfil de velocidades a diferentes pressões de homogeneização na fenda da válvula (FLOURY *et al.*, 2004).

Assim, microrganismos submetidos a alta pressão dinâmica são submetidos a um alto cisalhamento, pois se encontram em um meio em que o escoamento tem enormes variações de velocidades associado a mecanismos de choque mecânico e cavitação (TAHIRI *et al.*, 2005). O autor aplicou o tratamento por alta pressão dinâmica para a inativação de microrganismos em solução salina e suco de laranja obtendo a redução de 5 ciclos logarítmicos de *E. coli* O157:H7 a 200 MPa após 3 passagens. O autor observou uma dependência entre a carga inicial de microrganismos e a destruição, inoculando e tratando contagens entre 10^4 e 10^9 UFC/mL; para a cepa testada de *E. coli* a carga máxima possível para a destruição em uma passagem a 200 MPa foi de 6 ciclos logarítmicos. Também foi observado que bactérias Gram positivas foram mais resistentes que as Gram negativas.

CAMPOS (2004) utilizou um sistema de homogeneização por alta pressão para tratamento de suco de laranja e observou que as taxas de inativação a

pressões superiores a 250 MPa foram suficientes para destruir completamente cargas iniciais de $1,2 \times 10^7$ UFC/mL de *Lactobacillus plantarum*, e $2,9 \times 10^5$ UFC/mL de *Saccharomyces cerevisiae* e produzir inativação de pectinametilsterase a 67,6% da atividade inicial em pH 4,1 e a 300 MPa.

A aplicação de alta pressão dinâmica na estabilização microbiológica de leite para a fabricação de queijo tipo cheddar foi estudada por KHEADR *et al.* (2002), que obteve resultados significativamente iguais no tratamento (200 MPa) e na pasteurização convencional em queijos recém produzidos e após 3 meses de estocagem. O autor observou que a homogeneidade e qualidade da massa obtida no queijo elaborado com leite tratado por alta pressão foi superior devido a estabilização que o tratamento conferiu as proteínas e a formação de glóbulos de gordura extremamente pequenos.

O tratamento por homogeneização a 100 MPa foi capaz de reduzir 3 ciclos logarítmicos da população bacteriana de *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis* e 1 ciclo log de *Streptococcus lactis* segundo reportado por POPPER e KNORR (1990).

Pelo mesmo processo, LANCIOTTI *et al.*, (1994) obteve a 100 MPa, reduções de *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* e *Yarrowia lipolytica* de 2, 3 e 6 ciclos logarítmicos, respectivamente.

2.6 BIOPROTETORES

MONTVILLE e CHEN (1998) define biopreservação de alimentos como a utilização de bactérias lácticas (probióticos), seus metabólitos ou ambos para melhorar ou assegurar a qualidade e a segurança de alimentos que não são necessariamente fermentados.

Algumas substâncias extraídas de alimentos com propriedades antimicrobianas são consideradas bioprotetores, descritos pela literatura (LUCK e

JAGER, 1997). A lisozima de ovos e o extrato de aroma de lúpulo, utilizado na fabricação de cervejas, são exemplos dessa classe de substâncias bioprotetoras.

Os bioprotetores têm por característica positiva o fato de serem classificados como grau alimentício, já que derivam de processos de produção de alimentos; mas seu emprego deve ser racional de modo a agregar qualidade ao produto e não substituir importantes práticas de higiene e boas práticas de fabricação - BPF (HOLZAPFEL *et al.*, 1995).

2.6.1 Bacteriocinas

A susceptibilidade de 20 linhagens de bactérias contaminantes isoladas de cervejas (dentre as quais linhagens de *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus lactis*, *Pediococcus damnosus*) foi estudada a onze fatores de inibição produzidos por microrganismos, que foram caracterizados como bacteriocinas pela sua natureza protéica. Foram produzidos por bactérias lácticas isoladas de cevada malteada, caracterizados como linhagens de *Lactobacillus sakei*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Enterococcus faecalis*. A inibição foi observada para grande parte das linhagens de contaminantes em amplas faixas de pH (entre 2,0 e 10,0) (O'MAHONEY *et al.*, 2000)

As bacteriocinas plantaricina BN (utilizando *Lactobacillus plantarum*), pediocina A (*Pediococcus pentosaceus*) e bavaricina MN (*Lactobacillus bavaricus*) foram produzidas, com meios otimizados tanto em caldo como em meio sólido, obtendo-se melhores produções em meio sólido a pH 7,9 e 15°C para plantaricina BN, pH 6,5 e 30°C para bavaricina MN e pH 6,15 a 7,90 e 30°C para pediocina A. Foram utilizadas preparações brutas (não purificadas) destas bacteriocinas para a determinação das resistências ao tratamento térmico pela monitoração da atividade antibacteriana. Bavaricina perdeu totalmente a atividade quando submetida ao tratamento a 60°C por 15 minutos ou 100°C por 10 minutos, e pediocina e plantaricina exibiram atividades residuais após tratamentos de até 60 minutos a 60°C e 20 minutos a 100°C (LEWUS e MONTVI LLE, 1992).

Lactobacillus bavaricus, um microrganismo isolado de carnes, foi utilizado para bioproteção de produtos cárneos contra *Listeria monocytogenes*. Foi feita a inoculação do microrganismo bioprotetor que produziu a bacteriocina bavaricina inibindo o crescimento do patógeno. A bavaricina foi ativa para a bioproteção dos produtos mesmo em pH não ácidos (WINKOWSKY, 1993).

KAISER e MONTVILLE (1996) purificaram bavaricina obtida de *Lactobacillus bavaricus* (reclassificado como *L. sakei*) e avaliaram os mecanismos de ação da bacteriocina sobre *Listeria monocytogenes* Scott. Pela medição de extravasamento de carboxifluorescina de vesículas lipídicas derivadas do microrganismo em estudo obteve-se um modelo do mecanismo de ação, indicando dose-dependência e ação sobre permeabilidade de membranas (aumento em 85% na permeabilidade com a adição de 9,0 ppm de bavaricina).

Nisina é uma bacteriocina obtida por fermentação, na fase de crescimento exponencial, de *Lactococcus lactis*, não tóxica, termoestável, eficiente contra bactérias gram positivas, e quando associada ao EDTA, eficiente contra bactérias Gram negativas (CHAN *et al.*, 1996). É um polipeptídeo constituído de 34 aminoácidos com cinco ligações sulfidrílicas circulares formando os aminoácidos não protéicos: lantionina e beta metil lantionina. É uma molécula anfifílica formada por um terminal N e um terminal C de conformação helicoidal, unidos por uma região flexível que confere rotação à molécula: tal característica é importante para sua solubilidade e penetração em membranas fosfolipídicas. Segundo a cepa bacteriana que a produz, a nisina pode ser do tipo A ou Z, que diferem entre si do ponto de vista estrutural em apenas um aminoácido na posição 27 (His na nisina A e Asn na nisina Z). Algumas diferenças com relação à produção e a ação antimicrobiana foram reportadas. Em testes MIC a formação de halos maiores para a nisina Z em placas inoculadas com microrganismos indicadores é causada exclusivamente pela maior facilidade de difusão do tipo em agar (ABEE *et al.*, 1995).

A Figura 2.2 mostra a estrutura da seqüência dos resíduos dos aminoácidos da molécula da nisina e as pontes de sulfeto envolvidas nas formações dos aminoácidos cíclicos lantionina (Ala – S – Ala).

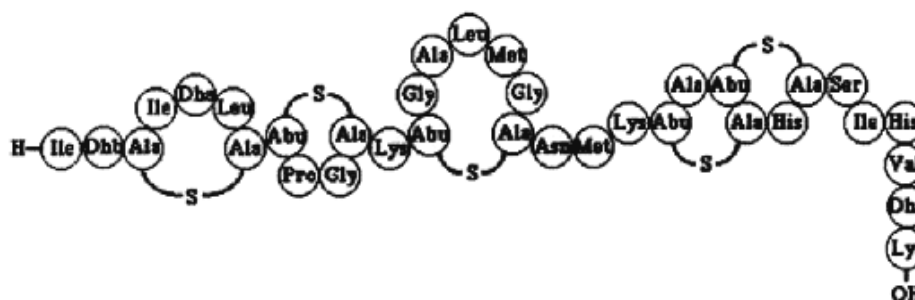


Figura 2.2 – Representação da molécula de nisina (BOWER *et al.*, 2001).

O espectro de ação da nisina é relativamente estreito sendo ativa contra bactérias Gram positivas, como bactérias lácticas, clostridium, bacilos, estreptococos e em combinação com quelantes contra algumas bactérias gram negativas, mas ineficaz contra fungos e leveduras (LÜCK e JAGER, 1997).

Sua aplicação em alimentos é permitida no Brasil e no exterior sendo o aditivo classificado como GRAS, sigla em inglês (*Generally recognized as safe*).

ZAPICO *et al.*(1998) adicionou 100 UI/mL de nisina a leite desnatado e integral inoculado a 10% de uma cultura de *Listeria innocua* e submeteu a homogeneização a 20 MPa. O autor observou que a população de *Listeria innocua* foi reduzida pela adição em 2,6 a 2,9 ciclos logarítmicos, enquanto que a inibição no leite integral chegou a 3,7 - 3,8 ciclos logarítmicos.

YAMAZAKI *et al.* (2000) utilizou nisina (50, 100 e 200 UI/mL) em conjunto com tratamento térmico (90°C) para o controle de esporos ativados de *Alicyclobacillus acidoterrestris* em bebidas ácidas de frutas de maçã e laranja. A redução de D entre a concentração de 200 UI/mL de nisina, equivalente a 5 ppm

de nisina ativa, e o controle foi de 71% e 76% para bebidas de maçã e laranja, respectivamente.

Sua aplicação na área biomédica foi descrita por BOWER (2001), onde o autor empregou solução de nisina a 1mg/mL por 1 minuto de tempo de contato para impregnar plásticos TEFLON® e PVC de cateteres e sondas de traqueotomia, e estudou a atividade antimicrobiana da nisina aderida ao material, observando que houve manutenção da atividade contra bactérias Gram positivas por mais de 4h nos cateteres e 2 h nas sondas.

BLACK *et al.* (2005) utilizaram tratamento combinado de alta pressão hidrostática (200 a 500MPa por 5 minutos a 20°C) e nisina (250 e 500 UI/mL) de leite desnatado para medir a inativação de *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Listeria innocua*, e *Lactobacillus viridescens*, e observaram que a combinação de tratamentos foi sinérgica uma vez que houve aumento da destruição com a adição da nisina no processo de 2,26±0,84 para 4,49±0,26 para *E. coli* a 200 MPa, 3,84±0,19 para 8,5 para *L. innocua*, 6,13±1,05 para 8,4 UFC/mL para *L. viridescens* e 1,15±0,38 para 5,04±0,21 para *P. fluorescens*. Os autores observaram ainda que o processo de alta pressão, seguido da adição de nisina nos níveis descritos anteriormente, causou sensibilização nos microrganismos Gram negativos resistentes ao antimicrobiano.

2.6.2 Extrato de lúpulo

O lúpulo, ingrediente da cerveja responsável pelo amargor e riqueza de aromas na bebida tem propriedades antimicrobianas descritas na prática cervejeira, cuja atividade confere bioproteção ao processo e ao produto final. Alguns dos compostos presentes no lúpulo são α -ácidos como humulona, iso- α -ácidos como trans-iso-humulona, ácido trans-humulínico e β -ácidos: colupulona (SAKAMOTO, 2002)

SIMPSON (1993) empregou compostos de lúpulo para determinar sua concentração mínima inibitória (MIC) e bactericida (MBC) em microrganismos

contaminantes de cerveja (*Lactobacillus brevis*). Foi constatado que os compostos de lúpulo apresentam MIC da ordem de micromoles e são essencialmente bacteriostáticos, já que houve crescimento no teste de MBC. Foi proposto pelo autor que o mecanismo de ação destes compostos seria de carreadores de íons, com afinidade aos metais realizando seu transporte pela membrana plasmática e desestabilizando os potenciais de membrana das células bacterianas. Os valores de MIC aumentam com a adição de íons de metais bivalentes e diminuem com o aumento de concentração de cátions monovalentes.

SMITH e SMITH (1993) adicionaram mosto recuperado de “trub quente” (material precipitado na fervura do mosto, composto de proteínas, complexos tanino-proteínas, resíduo do lúpulo exaurido dos α -ácidos, sais insolúveis e lipídeos) nas proporções de 1, 2, 5 e 5,7% a culturas de *Bacillus sp.* Tendo observado que: houve aumento em uma hora da fase lag com 1% de adição, redução de 98% na velocidade de crescimento da cultura com 2% de adição e inibição total a 5% de adição. Não foi observada ação esporicida ou inibição da germinação a baixas concentrações, porém em concentrações maiores ou iguais a 5% do efeito foi constatado.

Segundo HAMMOND, et al. (1999) realizaram ensaios para caracterizar a influência de compostos fenólicos e dióxido de carbono no crescimento de bactérias contaminantes de cervejas (*Lactobacillus sp.*). O dióxido de carbono não inibiu o crescimento bacteriano até níveis de 3 g/L (cerca de 1,5 volumes), enquanto que concentrações maiores, comumente encontradas no produto engarrafado, favorecem esta inibição. Também os compostos fenólicos apresentaram ação protetora da cerveja.

2.6.3 Lisozima

A atividade antimicrobiana da lisozima é associada a sua atividade enzimática de muramidase, que hidrolisa ligações glicosídicas entre o ácido N-acetilmurâmico e a N-acetilglucosamina dos glicopolissacarídeos (LÜCK e

JAGER, 1997). Segundo LOSSO *et al.* (2000) a lisozima promove a catálise que envolve os aminoácidos Asp 52 e Glu 35 de seu sítio ativo, sobre a ligação glicosídica devido às formas dissociada e protonada respectivamente, destes aminoácidos.

Lisozima de ovos parcialmente desnaturada apresenta uma alta atividade antibacteriana tanto contra bactérias Gram negativas e positivas, por um mecanismo de ruptura de membranas independente de sua atividade como muramidase. Íons divalentes como cálcio e magnésio tendem a estabilizar as paredes bacterianas, diminuindo significativamente a atividade da lisozima pois o mecanismo de ação da lisozima consiste na retirada de íons divalentes, pela inserção de seu grupo hidrofóbico exposto, da estrutura polissacarídica externa à membrana plasmática, desestabilizando-a e causando a lise celular (IBRAHIM *et al.*, 1997). MASSCHALK *et al.* (2001), IBRAHIM (2001) e DÜRING *et al.*, (1999) observaram igualmente que lisozima parcialmente desnaturada, cuja molécula sofrera parcial desdobramento de sua conformação espacial, não perdeu sua atividade contra bactérias Gram positivas e passou a exibir atividade contra bactérias Gram negativas. Os autores apresentaram uma dissociação entre a atividade antimicrobiana da lisozima e sua atividade enzimática.

A desnaturação protéica de lisozima pelo tratamento à 80°C por 20 minutos resultou em um aumento da atividade sobre bactérias Gram negativas, sem detrimento de sua atividade contra bactérias Gram positivas, obtendo-se reduções significativas em culturas de *E. coli*, *B. subtilis*, *B. cereus* e *S. aureus* tratadas com 200 mg.L⁻¹ de lisozima por 24 horas (IBRAHIM *et al.*, 1996).

Um estudo de inativação térmica de lisozima em tampão fosfato 0,1 M, pH 6,5, a 72°C revelou que o comportamento da cinética de destruição foi de primeira ordem e a constante de inativação medida foi 0,9 x 10⁻³ min⁻¹ sem agitação e 3,6 x 10⁻³ min⁻¹ sob agitação de 700 rpm (COLOMBIÉ *et al.*, 2001).

Segundo AKASAKA *et al.* (1997) altas pressões são capazes de produzir mudanças estruturais sobre a lisozima, no entanto o efeito deve ser mais investigado, pois SAIKUMAR *et al.* (1995) não observou qualquer perda de atividade até a pressão aplicada de 150 MPa.

A aplicação de lisozima já foi estudada em produtos como leite, queijo, cerveja (MAKKI e DURANCE, 1997), vegetais frescos, peixes, carnes (GILL e HOLLEY, 1999), obtendo-se resultados satisfatórios no controle de microorganismos patogênicos e deterioradores.

GILL e RICHARD (2000) aplicou a combinação de nisina e lisozima (1:3) para produtos cárneos em concentrações de 500 mg/kg e conseguiu prolongar a vida útil de maneira significativa para as contagens de patógenos e deteriorantes. Presunto inoculado com *B. thermosphacta* e *E. coli* O157:H7 não exibiu crescimento até a 4ª semana e para *S. typhimurium*, até a 3ª semana. Em embutidos tipo “bologna” e presunto *L. curvatus* não cresceu até a 3ª semana. A população de *Lc. mesenteroides* foi reduzida enquanto que *L. sakei*, *Listeria monocytogenes*, *Serratia grimesii* e *Shevanella putrefaciens* não foram inibidas pelo tratamento com os bioprotetores.

GAO *et al.* (2002) utilizou concentrações entre 125 e 250 mg.L⁻¹ de lisozima contra as seguintes bactérias lácticas: *Lactobacillus kunkeei*, *Lactobacillus brevis*, *Pediococcus parvulus*, e *Pediococcus damnosus* e observou a redução celular de até 8 ciclos logarítmicos. Observou-se que ocorreu grande redução no ácido acético produzido pelas bactérias *L. kunkeei*, *Lactobacillus brevis*, concluindo que a lisozima é um antimicrobiano eficiente para reduzir a produção de ácidos voláteis que causam sabores indesejáveis em alimentos.

CAPÍTULO 3 - PASTEURIZAÇÃO DE CERVEJA TIPO PILSEN POR ALTA PRESSÃO DINÂMICA - DETERMINAÇÃO DO MICRORGANISMO ALVO, ESTUDO DA CINÉTICA DE DESTRUIÇÃO E DO EFEITO DE MÚLTIPLAS PASSAGENS.

3.1 INTRODUÇÃO

Cerveja Pilsener ou simplesmente Pilsen é o tipo de cerveja mais difundido no mercado brasileiro, sendo esta cerveja caracteristicamente límpida, de cor amarela clara, teor alcoólico de médio a baixo (cerca de 4,5°GL) com boa retenção de espuma. É uma cerveja de baixa fermentação ou Lager, caracterizada pela sedimentação da levedura de fermentação ao final do processo de maturação. Industrialmente é envasada em latas metálicas ou garrafas de vidro, pasteurizada para garantia da estabilidade microbiológica.

O processo de pasteurização de cerveja por métodos convencionais térmicos visa a estabilização microbiológica pela destruição dos microrganismos contaminantes, cujo alvo é o *Pediococcus damnosus* (ZUFALL e WACKERBAUER, 2000). O processamento térmico resulta em uma perda de qualidade sensorial pela formação de compostos relacionados à oxidação e ao envelhecimento como o desenvolvimento de aromas de papel e papelão típicos do envelhecimento de cerveja (FURUSHU *et al.*, 1998), mais do que os tradicionalmente descritos aromas a cozido e pão conforme observado por WACKERBAUER e ZUFALL (1998).

BRIGGS *et al.* (1981) enumerou alguns importantes contaminantes de cervejas, especialmente gêneros de bactérias deteriorantes como os Gram positivos: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, e Gram negativos *Acetobacter*, *Acetomonas*, *Enterobacteriaceae*, *Klebsiella*, *Pectinatus*, *Zymomonas* e leveduras selvagens, que são microrganismos dos gêneros *Saccharomyces*, *Torulopsis*, *Pichia*, *Candida*, *Hansenula* e *Rhodotorula*. Alguns microrganismos contaminantes têm sido identificados como emergentes, como *Megasphaera cerevisiae* presente

em cervejas de baixo teor de álcool, *Pectinatus cerevisiiphilus*, *Pectinatus frisingensis*, *Selenomonas lactificex* (JESPERSEN e JAKOBSEN 1996; SATOKARI *et al.*, 1998).

Métodos alternativos de estabilização microbiológica têm sido empregados na indústria com bons resultados de estabilidade, tais como a microfiltração em membranas, que resulta em produtos de qualidade de aroma superior conforme descrito por HAERNULV e LARSSON (1992), ou métodos não térmicos emergentes, como a utilização de sistema de alta pressão hidrostática, que resultou em produtos de qualidade superior devido a retenção de parâmetros de qualidade sensorial tais como cor e amargor (CASTELLARI *et al.*, 2000).

A homogeneização por ultra alta pressão ou ultra alta pressão dinâmica é um processo alternativo de estabilização microbiológica, cujo funcionamento segundo LACROIX *et al.* (2005) baseia-se na produção de altas pressões (maiores que 100 MPa) por um sistema de bombeamento positivo que força o fluido através de uma fenda estreita ajustável (da ordem de micrometros de altura do vão), causando uma descompressão abrupta que gera nesta fenda um gradiente de pressão e conseqüentes acelerações do fluido (FLOURY *et al.*, 2005), que submetem as células microbianas a enorme fricção, cisalhamento e cavitação, que resulta na destruição de microrganismos (KLENIG *et al.*, 1997). Seus mecanismos diferem essencialmente do processamento por alta pressão hidrostática (FANTIN *et al.*, 1996) e geram reduções de escalas diferentes nos microrganismos.

VANNINI *et al.* (2004) observou uma relação log-linear entre pressão de homogeneização e número de reduções decimais de *Escherichia coli*, *Lactobacillus helveticus* e *Lactobacillus plantarum* entre outros microrganismos contaminantes de leite, e pôde determinar a taxa de redução em função do aumento de pressão, o valor de Dp.

O sistema de alta pressão dinâmica é um processo contínuo e permite um processamento com recirculação. Alguns autores (WUYTACK *et al.*, 2002 e KHEADR *et al.*, 2002, TAHIRI *et al.*, 2005) estudaram o efeito de múltiplos ciclos de processamento sobre microrganismos obtendo efeitos aditivos de destruição.

O objetivo desse trabalho foi determinar a eficácia da alta pressão dinâmica sobre uma gama significativa de microrganismos contaminantes de cervejas e selecionar um microrganismo alvo do tratamento. Utilizando o microrganismo alvo objetivou-se determinar a relação entre a pressão de tratamento por alta pressão dinâmica e o número de reduções decimais em cerveja tipo pilsen, e observar o efeito de até 3 ciclos subsequentes do tratamento sobre o microrganismo.

3.2 MATERIAL E METODOS

3.2.1 Matéria Prima

Cerveja engarrafada de marca comercial (pasteurizada), pH 4,5, 4,7°GL, e Brix 2,5, foi adquirida para os testes de estabilização microbiológica, degaseificada e esterilizada em autoclave a 121°C por 15 minutos.

3.2.2 Microrganismos

Foram obtidos de coleção de culturas (Coleção de Culturas Tropical – Fundação André Tosselo, Campinas-SP) microrganismos descritos na literatura como comumente contaminantes de cerveja: *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus delbrueckii* e *Acetobacter acetii*. Os microrganismos *Pediococcus sp.*, *Schizosaccharomyces ludwigii* e *Saccharomyces diastaticus*, foram obtidos da coleção de culturas particular da cervejaria AmBev, unidade de Jacareí – SP.

3.2.3 Meios de Cultura

Foi utilizado, para os ensaios com bactérias lácticas, o meio MRS - De Man, Rogosa, Sharpe (Oxoid), caldo ou agar. Para crescimento de leveduras o

meio utilizado foi o PDA (potato dextrose agar – Oxoid); para crescimento em meio líquido foi utilizado caldo de extrato de malte (15g/L – marca Oxoid), enriquecido com 4% p/v de extrato de levedura (Oxoid). Para as bactérias acéticas foi utilizado MRS (Oxoid) ágar ou caldo adicionado de 2% de etanol P.A. (Merck). Para a manutenção de culturas bacterianas foi utilizado o meio Litmus Milk, leite tornassolado (Difco) exceto para o *A. aceti* que foi repicado em rampas de MRS acrescido de 2% de etanol. As leveduras foram mantidas em rampas de meio PDA cobertas com óleo mineral estéril para evitar ressecamento.

3.2.4 Estabilização microbiológica da cerveja (seleção do alvo do processo)

Foi utilizado para os ensaios o equipamento de ultra-alta pressão, tipo homogeneizador UAP (Stansted Fluid Power Ltd.), com capacidade para tratar 260 mL/minuto de amostra em regime contínuo. A pressão máxima de trabalho do equipamento é de 340 MPa.

O equipamento foi dotado de um trocador de calor por serpentina na saída da válvula de homogeneização para resfriar a amostra, de modo a minimizar o efeito térmico. As temperaturas de processamento foram medidas mediante o uso de termopares calibrados na entrada e na saída da válvula de homogeneização e após o trocador de resfriamento.

O sistema foi sanitizado com álcool etílico a 70% incluindo os tanques de amostra de produto e mangueiras de conexão para garantir a assepsia dos testes. A manipulação e tomada das amostras foram realizadas em capela de fluxo laminar horizontal acoplada ao sistema.

Foram determinadas as reduções de contagens de viáveis devido a morte por pressurização para cada um dos microrganismos às pressões de trabalho de 100, 150, 200, 250 MPa, para selecionar o microrganismo mais resistente ao tratamento em cerveja. As contagens dos microrganismos foram realizadas por plaqueamento e o resultado expresso em UFC/mL, sendo realizadas na amostra antes e depois do tratamento. Foram preparadas contagens de inóculos da ordem

de 10^8 UFC/mL e foram adicionados na diluição de 1% (v/v) . As contagens foram realizadas em duplicata nas condições específicas para cada microrganismo utilizado para confirmação das tendências do processo.

3.2.5 Determinação da cinética de destruição do microrganismo alvo

Foram determinadas as reduções de contagens de viáveis devido a morte por pressurização para o microrganismo alvo, *Lactobacillus delbruecki*, às pressões de trabalho de 100, 150, 170, 190, 200, 250 MPa, As contagens do microrganismo foram realizadas por plaqueamento e o resultado expresso em UFC/mL, sendo realizadas na amostra antes e depois do tratamento. Foram preparadas contagens de inóculos da ordem de 10^8 UFC/mL e foram adicionados na diluição de 1% (v/v) . As contagens foram realizadas em duplicata para confirmação das tendências do processo.

Utilizando os dados obtidos foram adaptados modelos matemáticos, um quadrático e outro logarítmico, de forma a se obter a melhor correlação entre os dados experimentais e calculou-se o Dp (inclinação da reta) para o modelo log linear, na faixa entre 0 e 190 MPa.

3.2.6 Ensaio de múltiplas passagens

Para o ensaio de múltiplas passagens foi preparada cerveja descarbonatada estabilizada a 25°C, inoculada com *Lactobacillus delbruecki* a 1% (v/v) com 10^8 UFC/mL. A suspensão foi então processada por alta pressão dinâmica nas pressões de 100, 150, 200, 250 MPa, e cada fração processada foi separada em recipientes diferentes. Processos subseqüentes das frações foram realizados até o número de 3 processamentos, e alíquotas para contagens por plaqueamento foram retiradas em cada fase. O ensaio foi realizado em duplicata para confirmação das tendências obtidas e os resultados foram expressos em número de reduções decimais (NRD), sendo:

$$\text{NRD} = \log (\text{No}/\text{Nf})$$

Onde o No é a contagem inicial de microrganismos em UFC/mL e Nf a contagem após o processamento em UFC/mL.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 3.1 mostra o número de reduções decimais de unidades formadoras de colônias de bactérias por mL de cerveja submetidas ao tratamento por ultra alta pressão dinâmica em diferentes pressões de processamento. As medições foram realizadas até 250 MPa de pressão mesmo que a totalidade da carga inicial microbiana tenha sido destruída a pressões mais baixas.

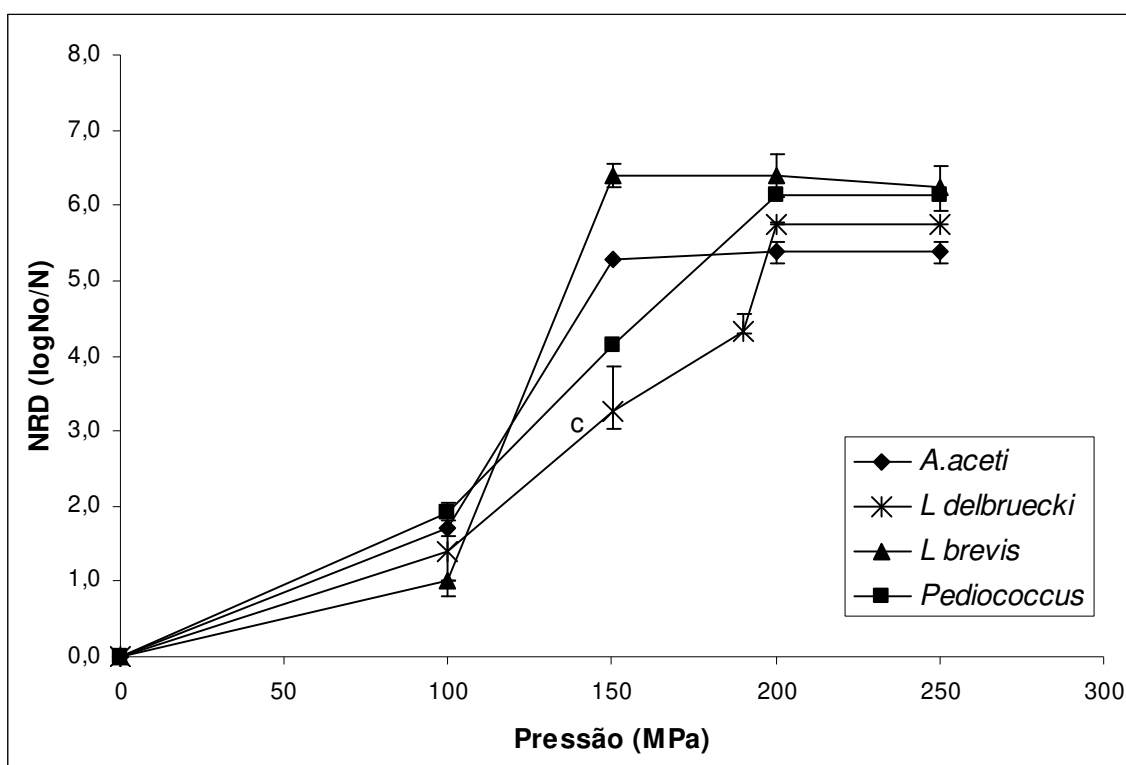


Figura 3.1 – Número de reduções decimais de bactérias em função da pressão de tratamento por ultra alta pressão dinâmica.

Observou-se na Figura 3.1 que dentre as linhagens de bactérias estudadas os *Lactobacillus* sofreram menores reduções em processamentos a 100 MPa.

Processamentos realizados a 150 MPa resultaram na eliminação das cargas totais de microrganismos inoculados de *A. aceti*, enquanto que foram necessários 200 MPa de pressão para reduzir totalmente a contagem inicial de *Pediococcus* e *L. brevis* e 250 MPa para reduzir a totalidade da carga inicial de *L. delbrueckii*. Pôde-se concluir que o *L. delbrueckii* foi a linhagem mais resistente ao tratamento por alta pressão.

TAHIRI *et al.* (2005) observou, em estudos utilizando solução salina e suco de laranja que dentre os microrganismos testados (*Escherichia coli* O157:H7 ATCC 35150, *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917, *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 23386), os Gram positivos (2,3 e 1,6 ciclos logarítmicos para o *L. plantarum* e *L. mesenteroides*, respectivamente) apresentaram maior resistência que o Gram negativo (5,0 ciclos logarítmicos de redução) a 200 MPa de pressão de tratamento.

Da mesma forma, WUYTACK *et al.* (2002) processando cinco linhagens de bactérias gram negativas e seis linhagens de Gram positivas por homogeneização a alta pressão (100 a 300 MPa), observaram que bactérias Gram positivas mostraram maior resistência que Gram negativas, sendo *S. aureus* e *L. plantarum* os microrganismos mais resistentes testados. Os autores atribuem as diferenças de destruição à resistência mecânica das paredes celulares conferidas às bactérias pelas camadas sobrepostas de peptidoglicanas, mais numerosas nas Gram positivas (até 40) que nas Gram negativas (até 5 camadas). Em concordância com o autor, que observou maior resistência do *L. plantarum* que do *L. dextranicum*, a sugestão de que cocos bacterianos seriam mais resistentes ao processo de homogeneização que bastonetes não foi corroborada pelo presente trabalho.

Segundo LANCIOTTI *et al.* (1994) a resistência de microrganismos ao processo de homogeneização a ultra alta pressão por microrganismos estaria

relacionada a adaptações de composição de parede celulares gerando maior fluidez, como observado para *L. monocytogenes* pré tratada a baixa atividade de água (0,87) e incubada a baixas temperaturas (3°C).

A Figura 3.2 mostra o número de reduções decimais de unidades formadoras de colônias de leveduras selvagens por mL de cerveja submetidas ao tratamento por ultra alta pressão dinâmica. As medições foram realizadas até 250 MPa de pressão mesmo que a totalidade da carga inicial microbiana tenha sido destruída a pressões mais baixas.

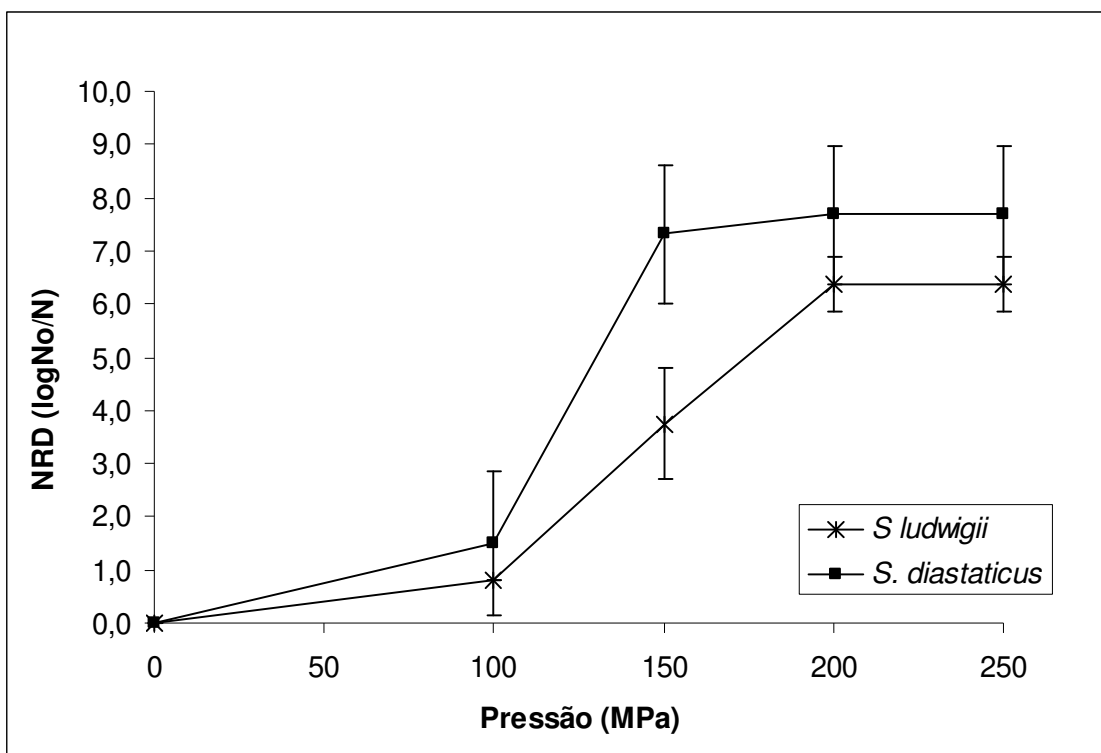


Figura 3.2 - Número de reduções decimais de leveduras selvagens em função da pressão de tratamento por ultra alta pressão dinâmica.

Observou-se segundo a Figura 3.2 que as leveduras selvagens foram pouco afetadas pela aplicação de tratamento a 100 MPa e foram necessários 200 MPa

para reduzir totalmente a carga inicial de ambas as cepas. Devido ao inóculo de *S. diastaticus* ter sido bastante mais alto que o de *S. ludwigii* (até $8,0 \cdot 10^9$ e $1,0 \cdot 10^6$ UFC/mL, respectivamente) observaram-se na Figura 3.2 reduções decimais para *S. diastaticus* (7,3 ciclos logarítmicos de redução a 150 MPa de pressão), que não puderam ser observadas para *S. ludwigii*. Tal observação cabe na avaliação da resistência das cepas à homogeneização, já que não se pôde comparar a redução em pressões de trabalho maiores que 200 MPa para o *S. ludwigii*.

LANCIOTTI *et al.* (1994) estudaram o efeito da homogeneização por alta pressão em *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus subtilis* e *Yarrowia lipolytica*, e observaram que a relação entre o número de sobreviventes e pressão comportou-se de maneira log linear (pressões até 200 MPa). A levedura apresentou valores de taxas de destruição segundo a pressão de homogeneização de $0,0022 \log \text{CFU} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{bar}^{-1}$ enquanto que *B. subtilis* apresentou $0,0015 \log \text{CFU} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{bar}^{-1}$, indicando que o bacilo foi mais resistente ao aumento da pressão, enquanto que os outros dois microrganismos foram menos resistentes com $0,0025 \log \text{CFU} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{bar}^{-1}$. O autor observou que o crescimento subsequente ao tratamento não foi afetado e o tempo de crescimento foi unicamente devido a contagem inicial do microrganismo. Isto sugere que não houve efeito de injúria sobre a levedura pelo processamento a alta pressão dinâmica.

Nas Figuras 3.1 e 3.2 observou-se por comparação que o microrganismo mais resistente foi o *L. delbruecki*, pois apresentou as menores reduções decimais nas maiores pressões (apresentando sobreviventes no tratamento a 200 MPa). Na pressão de 100 MPa as leveduras selvagens apresentaram maior resistência que as bactérias, mas *S. diastaticus* foi bastante mais reduzido que o *L. delbruecki* a pressões iguais ou maiores que 150 MPa.

TAHIRI *et al.* (2005) observaram que microrganismos eucariontes foram menos resistentes ao tratamento de alta pressão dinâmica que procariontes em meios de pH reduzido, devido ao aumento de sensibilidade ao pH combinando ao tratamento por alta pressão.

VANNINI *et al.* (2004) constataram que o tratamento por alta pressão dinâmica em leite desnatado foi capaz de inativar *Escherichia coli*, *Lactobacillus helveticus* e *Lactobacillus plantarum* entre outros microrganismos contaminantes de leite a pressões de até 130 MPa. Os dados mostram que o *Lactobacillus helveticus* foi descrito como mais resistente pelos autores, e assim como a cepa de *Lactobacillus delbruecki* utilizado no presente estudo, trata-se de um termolactobacilo, caracteristicamente mais termotolerante que outros *Lactobacillus* e capaz de desenvolver termotolerância conforme descrito por GOUESBET *et al.*(2001).

3.3.1 Determinação da cinética de destruição do microrganismo alvo

A Tabela 3.1 abaixo mostra a média dos valores de número de reduções decimais de *L. delbruecki* obtidos nos processamentos em cerveja.

Tabela 3.1 – Resultados de número de reduções decimais (NRD) de tratamento de *L. delbruecki* por alta pressão dinâmica.

Média dos ensaios		
Pressão (MPa)	MEDIA (NRD)	Desvios Padrão
0	6,10	0,31
100	1,41	0,63
150	3,26	0,60
170	3,89	0,42
190	4,31	0,24

Pôde-se observar que houve um maior desvio nos processos realizados em baixas pressões e que os desvios foram decrescendo com o aumento das pressões.

A Figura 3.3 mostra a curva adaptada aos valores experimentais obtidos de número de reduções decimais de *Lactobacillus delbruecki* em UFC.mL⁻¹ de cerveja submetido ao tratamento por homogeneização a ultra alta pressão.

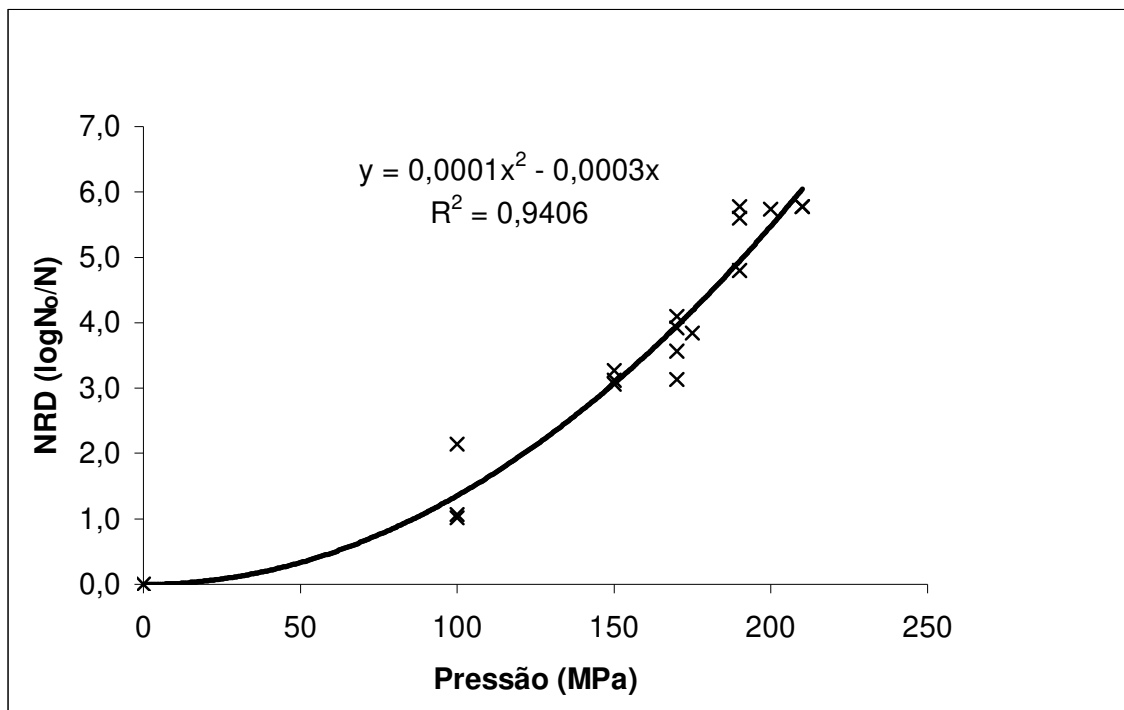


Figura 3.3 - Número de reduções decimais de *L. delbruecki* em função da pressão de tratamento aplicada e curva da função adaptada.

Na Figura 3.3 foi observado que o número de reduções decimais de *L. delbruecki* aumentou em função da pressão de tratamento, e que o aumento do NRD foi a uma maior taxa a pressões maiores. A curva adaptada indicou ter boa explicação ($r^2 = 0,94$) e a equação quadrática reafirma a tendência observada de uma variação da taxa de destruição do microrganismo em função da pressão.

VANNINI *et al.* (2004) obtiveram taxas de inativação (D_p) calculadas em 1086,9 e 212,7 MPa para *Lactobacillus helveticus* e *Lactobacillus plantarum* em leite desnatado, respectivamente, entre as pressões de homogeneização de 0,3 a 130 MPa. É importante observar que as taxas de destruição descritas pelo autor diferem das obtidas no presente trabalho e cujo valor de D_p foi 38,9 MPa entre 0 e 190 MPa (R^2 de 0,965). A diferença observada na destruição entre os processos pode ser atribuída na diferença entre desenhos dos equipamentos especialmente nas válvulas de homogeneização e nas faixas de trabalho em que D_p foi calculado

(máximos de 130 e 300 MPa em VANNINI *et al.* (2004) e no presente trabalho, respectivamente).

A influência do desenho das válvulas de homogeneização foi estudada por KLEINIG e MIDDELBERG (1996) que estudaram a aplicação de seis desenhos de válvulas diferentes na destruição de leveduras, e observaram comportamentos de perda de proteínas pelas células, um indicador de quebra da estrutura celular, significativamente diferentes entre as válvulas, em função da pressão aplicada ou do gradiente de pressão calculado para cada desenho, relativo a pressão de trabalho.

O crescimento das colônias dos sobreviventes recuperados ocorreu no mesmo período que as contagens de amostras não tratadas e produziram colônias de igual tamanho; o que indicou que os sobreviventes não foram injuriados e que a injúria causada pelo tratamento foi irreversível, resultando na morte dos microrganismos. Estas observações foram confirmadas por ensaios realizados por WUYTACK *et al.* (2002) em meios de cultura adicionados de fatores de barreira ao crescimento, tais como pH (5,5 a 7,0), SDS (0 a 100 mg.L⁻¹) e concentração salina (0 a 6%), que não surtiram efeito inibidor maior sobre microrganismos expostos ao tratamento por alta pressão, indicando que não houve injúria resultante deste processamento.

3.3.2 Ensaio de múltiplas passagens

A Figura 3.4 mostra o efeito de múltiplas passagens de bateladas de uma suspensão de *L. delbruecki* em cerveja pelo sistema de pasteurização por ultra alta pressão dinâmica nas pressões de 100, 150, 200 e 250 MPa.

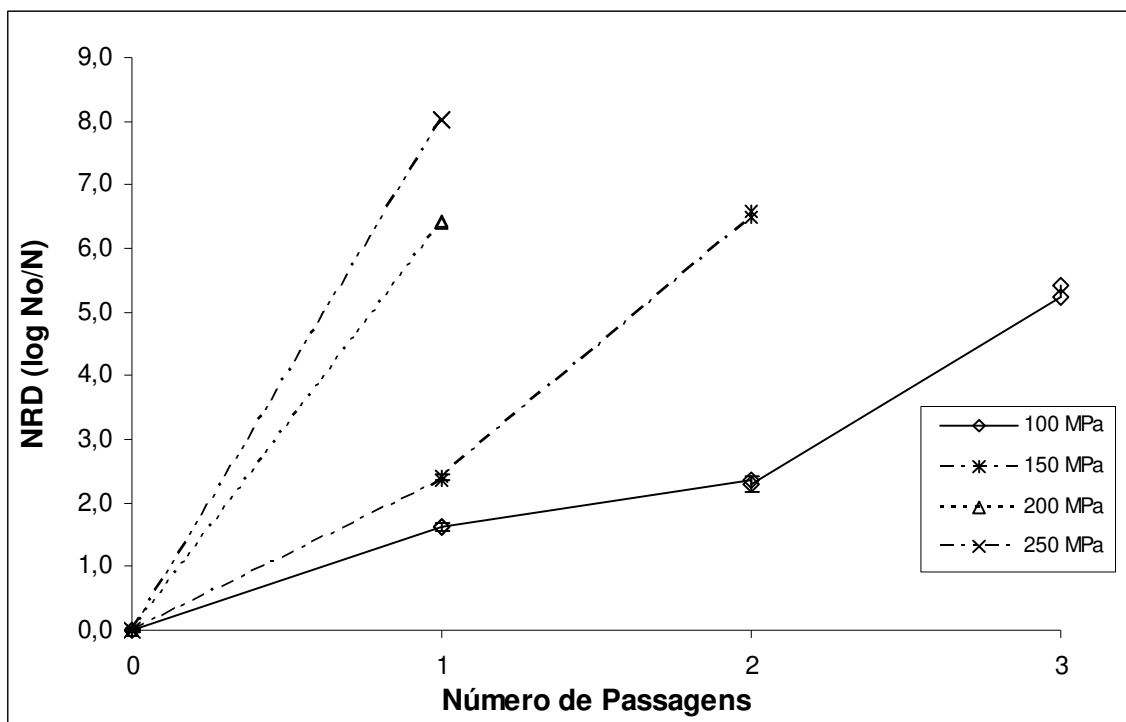


Figura 3.4 – Efeito do número de passagens na destruição de *L. delbrueckii* em cerveja pilsen por alta pressão dinâmica.

A Figura 3.4 mostra que houve a total redução da carga inicial do microrganismo (8,03 ciclos logarítmicos) na primeira passagem da suspensão pelo sistema a pressão de tratamento de 250 MPa. A redução total da carga só ocorreu na segunda passagem nos tratamentos realizados a 200 MPa, e na terceira passagem à 150 MPa. Três tratamentos sucessivos a 100 MPa reduziram cerca de 5 ciclos logarítmicos do microrganismo. Os efeitos de tratamentos sucessivos não foram potencializados ou antagônicos entre si, exibindo comportamento aditivo.

Os resultados observados por WUYTACK et al. (2002) corroboram esta observação, que tratando suspensões de *Staphylococcus aureus* e *Yersinia enterocolitica* por homogeneização a alta pressão, a 300 e 200 MPa, respectivamente, obtiveram destruições aditivas a cada ciclo de tratamento, sendo que *S. aureus* foi reduzido em 4 ciclos logarítmicos após quatro passagens com reduções de cerca de um ciclo logarítmico a cada passagem.

3.4 CONCLUSÃO

O tratamento por ultra-alta pressão dinâmica foi eficaz na redução de contagens de microrganismos caracteristicamente contaminantes de cerveja. Mesmo em contagens iniciais bastante altas (cerca de 6 ciclos logarítmicos), praticadas para que se pudesse medir as reduções devido a pressão, o processo pôde eliminar a totalidade da carga inicial em pressões de até 300 MPa.

Lactobacillus delbrueckii, um termolactobacilo, foi o mais resistente ao tratamento por alta pressão, tendo apresentado recuperação de microrganismos viáveis a pressão de 200 MPa. Desta forma, o *L. delbrueckii* pode ser utilizado como o alvo do processo de alta pressão dinâmica para cervejas do tipo pilsen.

O processamento por alta pressão dinâmica de *L. delbrueckii* em cerveja tipo pilsen exibiu uma dependência positiva entre a pressão de trabalho e a destruição do microrganismo, que pode ser associada a uma função quadrática ou mesmo log linear (para efeito de comparação com a literatura), com boas explicações do fenômeno. Foi observado que a morte do microrganismo resultou de uma injúria irreversível, e injúria subletal não pode ser observada.

Por fim, o tratamento por múltiplos ciclos de processamento resultou em pressões subletais resultou em um efeito aditivo, não tendo sido observado sinergismo por sensibilização do microrganismo ou desenvolvimento de resistência em ciclos subseqüentes.

3.5 BIBLIOGRAFIA

BRIGGS, D.E.; HOUGH, J.S.; STEVENS, R.; YOUNG, T.W. **Malting and Brewing Science**. Vol. 2, Ed. Chapman & Hall, 1981.

CASTELLARI, M.; ARFELLI, G.; RIPONI, C.; CARPI, G.; AMATI, A. High Hydrostatic Pressure Treatment for Beer Stabilization. **Journal of Food Science**. 65(6), 974-977, 2000.

FANTIN, G; FOGAGNOLO, M; GUERZONI ME. Effect of high hydrostatic pressure and high pressure homogenization on the enantioselectivity of microbial reductions **Tetrahedron-Asymmetry** 7 (10): 2879-2887 , 1996.

FLOURY, J; LEGRAND JACK, DESRUMAUX, A. Analysis of a new type of high pressure homogeniser. Part B. study of droplet break-up and recoalescence phenomena. **Engineering Science**, 2005.

FURUSHU, S.; KOBAYASHI, M.; MAKAE, M.; TAKASHIU, M.; TAMAKI, T.; SHIUOTSUKA, K. A developed descriptive sensory test reveals beer changes during storage. **MBAA Technical Quarterly**. 36(2) 163-166, 1999.

GOUESBET G, JAN G, BOYAVAL P. *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus* thermotolerance. **Lait** 81 (1-2): 301-309, 2001.

HAERNULV, B.G.; LARSSON, T. A study of the influence of pasteurization and membrane filtration on the quality of Swedish lagers. **MBAA Technical Quarterly**. 29: 143-146, 1992.

JESPERSEN, L.; JAKOBSEN, M. specific spoilage microorganisms in breweries and laboratory media for their detection. **International Journal for Food microbiology**. 33, 139-155, 1996.

KHEADR, E., VACHONA J.F., PAQUINA P, FLISSA I., Effect of dynamic high pressure on microbiological, rheological and microstructural quality of Cheddar cheese. **International Dairy Journal** 12 (2002) 435–446, 2002.

KLEINIG A R ;. MIDDELBERG A P. J .The Correlation of Cell Disruption With Homogenizer Valve Pressure Gradient Determined by Computational Fluid Dynamics **Chemical Engineering Science**, Vol. 51, No. 23, pp. 5103 5110, 1996.

KLEINIG A R ;. MIDDELBERG A P. J. On the mechanism of microbial cell disruption in high pressure homogenization, **Chemical Engineering Science**, 53 (5) 891 – 898, 1998.

LACROIX, N.; FLISS, I; MAKHLOUF, J. Inactivation of pectin methylesterase and stabilization of opalescence in orange juice by dynamic high pressure. **Food Research International** 38 (2005) 569–576

LANCIOTTI, R; SINIGAGLIA, M; ANGELINI, P; GUERZONI, M.E. Effects of homogenization pressure on the survival and growth of some spoilage and pathogenic micro-organisms. **Letters in Applied Microbiology**. 18 319-322,1994.

SATOKARI , R.; JUVONEN, R.; MALLISON , K.; VON WRIGHT, A.; HAIKARA, A. Detection of beer spoilage bacteria *Megasphaera* and *Pectinatus* by polymerase chain reaction and colorimetric microplate hybridization. **International Journal of Food Microbiology**. 45, 119–127, 1998.

TAHIRI, I., MAKHLOUF J, PAQUIN P, FLISS, I. Inactivation of food spoilage bacteria and *Escherichia coli* O157:H7 in phosphate buffer and orange juice using dynamic high pressure. **Food Research International** (2005)

VANNINI L, LANCIOTTI R, BALDI D, Interactions between high pressure homogenization and antimicrobial activity of lysozyme and lactoperoxidase. **International Journal of Food Microbiology** 94 (2): 123-135, 2004.

WACKERBAUER, K; ZUFALL, C. Pasteurization and beer quality. **Cerevisia**, proc EBC congress (Maastricht), 37-43, 1997.

WUYTACK, E.Y.; DIELS, A.M.J.; MICHIELS, C.W. Bacterial inactivation by high-pressure homogenisation and high hydrostatic pressure. **International Journal of Food Microbiology**. 77 (3): 205-212, 2002.

ZUFALL, C.; WACKERBAUER, K. The biological impact of flash pasteurization over a wide temperature interval. **Journal of the Institute of Brewing**. 106(3), 163-168, 2000.

CAPÍTULO 4 - EFEITO DA TEMPERATURA INICIAL DE PROCESSAMENTO POR ALTA PRESSÃO DINÂMICA E CONCENTRAÇÃO INICIAL DE CO₂ SOBRE A DESTRUIÇÃO DE *L. DELBRUECKI* EM CERVEJA TIPO PILSEN.

4.1 INTRODUÇÃO

A homogeneização por ultra alta pressão ou alta pressão dinâmica é um processo alternativo, não térmico, de estabilização microbiológica, cujo funcionamento segundo LACROIX *et al.* (2005) baseia-se na produção de altas pressões por um sistema de bombeamento positivo que força o fluido através de uma fenda estreita ajustável, causando uma descompressão abrupta que gera, nesta fenda um gradiente de pressão e conseqüentes acelerações do fluido (FLOURY *et al.*, 2005), que submetem as células microbianas a enorme fricção, cisalhamento e cavitação, que resulta na destruição de microrganismos (KLENIG e MIDDELBERG, 1997).

A temperatura de entrada em um sistema de alta pressão dinâmica associada ao aquecimento promovido durante a passagem do fluido na válvula de homogeneização pode ser aproveitada para o aumento de eficiência do sistema, como tratamento térmico brando (HAYES *et al.*, 2005), ou exercer um efeito sobre os mecanismos de destruição de microrganismos, especificamente nas forças viscosas responsáveis pela ruptura celular (DIELS *et al.*, 2004).

BANG e BARBOSA-CÁNOVAS (1999) utilizou alta pressão hidrostática (cerca de 275 MPa por 30 s) para inativar *Saccharomyces cerevisiae* em suco de maçã a 23°C, com e sem saturação de CO₂, obtendo 2 e 3 ciclos logarítmicos de destruição respectivamente, indicando que houve sinergismo entre o processamento e a adição do dióxido de carbono. HONG e PYUN (1999) atribuiu a destruição de *Lactobacillus plantarum* por injeção a alta pressão de CO₂ ao abaixamento do pH intracelular devido a penetração de CO₂ na célula, em detrimento a ruptura mecânica das células. TAUSCHER (1994) confirma que o dióxido de carbono, assim como outros ácidos inorgânicos, submetido à alta

pressão hidrostática ioniza-se, solubilizando-se no meio aquoso e resultando em alteração da concentração hidrogeniônica.

NOMA *et al.* (2004) investigaram um método de descompressão rápida (2 ms) para promover a ruptura de células aumentando a eficiência da destruição por alta pressão e obtiveram aumento no efeito bactericida sobre bactérias Gram negativas.

Este trabalho tem por objetivo avaliar a influência dos fatores: concentração de dióxido de carbono na cerveja e temperatura de entrada na destruição do microrganismo *Lactobacillus delbruecki* por alta pressão dinâmica.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Matéria Prima

Cerveja engarrafada de marca comercial (pasteurizada) com pH 4,5, 2,5°Brix e 4,7°GL foi adquirida para os testes de estabilização microbiológica. Utilizando um sistema de carbonatação por vela sinterizada obteve-se a carbonatação desejada para os ensaios medida em Volumes de CO₂, através da tomada de pressão em frascos acoplados de manômetro.

4.2.2 Microrganismo

Lactobacillus delbruecki foi obtido de coleção de culturas (Coleção de Culturas Tropical – Fundação André Tosselo, Campinas-SP).

4.2.3 Meios de Cultura

Foi utilizado o meio MRS - De Man, Rogosa, Sharpe (Oxoid), caldo ou agar, para os ensaios com *Lactobacillus delbruecki*. Para a manutenção de culturas bacterianas foi utilizado o meio Litmus Milk, leite tornassolado (Difco)

4.2.4 Estabilização microbiológica da cerveja

Foi utilizado para os ensaios o equipamento de ultra-alta pressão, tipo homogeneizador UAP (Stansted Fluid Power Ltd.), com capacidade para tratar 260 mL/minuto de amostra em regime contínuo. A pressão máxima de trabalho do equipamento é de 340 MPa.

O equipamento foi acoplado a um trocador de calor por serpentina na saída da válvula de homogeneização para resfriar o produto a 25°C, de modo a minimizar os efeitos de morte térmica sobre o microrganismo. O sistema foi sanitizado com álcool etílico a 70% incluindo os tanques de amostra e produto e mangueiras de conexão para garantir a assepsia dos testes. A manipulação e tomada das amostras foram realizadas em capela de fluxo laminar horizontal acoplada ao sistema.

Foram determinadas as reduções de contagens de viáveis devido a morte por pressurização para *Lactobacillus delbruecki* às pressões de trabalho de 150, MPa para o ensaio de efeito de temperatura e 150 e 170 MPa para o teste do efeito do teor de dióxido de carbono. As contagens do microrganismo foram realizadas por plaqueamento e o resultado expresso em UFC/mL, antes e depois do tratamento. Foram preparadas contagens de inóculos da ordem de 10^8 UFC/mL e foram adicionados na diluição de 1% (v/v) . As contagens foram realizadas em duplicata para confirmação das tendências do processo.

4.2.5 Efeito da temperatura de entrada

A cerveja foi distribuída em recipientes previamente esterilizados acondicionados nas temperaturas de 6, 10, 20, 23, 30, 44, 50°C até estabilização. Um trocador de calor por serpentina foi acoplado na entrada do sistema de modo a controlar a temperatura. O sistema foi equipado com um termopar em linha para registrar e controlar o meio de aquecimento ou refrigeração externo à serpentina de produto. Foram registradas as temperaturas do produto no recipiente de entrada, na saída da serpentina (entrada na máquina), em um ponto anterior à

válvula de homogeneização (sob alta pressão), após a válvula de homogeneização e após o trocador de calor de saída. Para tanto foram instalados termopares de cobre-constantan previamente calibrados ligados a um aquisidor de dados (Data Logger, Bernant Co., Grã-Bretanha), por sua vez ligado a um microcomputador com software para captura de dados de temperatura. O recipiente de entrada foi acoplado a um sistema de contrapressão de CO₂ para impedir a formação de bolhas de gás durante a sucção de produto pelo sistema. Foi utilizada cerveja com carbonatação inicial de 2 volumes.

4.2.6 Efeito da concentração de CO₂ na cerveja.

A cerveja foi preparada com os teores de dióxido de carbono de 0, 0,5, 1,0 e 2,0 volumes a 25°C. Cada qual foi acondicionada em recipiente dotado de contrapressão de CO₂, acoplado diretamente à entrada do sistema de alta pressão dinâmica e inoculada com uma suspensão de *L. delbruecki* com concentração celular de cerca de 10⁸ UFC/mL à razão de 1%. As amostras foram processadas a 150 e 170 MPa, e amostras foram coletadas para contagem de sobreviventes viáveis. Os testes foram realizados em duplicata.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Efeito da temperatura de entrada

A Figura 4.1 mostra a influência da temperatura de entrada da suspensão de *L. delbruecki* em cerveja na destruição deste microrganismo submetido ao tratamento por alta pressão dinâmica a 150 MPa, preliminarmente determinado como um tratamento subletal à 25°C.

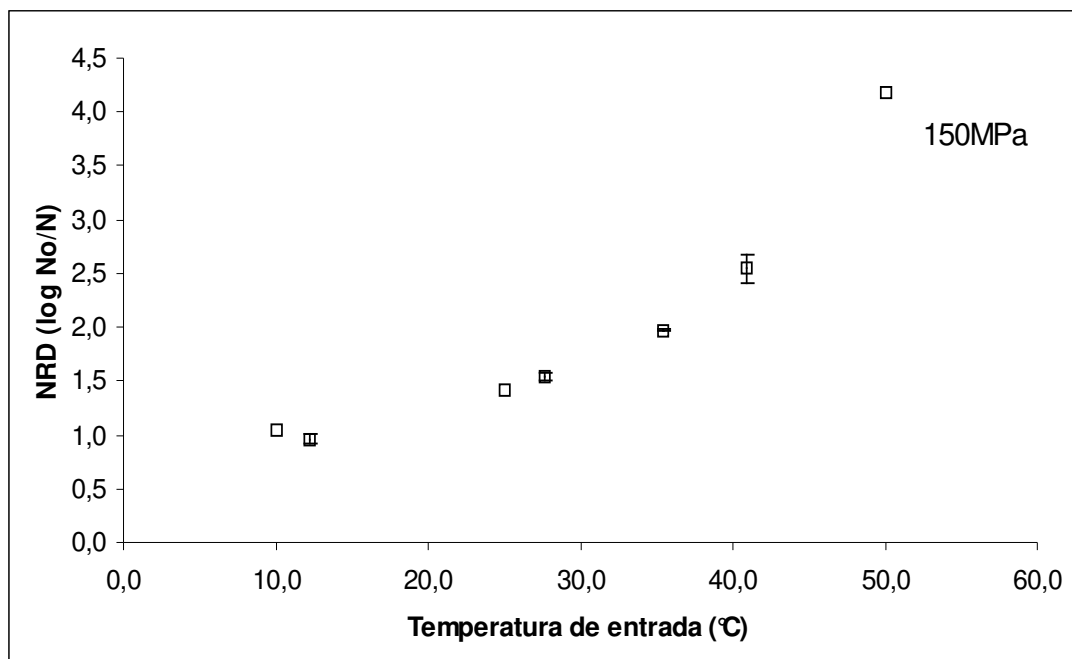


Figura 4.1 – Destruição por alta pressão dinâmica a 150 MPa de *L. delbrueckii* em cerveja em função da temperatura de entrada da válvula de homogeneização.

Foi observado na Figura 4.1 que a temperatura de entrada da suspensão de bactérias em cerveja influenciou a morte do microrganismo, causando maior destruição em temperaturas mais altas. Também se pôde constatar que aumentos de temperatura de entrada causaram incrementos que não seguiram uma progressão linear, indicando uma potencialização dos efeitos da temperatura e do tratamento por alta pressão dinâmica. Foi constatada uma grande variação entre os extremos da variação de temperaturas com cerca de 3 ciclos logarítmicos de diferença entre processos realizados a 10°C e 50°C.

Segundo DIELS *et al.* (2004) que estudaram o efeito da temperatura de entrada na destruição de *Escherichia coli*, observaram que a temperatura exerce uma importante ação sobre as taxas de destruição do microrganismo: em temperaturas em que a saída do sistema do bloco de homogeneização não

ultrapassa os 65°C, a ação do aumento da temperatura resulta em modificações de viscosidade nos fluidos causando mudanças em efeitos mecânicos envolvidos na destruição dos microrganismos tais como cavitação e turbulência. Em temperaturas baixas a cavitação é menor devido às menores pressões de vapor, mas, na medida que a cavitação ocorre, tem efeitos mais drásticos devido ao violento colapsamento dessa cavitação em baixas pressões de vapor. A turbulência aumenta com a temperatura resultado da diminuição da viscosidade, levando assim a uma maior cavitação e ambos a uma maior destruição microbiológica.

A Figura 4.2 mostra medidas de temperaturas em diferentes pontos do processo com temperaturas de entrada variando entre 12 e 41°C.

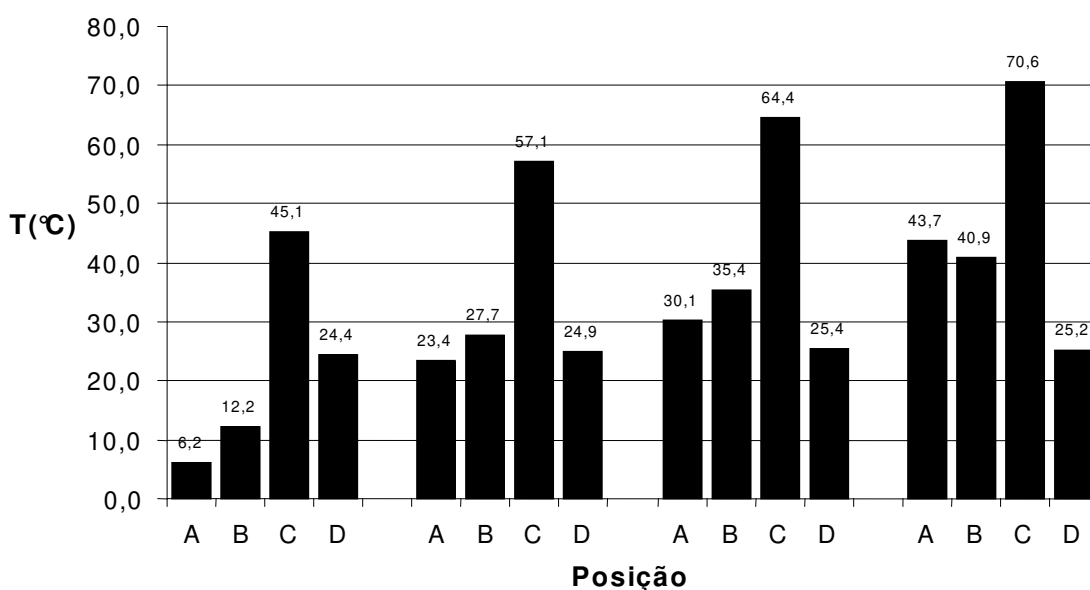


Figura 4.2 – Temperaturas no processamento por alta pressão (150 MPa) em função das temperaturas de entrada. As posições da legenda referem-se: A - Temperatura de entrada no sistema; B – Temperatura de entrada (após compressão adiabática e imediatamente antes da válvula de homogeneização); C – Temperatura após a válvula de homogeneização; D – Temperatura após o trocador de calor (água a 25°C).

Em temperaturas de entrada mais altas que 23,7°C, o calor gerado pelo atrito na válvula de homogeneização excedeu a mínima temperatura que gera letalidade no microrganismo, de cerca de 55°C (CASADEI *et al.*, 2001; GOUESBET *et al.*, 2001), porém, o tempo de residência no trocador foi muito pequeno (calculado em 4,5 s para temperatura de 80°C), minimizando o efeito de destruição pela temperatura. No entanto, os efeitos da temperatura e da homogeneização por alta pressão podem ser utilizados em combinação na destruição de microrganismos (HAYES *et al.*, 2005).

4.3.2 Efeito da concentração de CO₂ na cerveja.

A Figura 4.3 mostra a destruição de *L. delbrueckii* por tratamento por alta pressão dinâmica a 150 e a 170 MPa em função do teor inicial de dióxido de carbono em cerveja.

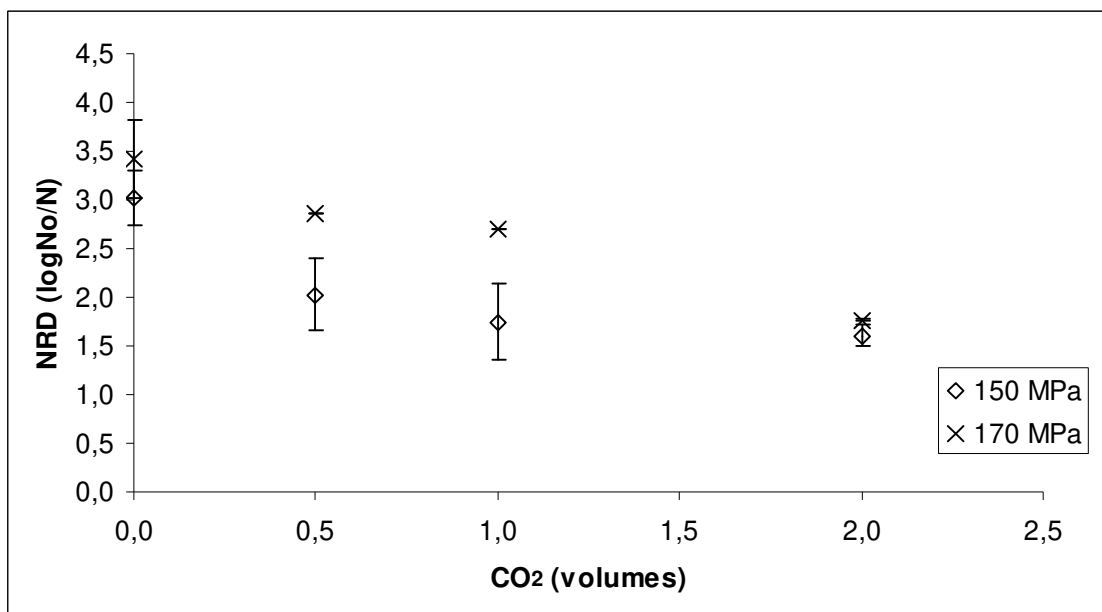


Figura 4.3 – Número de reduções decimais (NRD) de *L. delbrueckii* por tratamento por alta pressão dinâmica (150 e 170 MPa) em função da concentração de CO₂ em cerveja.

Os dados apresentados na Figura 4.3 mostraram uma influência da concentração inicial de dióxido de carbono na cerveja sobre a morte do microrganismo em suspensão. Os resultados indicaram que os aumentos da concentração de CO₂ resultaram em uma menor eficiência do tratamento, sendo o processamento a 150 MPa capaz de inativar cerca de 3,5 ciclos logarítmicos do microrganismo na cerveja descarbonatada, enquanto que na cerveja contendo 2 volumes de CO₂, apenas cerca de 1,5 ciclos logarítmicos foram inativados.

Estes efeitos foram observados em ambas as pressões de processo aplicadas tendo sido o processo a 170 MPa o mais eficiente em todas as concentrações de CO₂ empregadas.

O efeito antagônico, observado entre o tratamento por alta pressão dinâmica e a concentração de dióxido de carbono na destruição do microrganismo, pôde ser atribuído a efeitos físicos da expansão do CO₂ sobre a agulha da válvula de homogeneização, com forte turbulência, conseqüentemente afetando a operação estável do sistema. BROOKMAN (1974) observou em seu experimento que as condições de escoamento turbulento não favorecem a ruptura celular em comparação com o escoamento laminar, e aponta que altas pressões de operação, em que ocorrem condições de estol – descolamento da camada limite - as velocidades nas válvulas diminuem com correspondente diminuição da ruptura celular, apesar da pressão se manter relativamente constante.

Esses efeitos sobre a operação do sistema parecem sobrepujar os efeitos positivos da cavitação e turbulência descritos por DIELS et al. (2004), que puderam ser associados nos ensaios da influencia da temperatura de entrada na destruição celular.

4.4 CONCLUSÃO

As temperaturas de entrada de produto tiveram grande influência na eficiência de destruição do microrganismo *L. delbruecki*, com cerca de 3 ciclos logarítmicos do microrganismo de diferença de destruição entre a temperatura

mais alta (50°C) e a mais baixa (10°C). Os mecanismos envolvidos foram de natureza térmica resultantes do atrito gerado na válvula de homogeneização, mas minimizados pelas características construtivas do equipamento, e mecânicas, acelerações resultantes do gradiente de pressão na válvula, alto cisalhamento, e conseqüente turbulência e cavitação.

O dióxido de carbono, ao contrário do esperado, não promoveu uma maior inativação celular, por conta de uma turbulência excessiva na válvula, vazão inconstante devido a maior compressibilidade do fluido, resultando em uma operação errática e em uma menor eficiência de destruição. Soluções industriais devem ser futuramente consideradas para garantir a eficiência do processo ou a realização da carbonatação *a posteriori*.

4.5 BIBLIOGRAFIA

BROOKMAN J. S. Mechanism Of Cell Disintegration In A High-Pressure Homogenizer. **Biotechnology and Bioengineering** 16 (3): 371-383, 1974.

CASADEI M.A. ,. INGRAM R, HITCHINGS E., ARCHER J.,HEAT J.E. Resistance of *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* and *Lactobacillus delbrueckii* in relation to pH and ethanol. **International Journal of Food Microbiology** 63 (2001) 125–134, 2001.

DIELS, A M. J., CALLEWAERT L, WUYTACK E Y., MASSCHALCK B, MICHIELS C W. Moderate Temperatures Affect *Escherichia coli* Inactivation by High-Pressure Homogenization Only through Fluid Viscosity. **Biotechnology Progress**, 20, 151-157, 2004.

FLOURY, J; BELLETTREB J, LEGRAND JACK, DESRUMAUX, A. Analysis of a new type of high pressure homogeniser. A study of the flow pattern **Chemical Engineering Science** 59 (2004) 843 – 853

GOUESBET G, JAN G, BOYAVAL P. *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus* thermotolerance. **Lait** 81 (1-2): 301-309, 2001.

HAYES, M.G.; FOX, P.F.; KELLY, A.L. Potential applications of high pressure homogenisation in processing of liquid milk. **Journal of Dairy Research** 72 (1): 25-33, 2005.

HONG, S.I.; PYUN, Y.R. Physiological changes of *Lactobacillus plantarum* by high pressure carbon dioxide treatment. anais do congresso do institute of food technology – **IFT book of abstracts**. 1999.

KLEINIG A R ; MIDDELBERG A P. J. On the mechanism of microbial cell disruption in high pressure homogenization, **Chemical Engineering Science**, 53 (5) 891 – 898, 1998.

LACROIX, N.; FLISS, I; MAKHLOUF, J. Inactivation of pectin methylesterase and stabilization of opalescence in orange juice by dynamic high pressure. **Food Research International** 38 (2005) 569–576

NOMA, S.; SHIMODA, M.; HAYAKAWA, I. Improvement of pressure-inactivation effect with rapid decompression procedure. **International Congress on Engineering of Food – ICEF9 Montpellier**, Book of Abstracts, 2004.

TAUSHER, B. Pasteurization of food by hydrostatic high pressure: chemical aspects. **Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und- Forschung**. 200: 3-13, 1995.

CAPÍTULO 5 - COMBINAÇÃO DE ALTA PRESSÃO DINÂMICA E DE LISOZIMA PARA TRATAMENTO DE *L. BREVIS* EM UM SISTEMA MODELO DE ALIMENTO - TAMPÃO FOSFATO PH 6,0.

5.1 INTRODUCTION

Hurdle technology is based in the concept that applying gentle individual steps to gradually reduce microbial counts, it is possible to better preserve the sensorial and nutritional characteristics of a product, rather than when only a single method of preservation is used. The hurdle concept combines factors such as heating, pH, antimicrobials, competitive flora and others.

L. brevis is a commonly found spoilage bacterium in beverages (HOLLEROVA and KIBIZNIAKOVA, 2001), specially in beer and wine, causing off-flavour and increasing the turbidity (ASCHEE *et al.*, 1992; PRIENST and CAMPBELL, 1999).

Dynamic high pressure (DHP), also called ultra high pressure homogenization (UHPH), is a non-thermal process that is used to cause a partial or complete inactivation of the microbial population in food. The process is an alternative to heat treatment for heat-labile products, getting a maximal retention of the chemical and physicochemical product properties, resulting in a better sensorial quality (WUYTACK *et al.*, 2002).

In the process of homogenization the fluid is forced under pressure through a narrow gap where it is subjected to rapid acceleration after which it undergoes an extreme drop in pressure (LANCIOTTI *et al.*, 1996).

Many studies were carried out to determine the action of High Pressure Homogenization (HPH) against many microorganisms. POPPER and KNORR (1990) reported that the homogenisation treatment at 100 MPa reduced 3 log cycles of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* cell population and 1 log cycle of *Streptococcus lactis*. LANCIOTTI *et al.* (1994) observed that a high pressure

homogenisation treatment of around 100 MPa caused a reduction of *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* and *Yarrowia lypolytica* cell populations of approximately 2, 3 and 6 log cycles, respectively.

Lysozyme is a naturally occurring enzyme and hen egg albumin is the primary source for commercial extraction. The enzyme has the ability to hydrolyse the β 1,4 glycosidic bond between N-acetylmuramic acid and N-acetil-D-glucosamine of the peptidoglican that is the major component found in Gram-positive bacteria cell walls (LOSSO, 2000). Hydrolysis of cell walls by lysozyme causes damage in the structural integrity and results in the lysis of the bacterial cell (PROCTOR, 1988).

Also, lysozyme is relatively low priced compared to other antimicrobial agents such as nisin (CHUNG *et al.*, 2000), and is classified as GRAS (DAESCHEL *et al.*, 1999).

Lysozyme was shown to be effective as a preservative of cheeses, cow's milk, beer (MAKKI and DURANCE, 1997), fresh fruits and vegetables, fish and meat (GILL and HOLLEY, 1999), and wine; in these products the control of pathogenic and spoilage bacteria by lysozyme showed good results (NATTRESS *et al.*, 2001).

Some authors have observed that the partially unfolded lysozyme structure has shown a development of effectiveness against Gram-negative bacteria without antimicrobial activity loss against to Gram-positive bacteria (MASSCHALK *et al.*, 2001; IBRAHIN *et al.*, 2001; DÜRING *et al.*, 1999). The results also showed that muramidase activity was independent of the antimicrobial mode of action.

High pressure is known to promote structural changes in lysozyme (AKASAKA *et al.*, 1997) although the effect has to be investigated, as SAIKUMAR *et al.* (1995) could not observe activity loss in treatments up to 150 MPa.

This work aims to evaluate the use of lysozyme and dynamic high pressure

process as hurdles in the control of *L. brevis* in a buffer system, in order to investigate the effects of each treatment and the resulting interactions of the combined treatments.

5.2 MATERIAL AND METHODS

5.2.1 Bacteria and growth media

Lactobacillus brevis (CCT 3745) and *Micrococcus lysodeikticus* (ATCC 4698) were obtained from Tropical Culture Collection (Campinas-SP, Brazil). Lyophilised cells of *Micrococcus lysodeikticus* (ATCC 4698) were obtained from Sigma chemical Co.(St. Louis, MO). *L. brevis* was grown in Difco *Lactobacillus* media (MRS - agar and broth) and *M. lysodeikticus* was grown in NA.

5.2.2 Muramidase activity

Lysozyme was obtained from the commercial formulation Novagard[®] (Rhodia, S.A.S), and had a specific activity of at least 95% of 24000 U.mg⁻¹.

Hydrated *M. lysodeikticus* in solution (1.5 mg lyophilised cells per 10 mL of phosphate buffer, pH 6.3, with initial absorbance at 450 nm of 0.8 - 0.7 AU) was used to determine lysozyme activity using the turbidity assay method as outlined in the Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA) Bulletin n^o 11-77, with few modifications: For each essay, 0.1 mL of the lysozyme sample was added to 2.5 mL of a *M. lysodeikticus* suspension. The suspension was mixed and the optical density was read after 30 seconds at 450 nm in a spectrophotometer Spectronic 21D (Milton Roy). A decrease in absorbance was recorded every minute for 5 minutes. One unit of activity was defined as the amount of enzyme that produced a change in absorbance of 0.001AU.min⁻¹ under these conditions. Lysozyme samples were assayed in quadruplicate.

5.2.3 Dinamic high pressure treatment

The ultra high pressure treatments were performed in a ultra high pressure homogeniser, model FPG 7400H:350 (STANSTED Fluid Power LTD. Essex UK) at pressures between 0 and 300 MPa with a nominal flow of 250 mL.min⁻¹. Thermocouples for temperature registering were placed at the outlet of intensifiers, of the main homogenisation valve and of the product cooler, connected to a data logger model 692-8010 (Barnant Co., Barrington IL.).

5.2.4 Minimal inhibitory concentration (MIC)

MIC was tested by the method described by Stupiello (1993). 30 µL of a culture of *L. brevis* were added to test tubes containing 10 mL of MRS broth media and lysozyme at concentrations of 0, 25, 50, 75, 100 and 250 mg.L⁻¹. The tubes were incubated for 24h at 30°C and the growth was determined by turbidity (580 nm). The MIC value was the lowest concentration of lysozyme that showed inhibition of bacterial growth in 24h.

MRS broth media was inoculated with *L. brevis* (10³ CFU.mL⁻¹) and lysozyme was added at the concentrations of 0, 25, 50, 75 and 100 mg.L⁻¹. The optical density due to growth of the suspension was measured until it reached an increment of 0.1 UA. The results were plotted on a graph using mathematical software (Origin 6.0); an exponential fit equation was obtained for the lag phase time calculations.

5.2.5 Dynamic high pressure treatment of lysozyme

A 1g.L⁻¹ solution of lysozyme in phosphate buffer was prepared and treated at 0, 60, 100, 150, 200, 250 and 300 MPa.

After the treatment, samples were collected for lysozyme muramidase activity and antimicrobial activity determination. Lysozyme action against the bacteria was performed inoculating *L. brevis* into MRS broth containing 50 mg.L⁻¹ of treated lysozyme, and measuring the optical density due to growth at 2h

intervals for 25h; the lag phase time and the growth rate at 21h (μ_{21}) were obtained by derivation of the fit obtained for the growth curve. The kinetic parameters were analysed by the Tukey test – ANOVA using the STATISTICA program (Statsoft inc.).

5.2.6 Effect of lysozyme in a *Lactobacillus brevis* suspension

The bacterial count decay due to the lysozyme antimicrobial treatment was determined preparing test tubes containing 0, 50 and 100 mg.L⁻¹ of lysozyme in a phosphate buffer previously inoculated with *L. brevis* (10⁶ cfu/mL). Counts were performed after 0, 1, 2, 3 and 7 days of storage at ambient temperature (25°C). In order to optimise a lysozyme pre-treatment of the bacterial suspension the assay was performed by collecting samples after 1,2,3, 4 and 5h of contact.

5.2.7 Effect of dynamic high pressure on *L. brevis* suspension

A 10⁶ CFU.mL⁻¹ bacterial suspension in phosphate buffer was prepared by inoculating *L. brevis*. The suspension was then treated at 300, 250, 200, 150, 100 and 60 MPa in the high pressure homogenizer. After the treatment, the samples were plated in MRS agar and incubated at 30°C.

A similar assay was performed treating the microbial suspension at 150, 160, 170, 180 and 190 MPa in the high pressure homogenizer, to refine the obtained results.

5.2.8 Combined treatment of *L. brevis* suspension and storage cell count

Lysozyme was added to a *L. brevis* suspension at the concentration and contact time optimised by the pre treatment test (50 mg.L⁻¹ per 2h). The suspension was treated by high pressure homogenisation at the sub lethal pressures of 150, 160, 170 MPa. The samples were then plated.

Samples of each treatment pressure were taken after 1, 2, 3 and 7 days of storage at ambient temperature. The loss of viability was calculated using the results obtained from the counts of colony forming units (CFU/mL).

5.3 RESULTS AND DISCUSSION

Lysozyme activity was found to be 60,320 UA. All results were obtained with lyophilised cells as the substrate since previous tests with cultured *Micrococcus lysodeikticus* did not show repeatability. The physiological state and interference of the growth media constituents on optical density resulted in different decay rates, leading to differences in the results for activity. The results obtained with the standardized method using lyophilised cells showed a covariance of 6.9%.

5.3.1 MIC and Growth Curve

The Minimal Inhibitory Concentration of lysozyme against *L. brevis* was 50 mg.L⁻¹. The observation of the test tubes for more than 24h showed that the inhibition previously observed was transitory and that after 48h *L. brevis* grew in the tubes containing lysozyme in concentrations up to 100 mg.L⁻¹.

Similarly, MAKKI and DURANCE (1996) who studied the effect of lysozyme in a *L. brevis* B-12 strain, observed that the enzyme could delay the growth culture for 9 days, but did not show a permanent inhibition of *L. brevis*.

Figure 5.1 shows the time necessary to obtain a 10^7 CFU/mL of *L. brevis* in presence of lysozyme (0, 25, 50, 75 and 100 mg.L⁻¹).

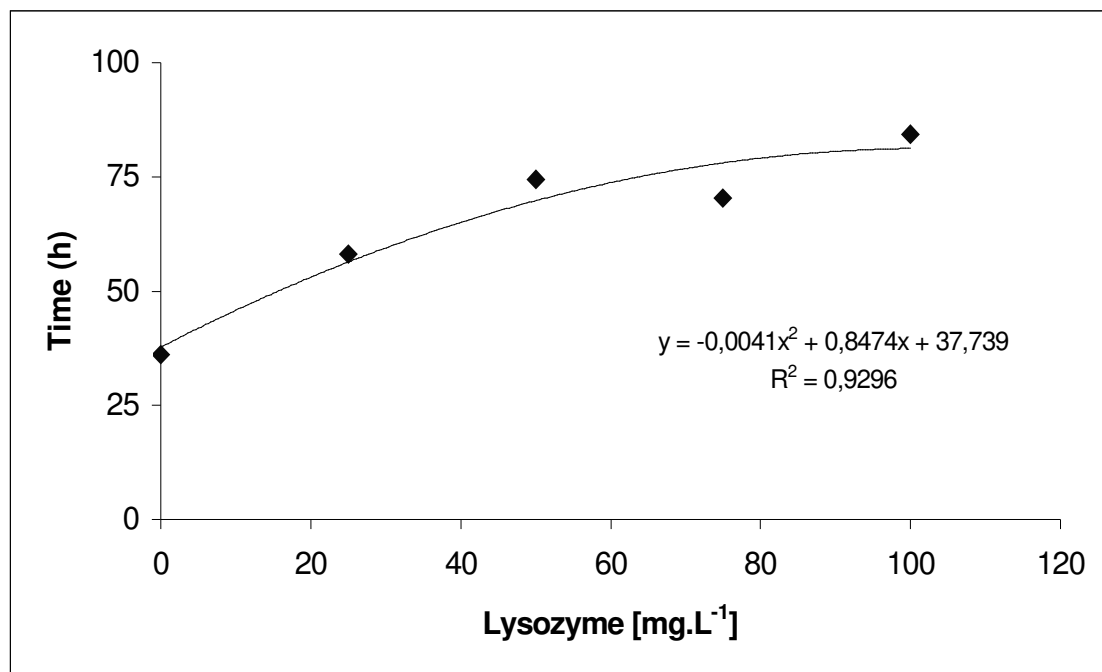


Figure 5.1 - Time (h) necessary to obtain a *L. brevis* count of 10^7 CFU.mL⁻¹ versus lysozyme concentration

The results obtained showed that the initial count of *L. brevis* of 10^3 CFU.mL⁻¹ resulted in long lag phases. This could be observed even in the culture without addition of lysozyme that resulted in a 36h period.

The addition of lysozyme was able to cause a growth delay in the culture, as previously observed in the MIC test. Similarly, it was possible to observe that the growth delay caused by lysozyme is clearly more concentration dependent in the range from 25 to 50 mg.L⁻¹ than at higher enzyme concentrations. Above 50 mg.L⁻¹ lysozyme action is less concentration dependent indicating a possible saturation of its antimicrobial activity.

Within this assay it was not possible to evaluate if the phenomenon observed was caused by the increase in the lag phase time or by the reduction of growth rates, due to the lack of sensibility of the spectrophotometric method.

Nevertheless, FRANCHI *et al.* (2003) studied the effect of lysozyme on *Lactobacilli* cultures and observed that the effect on the exponential phase was not significant, indicating that all the effects observed by lysozyme action occurred due to lag phase extension.

In order to evaluate the lysozyme antimicrobial action an initial load of *L. brevis* of 10^6 CFU.mL⁻¹ was exposed to 50 mg.L⁻¹ and 100 mg.L⁻¹ for a period of 5 hours (Figure 5.2). The results showed that the major action of the enzyme occurred in the first 2 hours of contact with an average reduction of about 0.73 log (MIC concentration) and 0.9 log cycles for 50 mg.L⁻¹ and 100 mg.L⁻¹, respectively. Between 2 and 4h of contact, the reduction observed was of approximately 0.35 log cycles. This suggests that the lysozyme action was a function of the contact time and, after a determined period, the culture lost its susceptibility to lysozyme.

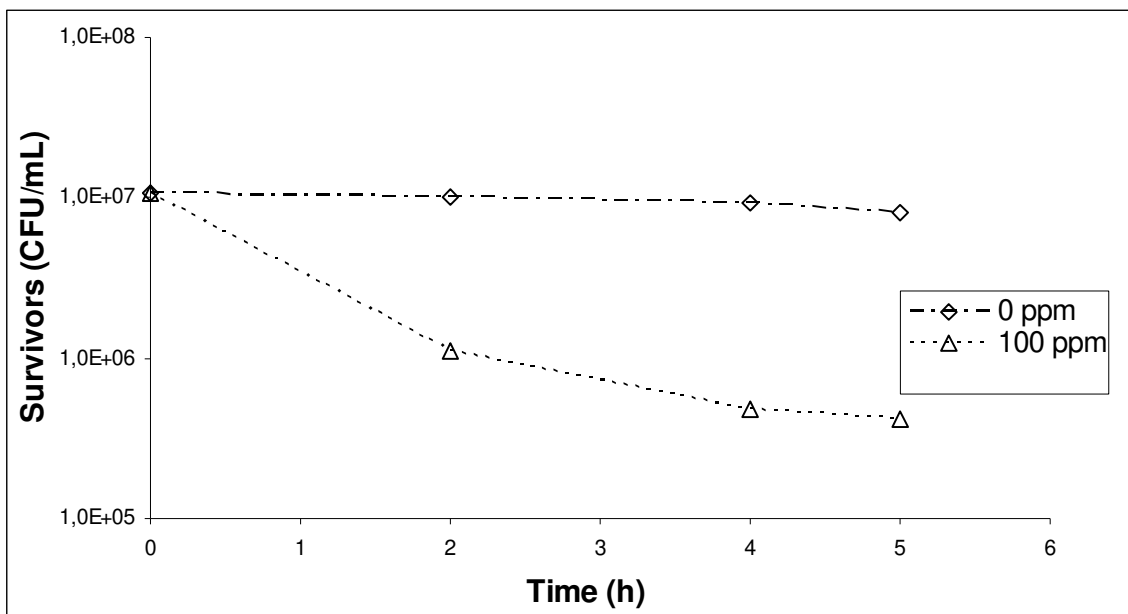


Figure 5.2 – Antimicrobial effect of 100 mg.L⁻¹ of lysozyme on a *L. brevis* cell suspension.

As the cell recovery was performed immediately after the treatment in a rich growth media it lower counts would be expected in real food systems since the degree and extension of cell injury was not taken in account.

The determination of the effect of contact time of lysozyme against bacteria was previously performed by IBRAHIN *et al.* (1996b). The authors were able to reduce 2 logarithmic cycles in the initial count of a *Staphylococcus aureus* suspension of $5,5 \times 10^5$ CFU.mL⁻¹ in 1h of contact with 50 mg.L⁻¹ of lysozyme. POPPER and KNORR (1990) showed that the addition of 3 mg.L⁻¹ caused almost 1 cycle logarithmic reduction in the initial count of *Streptococcus lactis*.

The influence of the storage temperature in the subsequent development of the *L. brevis* culture, after the above described lysozyme treatment, resulted in an unaltered count for seven days without lysozyme. With the addition of 50 and 100 mg.L⁻¹ of lysozyme 1.5 logarithmic cycles of decay were observed at 8°C and 25°C, showing no differences between the temperatures.

After 24h of contact, a variation in the suspension count of 0.3 log cycles was observed. The culture maintained the counts during the assay, with a difference of less than 0.5 logarithmic cycles at the different concentrations of lysozyme. Therefore, it is possible to conclude that lysozyme was effective in the *L. brevis* count reduction only in the first hours of contact; hereafter the enzyme did not show activity against the microorganism suspension.

5.3.2 High pressure homogenisation treatment of lysozyme

The results for the lysozyme enzymatic activity after treatment in the homogenizer are shown in Figure 5.3.

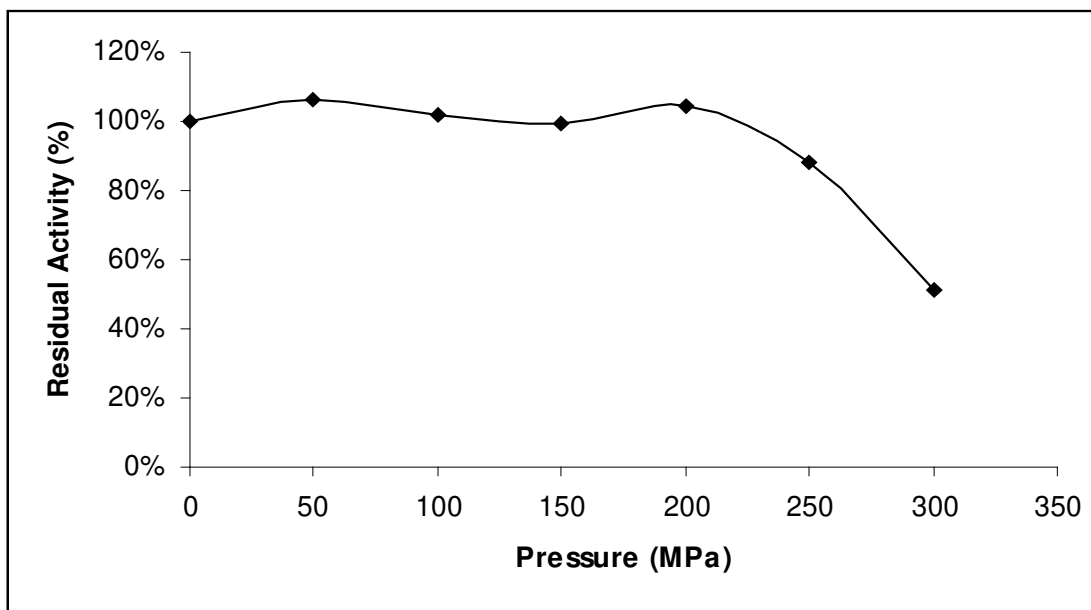


Figure 5.3 - Muramidase activity of lysozyme after high pressure treatment

The results showed that the lysozyme muramidase activity did not change at pressures below 200 MPa. It was observed that at pressures of 250 MPa and 300 MPa the activity reduction was of about 12 and 50%, respectively. An equivalent activity reduction to that observed at 300 MPa (50%) was reported by IBRAHIM (1998) when heating a solution of lysozyme at 80°C for 20 minutes at pH 6.0.

As proposed by IBRAHIM (1998) and other authors (MASSCHALK *et al.*, 2001; DÜRING *et al.*, 1999), the activity reduction did not indicate antimicrobial activity decay. Therefore, it was necessary to measure the antimicrobial effect of treated lysozyme to evaluate the consequences of the homogenisation treatment.

The inhibitory effect, determined for the *L. brevis* culture by the measurement of the lag phase time and the growth rate, was determined: the lag

phase did not differ significantly and was of 15h; the growth rate values at 21h and the deviations are shown in Table 5.1.

Table 5.1 - Values of μ_{21h}

Sample treated with lysozyme processed at:	Values of μ_{21h} (UA.h ⁻¹)	
	Mean	Deviation
0 MPa	0.059	0.003
150 MPa	0.061	0.003
300 MPa	0.061	0.000
Without lysozyme	0.089	0.003

A significant difference was observed according to ANOVA and a difference test was performed. The results of the Tukey difference test are shown in the Table 5.2.

Table 5.2 - Average values and significance (p) for the Tuckey mean test for μ_{21h}

	0 MPa	150 MPa	300 MPa	Without Lysozyme
Average (UA.h ⁻¹)	0.059	0.061	0.061	0.089
0 MPa	-	0.840	0.772	0.001
150 MPa	0.840	-	0.999	0.002
300 MPa	0.772	0.999	-	0.002
Without Lysozyme	0.001	0.002	0.002	-

Values in bold type showed significance at 5%

The Tukey test results showed a difference at a significance level of 5% in the values for μ_{21h} between samples with lysozyme and the control, though no difference was observed between the treated and untreated lysozyme activity.

These results indicated that despite the fact that the DHP caused a loss of enzymatic activity (reduction of 50% of the original activity after treatment at 300 MPa) an antimicrobial activity loss was not achieved. In a study published by

DÜRING (1999) the author tested the antimicrobial activity of native lysozyme, partially heat denatured lysozyme and a synthetic peptide with no muramidase activity, against an *Escherichia coli* strain. No correlation between antimicrobial and enzymatic activity was observed since the three forms showed the same antimicrobial activity.

In conclusion, the molecular conformation change promoted by the dynamic high pressure treatment on lysozyme was measurable by the consequent enzymatic activity loss, but did not exert a significant loss of antimicrobial activity.

5.3.3 Effects of dynamic high pressure on a *L. brevis* suspension

The results obtained in the test are shown in Figure 5.4.

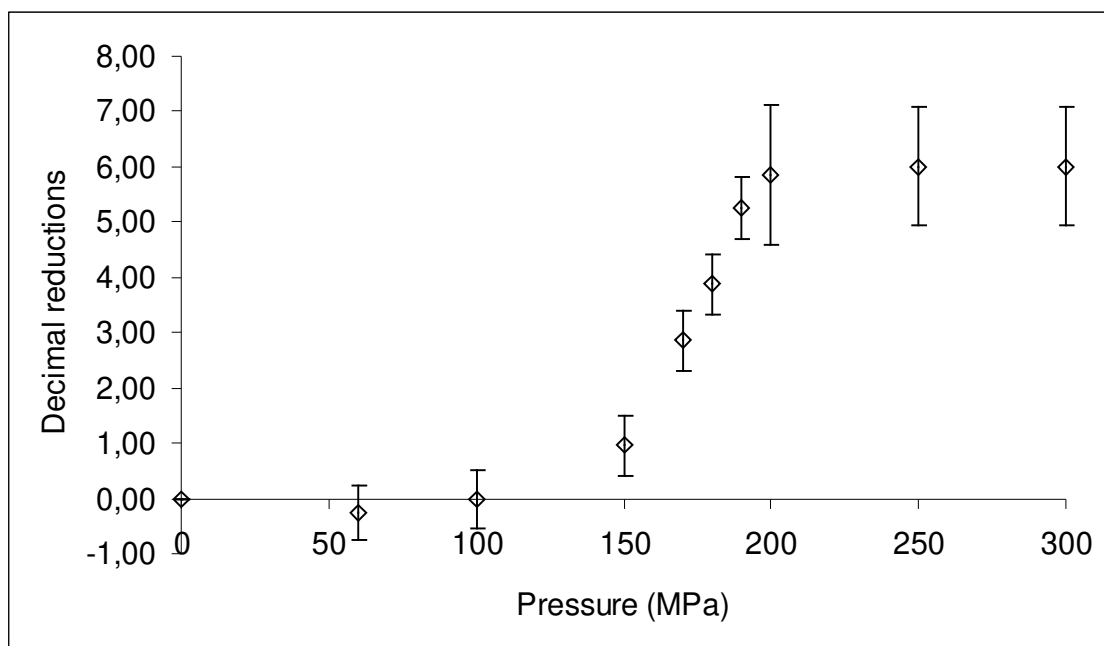


Figure 5.4 - *L. brevis* reduction curves caused by dynamic high pressure (DHP) treatment – values at 200 MPa and over are total destruction of the populations and deviation bars taking to account the initial loads.

The results showed that the effect of the pressure of 100 MPa caused less than 1 log cycle of reduction. A reduction of approximately 1 log cycle was

observed at 150 MPa. The reductions obtained using pressures above 200 MPa showed a complete destruction of the initial cell count (4.00×10^7 UFC.mL⁻¹).

The test results showed 150, 160 and 170 MPa as sublethal treatment conditions for the *L. brevis* suspension (10^6 CFU.mL⁻¹), with 1.4, 2 and 4 log cycles reduction, respectively. At 180 MPa a total destruction of the initial suspension (10^6 CFU.mL⁻¹) was observed.

It was observed that between 60 and 300 MPa the inactivation of the *L. brevis* suspension was not linear. Conversely, in the interval from 150-180 MPa, the adjustment of a log-linear curve was possible, with a R² of 0.944. The adjusted curve resulted in a D_p value of 5.5 MPa for *L. brevis* in the buffer system.

From these results it was possible to observe that an increase in pressure in the expansion valve caused an exponential increase in cell inactivation. POPPER and KNORR (1990) attributed cell death to sudden decompression with effects of torsion, wave-shocks of cavitation and bubble implosion.

5.3.4 Combined treatment of the *L. brevis* suspension and storage cell count

The main objective of this assay was to evaluate the action of lysozyme as a antimicrobial agent and dynamic high pressure treatment as a form of cold pasteurization, as hurdle processes for a suspension of *L. brevis* in a model system. The results obtained are shown in Figure 5.5.

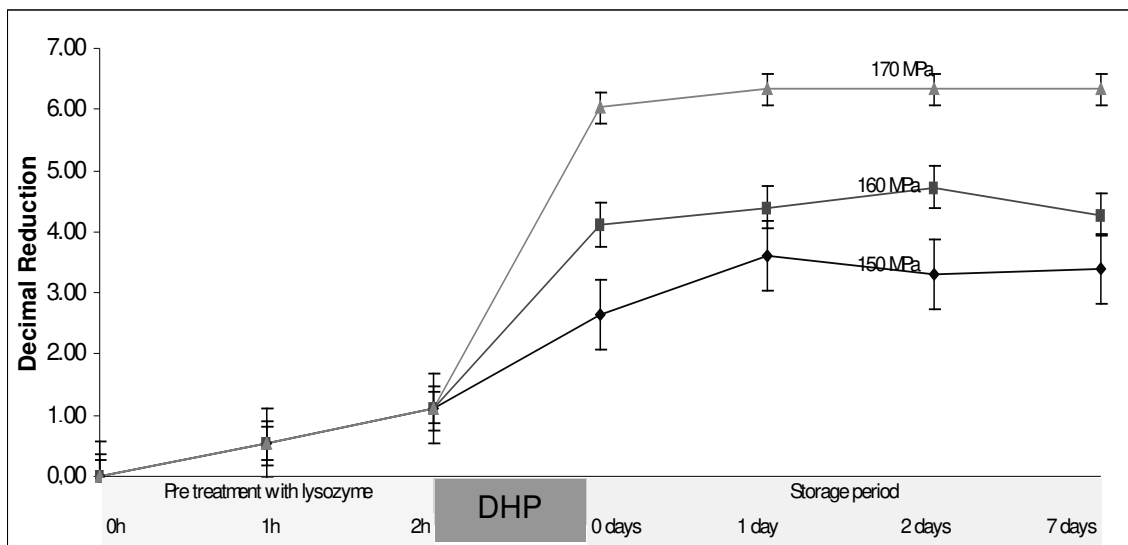


Figure 5.5 - Hurdle Test: combination of lysozyme pre-treatment and dynamic ultra high pressure treatment against *L. brevis* in a pH 6.0 buffer system.

The results showed that a pre-treatment with 50 mg.L^{-1} of lysozyme caused a reduction of 1.12 log cycles in 2h, which is compatible with the results previously obtained. The DHP treatment caused a reduction of 1.5, 3 and 5 log cycles at 150, 160 and 170 MPa, respectively. The reduction observed at 160 and 170 MPa increased by at least 1 log cycle after the pre treatment, as compared to the results obtained with no previous lysozyme treatment.

These results indicate that in this hurdle process, apart from the additive effects due to the isolated actions of lysozyme and DHP, a synergistic effect associated with the increase in the high pressure effect due to pre treatment with lysozyme, was observed. PROCTOR (1988) observed the synergistic effect as a consequence of the mode of action of the lysozyme, consisting of a partial lysis of the microorganism cell wall, decreasing the rupture threshold to the pressure variation at the expansion valve.

The storage study showed that despite the suspension being in contact with treated lysozyme, the enzyme had no antimicrobial action against the

L. brevis and the count of the suspension was stable during the 7 days of the storage test, independent of the pressure to which the sample was submitted.

POPPER and KNORR (1990) performed a similar study, using 1 and 3 mg.L⁻¹ of lysozyme and pressures between 20 and 140 MPa against *Streptococcus lactis*. The results obtained showed no synergistic action but an additive effect was observed, with an almost 1 log cycle reduction caused by a 1 hour pre treatment.

On the other hand, MASSCHALK *et al.* (2001) showed synergism between the treatment at high hydrostatic pressure (220 and 300 MPa) and that with partially denatured lysozyme (10 to 100 mg.L⁻¹). The results showed an increase in the destruction of *Pseudomonas fluorescens* of 2.5 decimal reductions in the presence of 100 mg.L⁻¹ of lysozyme and treatment at 155 MPa.

5.4 CONCLUSION

The MIC of lysozyme against *Lactobacillus brevis* was 50 mg.L⁻¹, although this inhibition showed a transitory characteristic. A growth curve was obtained that showed that lysozyme was able to delay the growth of *L. brevis* by 1.5 days at the MIC concentration, and that an increase in the lysozyme concentration did not result in a proportional increase in the antimicrobial effect. It was observed that lysozyme added at concentration of 100 mg.L⁻¹ in a *L. brevis* suspension (10⁶ CFU.mL⁻¹) could reduce 1.26 log cycles in a period of 4 hours. Thus it was possible to conclude that lysozyme can be useful in the control of food spoilage by *L. brevis* and to reduce *L. brevis* contamination.

The treatment of lysozyme by DHP up to 250 MPa results in an enzymatic activity loss; with a treatment of 300MPa the residual activity was 50%. The antimicrobial activity was not affected by the DHP treatment showing no correlation between activities at this degree of denaturation.

The *L. brevis* suspension treated by DHP showed that pressures below 100 MPa had no significant reduction effect on the microorganism. Pressures between

150 and 170 MPa caused a sublethal effect on the suspension, with reductions of about 1.0 log cycle at 150MPa and a D_p of 5.5 MPa. Pressures up to 180 MPa caused a total reduction of the microbial suspension (10^6 CFU.mL⁻¹). These results suggest that the DHP is efficient against *L. brevis*.

Using this hurdle combination study it was possible to conclude that the combination of lysozyme and DHP had an additive effect on the *L. brevis* suspension. Moreover a synergistic effect was observed at pressures of 160 and 170 MPa with an increase of about 1.0 log cycle after pre-treatment with 50 mg.L⁻¹ of lysozyme.

5.5 REFERENCES

ASCHEE, P.V. Microbieel Bercerf van Bier. **Cerevisia**. 17 (3) 45-47,1992.

AKASAKA, K.; TEZUKA, T.; YAMADA, H. Pressure-induced changes in the folded structure of Lysozyme. **Journal Mol. Biology**. 271 671-678, 1997.

CHUNG, WILFRED; HANCOCK, ROBERT E.W. Action of lysozyme and nisin mixtures against lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**. Volume: 60(1) 25-32, 2000.

DÜRING, K.; PORSCHE, P.; MAHN, A.; BRINKMANN, O. ; GIEFFERS, W. The non-enzymatic microbicidal activity of lysozyme. **Federation of European Microbiological Societies- Microbiology Letters**. 449 93-100,1999.

DEASCHEL, M. A; BRUSLIND, L.; CLAWSON, J. Application of the enzyme lysozyme in brewing. **Technical Quarterly**. Volume: 36 (2) 219-222, 1999.

FRANCHI, M.A.; SERRA, G.E; CRISTIANINI, M. The use of biopreservatives in the control of bacterial contaminants of sugarcane alcohol fermentation. **Journal of Food Science**. Vol 68(7) 2310-2315, 2003.

GILL, A.O.; HOLLEY, R.A. Surface application of lysozyme, nisin, and EDTA to inhibit spoilage and pathogenic bacteria on ham and bologna. **Journal Of Food Protection** 63 (10): 1338-1346, 2000.

HOLLEROVA, I e KIBIZNIAKOVA,P. Monitoring Gram positive bacterial contamination in czech breweries. **Journal of the Institute of Brewing**. 107 355-358. 2001.

IBRAHIM, H.R. On the novel catalytically-independent antimicrobial function of hen-white lysozyme: a conformation-dependent activity. **Nahrung Food**. 3-4 187-193, 1998.

IBRAHIM, H.R.; HIGASHIGUCHI, S.; SUGIMOTO, Y.; AOKI, T. Role of divalent cations in the novel bactericidal activity of the partially unfolded lysozyme. **Journal-of-agricultural-and-food-chemistry (USA)**. 45(1) 89-94,1997.

IBRAHIM,H. R.; MATSUZAKI, T.; AOKI, T. Genetic evidence that antibacterial activity of lysozyme is independent of its catalytic function. **Federation of European Biochemical Societies**. 506 27-32, 2001.

IBRAHIM, H; HIGASHIGUSHI, S; JUNECA, L.R; KIM, M; YAMAMOTO, T. A structural phase of heat-denatured lysozyme with novel antimicrobial action. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 44 1416-1423, 1996a.

IBRAHIM, H. R.;HIGASHIGUCHI, S.; SUGIMOTO, Y.; AOKI, T. Antimicrobial synergism of partially-denatured lysozyme with glycine: effects of sucrose and sodium chloride. **Food Research International**. 29(8) 771-777, 1996b.

KNORR, D. Effects of High-Hydrostatic-Pressure Process on Food Safety and quality. **Food Tecnology**. 156 – 161, 1993.

LANCIOTTI, R; GARDINI, F; SINIGAGLIA, M; GUERZONI, M.E. Effects of growth conditions on the resistance and spoilage species to high pressure homogenization. **Letters in Applied Microbiology**. 22 165-168,1996.

LANCIOTTI, R; SINIGAGLIA, M; ANGELINI, P; GUERZONI, M.E. Effects of homogenization pressure on the survival and growth of some spoilage and pathogenic micro-organisms. **Letters in Applied Microbiology**. 18 319-322,1994.

LOSSO, J.N.; NAKAI, S.; CHARTER, E.A. Lysozyme. Naidu, A. S. **Natural Food Antimicrobial Systems**. 1st ed., Boca Raton: CRC press, 2000, Ch 6, 185-210.

LUCK, E.; JAGER, M. Antimicrobial Food Additives. **Characteristics, Uses and Effects**. Ed. Springer, 2nd. Ed., Berlim, 1997.

MAKKI, F.; DURANCE, T.D. Thermal inactivation of lysozyme as influenced by pH, sucrose and sodium chloride and inactivation and preservative effects in beer. **Food Research International**. 29 (7) 635-645,1996.

MASSCHALCK, B; GARCÍA-GRAELLS, C; HAVER, E.V; MICRIELS, C.W. Inactivation of high pressure resistant *Escherichia coli* by lysozyme and nisin under high pressure. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**. 1 39-47, 2000.

MASSCHALCK, B.; HOUDT, R.V.; HAVER,E.G.R.V.;MICHIELS, C.W. Inactivation of Gram-negative bacteria by lysozyme, denatured lysozyme and lysozyme-derived peptides under high hydrostatic pressure. **Applied and Environmental Microbiology**. 67(1) 339 – 344. 2001.

MESSENS, W; DE VUYST L. Inhibitory substances produced by Lactobacilli isolated from sourdoughs—a review. **International Journal of Food Microbiology** 72 (2002) 31– 43

NATTRESS, F.M; YOST,C.K; BAKER,L.P. Evaluation of the ability of lysozyme and nisin to control meat spoilage bacteria. **International Journal of Food Microbiology**. 70 111-119. 2001.

POPPER, L; KNORR, D. Applications of high-pressure homogenization for food preservation. **Food Technology**. 84-89, 1990.

PRIEST, F.G.; CAMPBELL,I. Brewing Microbiology. **Chapman &Hall Food Science Book**. 134-142, 1999.

PROCTOR, V.A. The chemistry of lysozyme and it's use as a food preservative and a pharmaceutical. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. 26 359-395. 1988.

SAIKUMAR MV, GLATZ CE, LARSON MA Crystallization of lysozyme at high-pressures. **Journal of Crystal Growth** 151 (1-2): 173-179,1995.

WUYTACK, E.Y.; DIELS, A.M.J.; MICHIELS, C.W. Bacterial inactivation by high-pressure homogenisation and high hydrostatic pressure. **International Journal of Food Microbiology**. 77 (3): 205-212, 2002.

CAPÍTULO 6 - ESTABILIZAÇÃO DE CERVEJA TIPO PILSEN POR ANTIMICROBIANOS BIOPROTETORES E ESTUDO DE TRATAMENTO COMBINADO COM ALTA PRESSÃO DINÂMICA.

6.1 INTRODUÇÃO

A cerveja é um meio pouco favorável para o desenvolvimento de microrganismos patogênicos, esporulados, produção de toxinas ou mesmo o crescimento de deteriorantes. A fermentação tem sido um método eficiente de conservação de alimentos e conseqüentemente a cerveja historicamente foi reconhecida como um alimento seguro. As barreiras ao crescimento de microrganismos em cervejas são: o teor alcoólico que pode variar de 0,5 a 10 % em massa, mas que nas receitas mais difundidas é de aproximadamente 5% ; o pH, em torno de 4,0 (cerveja pilsen) e acidez resultante da adição (ácido láctico) e produção de ácidos orgânicos; a adição de compostos de lúpulo (humulona, lupulona, cohumulona ácido humílico); a presença de dióxido de carbono (aproximadamente 0,5%) e baixas tensões de oxigênio (abaixo de 0,1 mg.L⁻¹) (SAKAMOTO e KONINGS, 2003).

Assim, os problemas microbiológicos das cervejarias referem-se a alguns microrganismos geralmente deteriorantes: *Lactobacillus* produzem acidez láctica, gomas e aromas indesejáveis (produção de diacetil pelo *L. diacetylactis*, por exemplo), *Pediococcus*, formam ácido láctico a partir de glicose, bactérias acéticas são capazes de oxidar o etanol produzindo ácido acético, aromas indesejáveis e “rope” (filamentos de polissacarídeos). Outros microrganismos deteriorantes são: *Acetobacter*, *Acetomonas*, *Enterobacteriaceae* (produzem aromas adocicados), *Klebsiella*, *Pectinatus* (promovem turvação e formação de ácido acético, propiônico e H₂S), *Zymomonas* (formam acetaldeído e H₂S) e leveduras selvagens que são microrganismos dos gêneros *Saccharomyces*, *Torulopsis*, *Pichia*, *Candida*, *Hansenula* e *Rhodotorula* (ASSCHE, 1992; BRIGGS *et al.*, 1994). Alguns outros microrganismos contaminantes têm sido identificados como emergentes como *Megasphaera cerevisiae* presente em cervejas de baixo teor de

álcool, *Pectinatus cerevisiiphilus*, *Pectinatus frisingensis*, *Selenomonas lactificifex* (JESPERSEN e JAKOBSEN 1996; SATOKARI *et al.*, 1998).

MONTVILLE e CHEN (1998) definem biopreservação de alimentos como a utilização de bactérias lácticas (probióticos), seus metabólitos ou ambos para melhorar ou assegurar a qualidade e a segurança de alimentos que não são necessariamente fermentados.

Algumas substâncias extraídas de alimentos com propriedades antimicrobianas são consideradas bioprotetores e foram descritas pela literatura (LUCK E JAGER 1997). A lisozima de ovos e o extrato de aroma de lúpulo, utilizado na fabricação de cervejas, são exemplos dessa classe de substâncias bioprotetoras.

O tratamento à alta pressão por homogeneização ou alta pressão dinâmica é capaz de destruir microrganismos pela repentina perda de pressão que ocorre na válvula de expansão, pela torção e por estresse causado pelo choque das ondas de cavitação resultando na implosão de bolhas (POPPER e KNORR, 1990)

WUYTACK *et al.* (2002) observou que, segundo os mecanismos de ação envolvidos no sistema de alta pressão dinâmico, a destruição ora ocorria de maneira total e irreversível, ora não havia o efeito da destruição conforme as condições praticadas, e que não se pôde observar injúria. Assim, a combinação de barreiras como teor de cloreto de sódio e pH foram pouco efetivas na destruição por alta pressão dinâmica, mas um agente que diminuísse a resistência física das paredes microbianas tal como a lisozima poderia exibir sinergismo na destruição.

Lisozima é uma enzima extraída da clara de ovos brancos, correspondendo a 0,5% de peso da albumina (PROCTOR,1988), que apresenta atividade de N-acetilhexosaminidase e hidrolisa a parede celular de bactérias nas ligações β (1 \rightarrow 4)- N- acetil muramida e N-Acetil-glicosamina do peptídoglicano da parede da célula, provocando morte celular.

Nisina é uma bacteriocina obtida por fermentação, na fase de crescimento exponencial, de *Lactococcus lactis*, não tóxica, termoestável, eficiente contra bactérias gram positivas, e quando associada ao EDTA, eficiente contra bactérias Gram negativas (CHAN *et al.*, 1996).

O espectro de ação da nisina é relativamente estreito sendo ativa contra bactérias Gram positivas, como bactérias lácticas, clostridium, bacilos, estreptococos e em combinação com quelantes contra algumas bactérias gram negativas, mas ineficaz contra fungos e leveduras (LÜCK e JAGER, 1997). GARRIGA *et al.* (2002) reportou que *Lactobacillus* produtor de limosidade em carnes pode ser mantido abaixo do limiar de detecção do teste ($< 10^2$ CFU.mL⁻¹) utilizando um tratamento com nisina (25.600 UA.mL⁻¹) e alta pressão hidrostática (400 MPa por 10 minutos a 17°C).

O presente estudo visa avaliar a eficácia da utilização de bioprotetores para o controle de contaminações microbiológicas em cervejas, utilizando nisina Z, um lantibiótico produzido por *Lactococcus lactis*, extrato de aroma lúpulo e lisozima de ovos, além de um extrato fermentado contendo bacteriocina produzida por *Lactobacillus sake* (sakacina). Uma vez selecionados os antimicrobianos eficazes, o trabalho visou avaliar a combinação de bioprotetores com o tratamento por alta pressão dinâmica para a estabilização microbiológica de cerveja.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 Matéria Prima

Cerveja engarrafada de marca comercial (pasteurizada) com pH 4,5, 2,5°Brix e 4,7°GL foi adquirida para os testes de estabilização microbiológica e enzimática.

6.2.2 Microrganismos

Foram obtidos de coleção de culturas (Coleção de Culturas Tropical – Fundação André Tosselo, Campinas-SP) microrganismos descritos na literatura

como comumente contaminantes de cerveja: *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus delbrueckii* e *Acetobacter aceti*, além de *Listeria innocua* para testes com sakacina. Os microrganismos *Pediococcus sp.*, *Schizosaccharomyces ludwigii* e *Saccharomyces diastaticus*, foram obtidos da coleção de culturas particular da cervejaria AmBev, unidade de Jacareí – SP. Por fim, *Lactobacillus sake* 2a foi cedido pelo Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, São Paulo – SP.

6.2.3 Meios de Cultura

Foi utilizado, para os ensaios com bactérias lácticas, o meio MRS - De Man, Rogosa, Sharpe (Oxoid), caldo ou agar. Para o crescimento de leveduras o meio utilizado foi o PDA; para crescimento em meio líquido foi utilizado caldo de extrato de malte (15 g.L^{-1} – marca Oxoid)), enriquecido com 4% p/v de extrato de levedura (Oxoid). Para as bactérias acéticas foi utilizado MRS (Oxoid) ágar ou caldo adicionado de 2% de etanol P.A. (Merck). Para *L. innocua*, foi utilizado meio TSB (triptone soy broth) para repiques e TSA (triptone soy agar) para ensaios em placas de Petri.

Para a manutenção de culturas bacterianas foi utilizado o meio Litmus Milk, leite tornassolado (Difco) exceto *A. aceti* que foi repicado em rampas de MRS acrescido de 2% de etanol. As leveduras foram mantidas em rampas de meio PDA (potato dextrose agar – Oxoid) cobertas com óleo mineral estéril para evitar ressecamento.

6.2.4 Bioprotetores

Nisina e lisozima foram obtidas na forma das formulações comerciais Novasin e Novagard (então Rhodia S.A.S.), respectivamente. Foi utilizado um bioprotetor a base de um extrato de aroma de lúpulo, constituído de β -ácidos, obtido junto a Rhodia S.A.S.

6.2.5 Produção de sakacina

A produção de sakacina por *L. sake* 2a foi realizada conforme descrito por LISERE *et al.* (2002) apresentado na Tabela 6.1.

Tabela 6.1 – Meio de produção de sakacina (LISERE *et al.*, 2002)

Componente da fórmula	Concentração (g.L⁻¹)
Peptona	10,000
Extrato de carne	8,000
Extrato de levedura	4,000
Glicose	5,000
Tween 80	1,000
Fosfato monobásico de potássio	2,000
Acetato de sódio anidro	3,000
Citrato de amônio	2,000
Sulfato de magnésio	0,200
Sulfato de manganês	0,038
Água destilada	<i>q.s</i>

Foi utilizado meio 0,5% de glicose com o intuito de minimizar a redução do pH e resultante inibição da produção do bioprotetor. O pH foi acertado com hidróxido de sódio 0,1N até pH 6,0 para que baixos valores de pH não inibissem o microrganismo teste (*Listeria innocua*) resultando em um falso positivo. A esterilização do caldo contendo a bacteriocina foi realizada por microfiltração em filtro de 0,45 μ .

Foi utilizado o método descrito por ROGERS e MONTVILLE (1991) para testar a produção do bioprotetor pela linhagem de *L. sake* 2a, utilizando-se o *Listeria innocua* como indicador da atividade. O indicador foi inoculado em superfície de placas de MRS agar contendo 20 mL do meio, e em seguida foram

cortados poços de 6,8 mm de diâmetro onde foram pipetados 30 µL do bioprotetor previamente produzido. Os halos de inibição foram medidos, expressos em milímetros de diâmetro.

6.2.6 Determinação da eficácia de bacteriocinas sobre os contaminantes de cerveja e determinação de MIC (concentração mínima inibitória)

A mínima concentração de inibição do crescimento dos contaminantes por um determinado bioprotetor (valor de MIC) foi expresso em unidades de concentração do bioprotetor no meio. O método foi realizado para todos os bioprotetores de maneira a quantificar a susceptibilidade e selecionar os bioprotetores mais eficazes. Os ensaios foram realizados em duplicata segundo o método de MIC em meio líquido descrito por STUPPIELLO (1993) para todos os microrganismos exceto *A. aceti*, para qual utilizou-se o método de MIC em meio sólido.

O método de MIC foi realizado utilizando-se o meio mais apropriado para o crescimento do microrganismo em teste, e em meio líquido utilizou-se uma série de tubos com diluições dos antimicrobianos em teste; enquanto que para o MIC em meio sólido, utilizou-se o método em que o antimicrobiano é adicionado à placas de Petri em poços de 30 µL, perfurados no meio de cultura apropriado inoculado previamente em superfície (100µL de uma cultura de 24 horas em Erlenmeyer, incubado em shaker 20 rpm). As leituras para ambos os métodos foram realizadas após 24 horas de incubação na temperatura adequada ao respectivo microrganismo, ou até que houvesse o crescimento no tubo ou placa sem a adição de antimicrobianos (branco). Foi anotada a primeira concentração da série de poços ou tubos em que foi observada formação de halo de inibição ou ausência de turvação do meio, para o MIC sólido e líquido, respectivamente. Foi observada também a permanência da inibição medindo-se o MIC após 48 h de incubação.

6.2.7 Determinação da atividade residual de nisina e lisozima

Nisina e lisozima foram obtidas na forma das formulações comerciais Novasin e Novagard (então Rhodia S.A.S.), respectivamente.

Nisina foi tratada por alta pressão dinâmica em solução tampão na concentração de 1 g.L^{-1} nas pressões de 100, 200 e 300 MPa e sua atividade residual avaliada em relação a nisina não tratada. A atividade residual percentual de nisina foi determinada em tampão fosfato, pH 6,0 pelo método modificado de ROGERS e MONTVILLE e CHEN (1991), em que halos de inibição do crescimento em placas de petri, em meio MRS de *L. sake* foram medidos a volta de poços em que foram aplicadas as amostras das soluções de nisina tratadas. Com os resultados foi determinada a razão entre a atividade medida da solução tratada e da solução não submetida ao tratamento.

A atividade de muramidase de lisozima não tratada e de lisozima processada a ultra alta pressão dinâmica (100, 150, 200, 250 e 300 MPa) foi determinada em tampão fosfato pH 6,0 utilizando-se o método descrito por Ibrahim (1997), obtendo-se então o percentual de atividade restante após cada tratamento nas referidas pressões.

6.2.8 Tratamento por ultra alta pressão dinâmica

Foi utilizado para os ensaios o equipamento de ultra-alta pressão, tipo homogeneizador UAP (Stansted Fluid Power Ltd.), com capacidade para tratar 260 mL/minuto de amostra em regime contínuo. A pressão máxima de trabalho do equipamento é de 340 MPa.

O sistema consiste em um conjunto de duas bombas intensificadoras de pressão, constituídas de dois pistões hidráulicos, válvulas de entrada de produto eletropneumáticas, válvulas de retenção, sincronizadas de maneira a bombear o produto continuamente e manter a pressão constante (compensando a compressibilidade do fluido) na tubulação até a válvula de homogeneização

primária. Esta válvula é dotada de um sistema de agulha e sede que se contrapõem sob o efeito de um sistema hidráulico que regula indiretamente a pressão do produto, monitorada em um manômetro. As temperaturas de entrada, após a compressão, após a válvula de homogeneização e após o resfriamento são monitoradas por termopares.

O equipamento foi acoplado a um trocador de calor por serpentina na saída da válvula de homogeneização para resfriar a amostra, de modo a minimizar os efeitos de morte térmica sobre o microrganismo ou denaturação térmica dos bioprotetores. O sistema foi sanitizado com álcool etílico a 70% incluindo os tanques de amostra e produto e mangueiras de conexão para garantir a assepsia dos testes. A manipulação e tomada das amostras foram realizadas em capela de fluxo laminar horizontal acoplada ao sistema.

6.2.9 Tratamento combinado por alta pressão e lisozima

Os ensaios com tratamentos combinados foram realizados utilizando-se lisozima na concentração de 50 mg.L^{-1} , com um tempo de contato de uma hora, e tratamento por ultra alta pressão dinâmica. Escolheu-se realizar um pré-tratamento com lisozima, pois testes preliminares indicaram que a ação da lisozima sobre *L. brevis* somente poderia ser observada a partir de uma hora de contato, com reduções de cerca de um ciclo logarítmico, redução abaixo da qual o erro do método de plaqueamento poderia incutir em incerteza acerca de sua ação. Dessa maneira pode-se garantir uma ação concomitante dos tratamentos.

Foram preparados inóculos de *L. brevis* com contagens da ordem de 10^8 UFC/mL e adicionados na diluição de 1% (v/v) a cerveja contendo 100 mg.L^{-1} de lisozima. Foram determinadas as reduções de contagens de viáveis devido a morte por pressurização e tempo de contato com lisozima a do *Lactobacillus brevis*. As contagens do microrganismo foram realizadas por plaqueamento e o resultado expresso em UFC/mL, sendo realizadas na amostra antes e depois do tempo de pré-tratamento com lisozima e após o tratamento por ultra alta pressão

dinâmica a 100 e 140 MPa, duas pressões subletais. Foram realizadas repetições para confirmação das tendências do processo.

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 6.2 estão descritos os resultados de concentração inibitória mínima obtidos para as bactérias *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Pediococcus sp.* e para as leveduras selvagens *Saccharomyces diastaticus* e *Saccharomyces ludwigii*.

Tabela 6.2 – Concentrações inibitórias mínimas de bioprotetores sobre suspensões de microrganismos contaminantes de cervejas.

Microrganismo	Nisina mg.L ⁻¹	Lisozima mg.L ⁻¹	Extrato de lúpulo mg.L ⁻¹	sakacina % de extrato v/v
<i>L. brevis</i>	3,0	50,0*	>1000	>50%
<i>Pediococcus sp.</i>	2,0	>200	>1000	-
<i>A. aceti</i> **	>100	>1000	>1000	>50%
<i>L. delbrueckii</i>	0,8	1,0	>1000	>50%
<i>S. ludwigii</i>	>200	>200	>1000	>50%
<i>S. diastaticus</i>	>200	>200	>1000	>50%

* Inibição transitória revertida após 48h de incubação.

** Para *A. aceti* utilizou-se o método MIC em meio sólido, e não foi observado halo de inibição até as respectivas concentrações.

Os resultados mostram que as leveduras selvagens não foram inibidas pelos bioprotetores utilizados nas concentrações indicadas, mostrando que estas substâncias não são eficientes no controle destes microrganismos em cervejas.

Tal observação era esperada para nisina que não apresenta ação contra bolores e leveduras.

Nisina foi capaz de inibir três linhagens de bactérias contaminantes de cervejas, exceto *A. aceti*, em concentrações abaixo de 5,0 mg.L⁻¹ mostrando-se assim um bioprotetor eficiente no controle de contaminações bacterianas de cervejas em condições de anaerobiose. O espectro de ação da nisina é reportado por CHUNG e HANCOCK (2000) como limitado contra bactérias Gram negativas. Os autores observaram inibição de todas as cepas testadas (*Brochothrix thermosphacta*, os *Lactobacillus sake* e *curvatus*, *Pediococcus acidilactici* e *Leuconostoc mesenteroides*).

Segundo HAMMOND *et al.* (1999) compostos fenólicos do extrato de lúpulo, mostraram-se eficazes na inibição de *Lactobacillus*, no entanto, a preparação comercial utilizada de extrato de lúpulo não foi capaz de inibir o crescimento de nenhuma linhagem até concentrações de até 1g.L⁻¹, demonstrando-se inadequada para o controle de contaminações de cervejas

SAKAMOTO e KONINGS (2002) descreve a resistência dos microrganismos contaminantes de cerveja, indicando que *Lactobacillus brevis* se mostrou o microrganismo mais resistente aos compostos antimicrobianos de lúpulo. O autor reportou que o microrganismo pode adquirir resistência aos compostos de lúpulo pelo aumento gradual destes agentes no meio de crescimento em seguidos repiques.

Em ensaios preliminares, *Lactobacillus brevis* foi submetido a sucessivos repiques em teores cada vez maiores de cerveja, produzindo uma cultura com características de crescimento em cerveja diferentes da cultura inicial, em que havia o declínio da cultura em até 0,3 ciclo logarítmicos por hora. Assim SAKAMOTO e KONINGS (2002) atribui a resistência dos microrganismos a sua adaptação a cerveja pela inibição do mecanismo de ação dos compostos do lúpulo, sejam eles a promoção de extravasamento celular e a inibição do

transporte ativo de aminoácidos e açúcares. A produção de moléculas de ácidos graxos de cadeias longas presentes nas membranas dos microrganismos resistentes estão segundo o autor, relacionadas com a inibição de sítios ativos de ação dos compostos de lúpulo e com a resistência ao etanol. Outros mecanismos descritos são a produção de enzimas, extrusão ativa por transporte ativo específico para estas substâncias e composição lipídica modificada da membrana citoplasmática de algumas bactérias lácticas deteriorantes, e impedem o influxo dos ativos do lúpulo nas células.

A lisozima por sua vez não foi eficaz contra os *Pedicoccus sp.* nem contra o *A. aceti*, mas mostrou-se capaz de inibir ambos os *Lactobacillus*. Dentre os *Lactobacillus* o *L.brevis* apresentou crescimento no tubo de 50 mg.L⁻¹ de lisozima, após o período de leitura de MIC (24 h) estabelecido na metodologia e apenas a adição de 100 mg.L⁻¹ de lisozima foi capaz de inibir o crescimento após 48 h. O resultado indicou uma transitoriedade na inibição do microrganismo.

Sakacina não foi capaz de inibir nenhum dos microrganismos até a adição máxima de 50% em volume do extrato produzido no meio de cultura do teste, ou quando adicionado a 100% no poço para teste com o *A. aceti*.

Foi observado em um teste preliminar para verificar a atividade do extrato de sakacina, que o mesmo foi capaz de produzir um halo de inibição de 12,5±0,7 mm de diâmetro em uma cultura de *Listeria innocua*.

Bavaricina MN, purificada de cultura de *L. sake* mostrou ação sobre paredes de *Listeria monocytogenes*, causando extravasamento do conteúdo intracelular medido por fluorescência (KAISER e MONTVILLE, 1996). (WINKOWSKI *et al.* 1993) observou que o microrganismo, inoculado a 10⁵ CFU/mL, apresentou capacidade de reduzir as contagens iniciais de *Listeria monocytogenes* (10² CFU/mL) em 10 vezes em cubos de carne com molho.

Bavaricina A produzida por *L. sake* foi capaz de inibir 11 das 25 linhagens de *Lactobacillus* testados, 9 de 10 linhagens de *Listeria*, 2 de 5 linhagens de

Pediococcus, *Enterococcus* e 5 de 15 linhagens de *Lactococcus*, mas não apresentou eficácia contra *Bacillus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* ou bactérias Gram negativas (MESSENS e DE VUYST, 2002).

HOLLEROVA e KIBIZNIAKOVA (2001) estudaram a presença de contaminantes em bebidas fermentadas que, por suas características de baixo pH, presença de dióxido de carbono e álcool etílico, tem como principais microrganismos responsáveis pela deterioração as bactérias lácticas. Os autores estudaram 63 amostras de bebidas e isolaram *L. brevis* em 40% das amostras, sendo que 50% destes deterioram a bebida em 3 semanas de vida de prateleira; desta forma, os resultados obtidos apontaram *L. brevis* como o deteriorante de maior importância em bebidas fermentadas.

Devido ao *L. brevis* ser considerado um importante microrganismo deteriorante em cervejas e apresentar maior resistência a nisina e lisozima, que o *L. delbruecki*, microrganismo alvo do processo de alta pressão dinâmica (FRANCHI *et al.*, 2004), o *L. brevis* foi selecionado para o estudo de tratamentos combinados. Assim, conforme a Tabela 6.2 as concentrações inibitórias mínimas de nisina e lisozima medidas em 24h de incubação foram de 3,0 e 50,0 mg.L⁻¹, tendo sido observado que a inibição da lisozima foi revertida após 48 horas, indicando uma inibição transitória, (até concentrações de 1,0 g.L⁻¹). MAKKI e DURANCE (1997) obtiveram resultados semelhantes em *L. brevis* B-12 tendo sido possível retardar o crescimento da cultura em nove semanas, sem no entanto obter uma inibição permanente.

Foi avaliada a ação do processamento por alta pressão dinâmica sobre as atividades de nisina e lisozima. A Figura 6.1 mostra a relação entre a atividade de nisina e a pressão a que a solução foi submetida no tratamento.

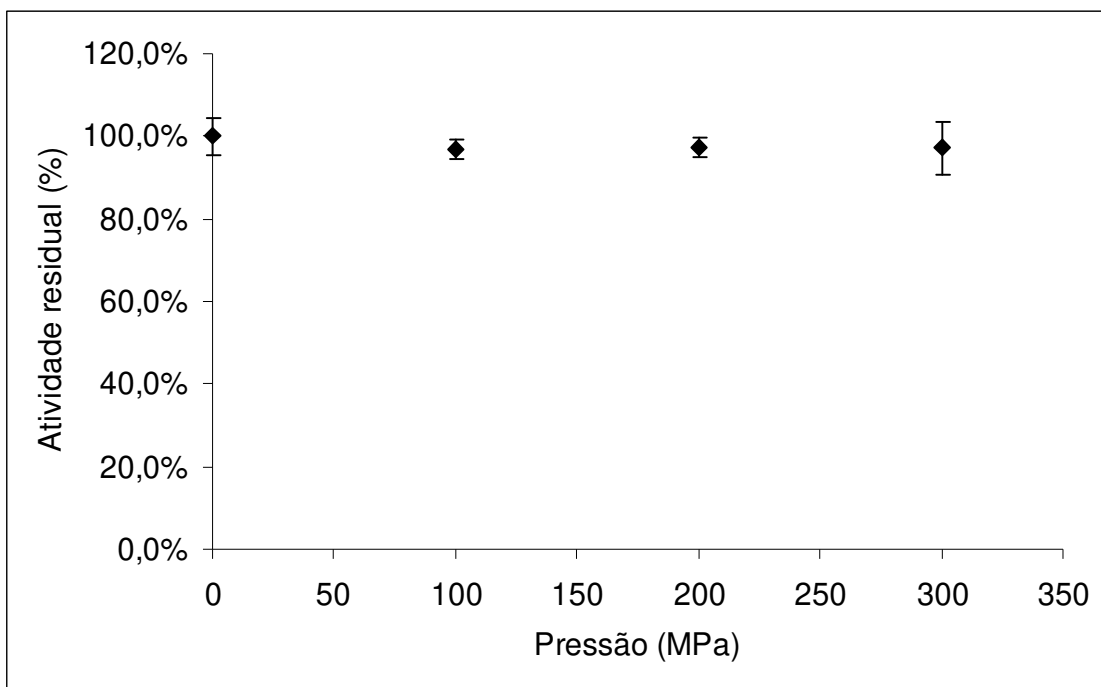


Figura 6.1 – Efeito do tratamento por alta pressão dinâmica sobre a atividade de nisina em cerveja.

Foi observado que a atividade de nisina não foi significativamente afetada pelo tratamento por alta pressão, nem mesmo a 300 MPa.

A recuperação de células viáveis de *L. brevis* da cerveja contendo nisina ($< 3,0 \text{ mg.L}^{-1}$) não foi possível, indicando que as barreiras presentes na cerveja tais como pH, escassez de nutrientes e teor de etanol (GANZLE e ULMER, 2001), em combinação com a nisina foram suficientes para impedir o crescimento do microrganismo. Não foi realizada a combinação dos métodos uma vez que mesmo a baixas concentrações a nisina, que não apresentou redução da atividade após o tratamento, não foi observado efeito transitório ou subletal, impossibilitando a medição na combinação da nisina com o tratamento por alta pressão dinâmica. Testes preliminares de tratamentos combinados entre alta pressão dinâmica a 100 MPa e nisina ($3,0 \text{ mg.L}^{-1}$) mostraram que nenhum microrganismo pôde ser recuperado dessa forma.

A estabilização de cerveja por nisina foi extensamente descrita pela literatura (OGDEN e WAITES, 1986; OGDEN e TUBB, 1985; CHIHIB *et al.* 1999) e especificamente sua ação contra *L. brevis* foi estudada por VAUGHAN *et al.* (2004).

A Figura 6.2 mostra a atividade de lisozima submetida ao tratamento por alta pressão.

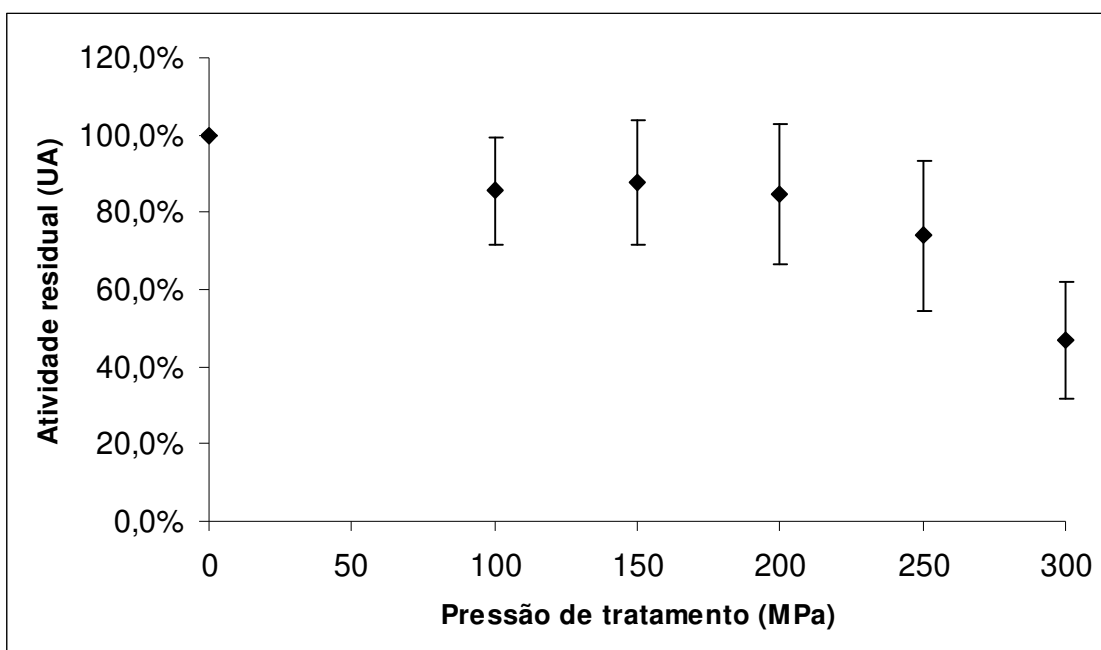


Figura 6.2 - Atividade de muramidase de lisozima tratada a alta pressão dinâmica em cerveja.

Os resultados obtidos demonstraram que a atividade de muramidase da lisozima é pouco alterada até tratamento a 200 MPa que exibiu uma redução de 14%. A 250 MPa foi obtida uma redução aproximada de 26% da atividade inicial da enzima e, a 300 MPa, foi observada uma redução aproximada de 53% da atividade inicial. A inativação em cerveja foi similar a obtida em meio tampão como mostrado na Figura 6.2.

A homogeneização por alta pressão (300 MPa) causou a ruptura irreversível de agregados de proteína devido ao forte fluxo de elongação, que resultou em forças de fricção (BOUAOUINA *et al.*, 2005).

Os resultados obtidos indicam que o tratamento a 300 MPa resultou em uma perda de atividade semelhante à obtida por tratamento térmico realizado por IBRAHIM (1998) nas condições de 80°C por 20 minutos a pH 6,0, que obteve uma redução de atividade enzimática de 50%.

Conforme comentado por alguns autores (IBRAHIM, 1998; MASSCHALCK *et al.*, 2001) a perda de atividade de muramidase pode não estar relacionada com a perda de atividade antimicrobiana, tornando necessária a observação da atividade antimicrobiana da enzima dissociadamente da desnaturação pela ação da pressão. A Tabela 6.3 mostra a duração da fase lag de culturas de *L. brevis* adicionadas de 50 mg.mL⁻¹ de lisozima previamente tratada nas pressões indicadas por alta pressão dinâmica.

Tabela 6.3 – Atividade antimicrobiana de lisozima tratada por alta pressão dinâmica sobre a duração da fase lag (λ) de culturas de *L. brevis*.

Pressão de tratamento (MPa)	Fase Lag (horas)	Desvio padrão
Sem lisozima	3,04	0,00
0	12,30	0,01
150	13,74	0,01
300	11,89	0,01

Foi observado na Tabela 6.3 que a atividade antimicrobiana da lisozima, quantificada pela sua capacidade de causar aumento da duração da fase Lag de uma cultura de *L. brevis*, não foi significativamente afetada pelo tratamento por alta pressão do bioprotetor. IBRAHIM *et al.* (1997) reportou um aumento de atividade de lisozima contra microrganismos Gram positivos e desenvolvimento de ação anti Gram negativos após desnaturação parcial.

VANNINI *et al.* (2004) atribuiu a mudanças de conformação da lisozima ocorridas sob tratamento por homogeneização a 75 MPa, o aumento da inativação de uma cultura de *L. plantarum*.

A Figura 6.3 mostra a destruição de uma suspensão de *L. brevis* por alta pressão dinâmica em cerveja.

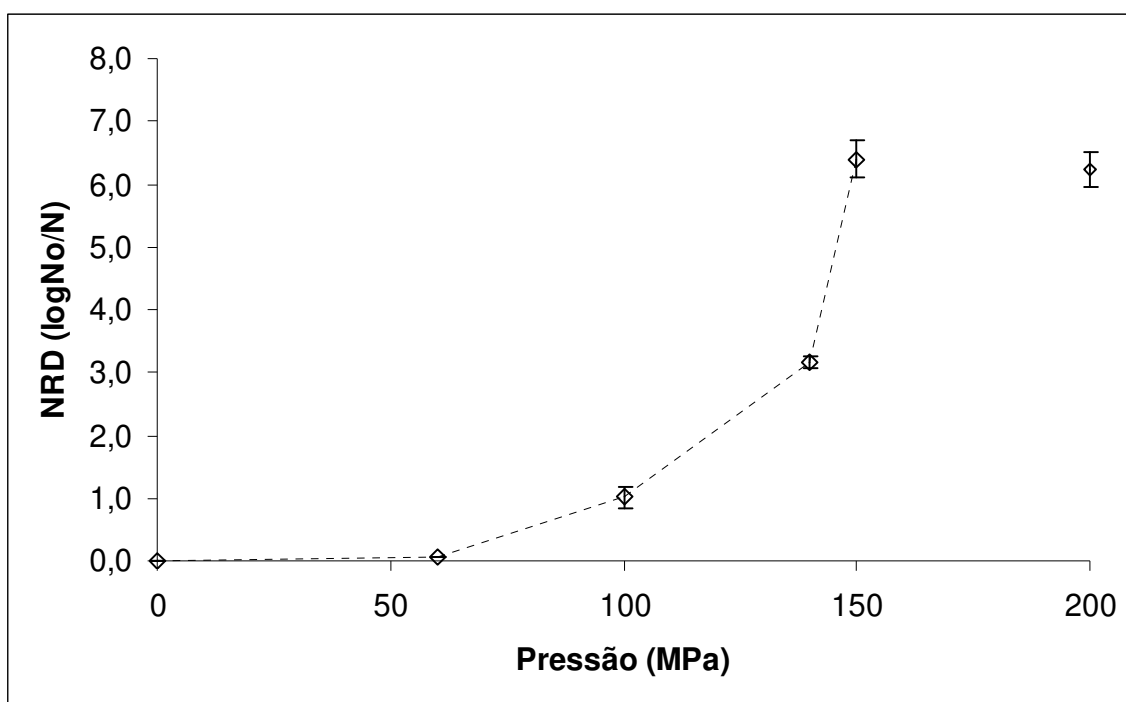


Figura 6.3 - Número de reduções decimais de *Lactobacillus brevis* em função da pressão de tratamento por ultra alta pressão dinâmica em cerveja.

O tratamento a 200 MPa foi capaz de reduzir por completo a carga inicial de microrganismos. O tratamento a 150 MPa reduziu 6,4 ciclos logarítmicos e o tratamento a 140 MPa mostrou-se subletal, conforme a Figura 6.3. É importante observar que o crescimento das colônias recuperadas se desenvolveu com a mesma velocidade e atingiu o mesmo tamanho final e aspecto que as colônias não tratadas, o que indica que o tratamento subletal não causou injúria aparente, o que está de acordo com as observações de WUYTACK *et al.* (2002), que não observou a diminuição das contagens de microrganismos tratados por alta pressão dinâmica em meios contendo barreiras ao crescimento, com relação a

microrganismos não tratados. Esta característica se deve ao fato de que o mecanismo de destruição pelo sistema de homogeneização por alta pressão seja de natureza física, decorrentes dos gradientes de velocidades no interior da válvula, descritos por BROOKMAN (1974) e mais recentemente e especificamente para o sistema utilizado por FLOURY *et al.* (2004).

A Figura 6.4 mostra a ação combinada, sobre uma suspensão de *L. brevis* em cerveja ($1,95 \cdot 10^6 \text{ufc} \cdot \text{mL}^{-1}$), de um tratamento utilizando $100 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de lisozima, e alta pressão dinâmica a 100 e 140 MPa em cerveja.

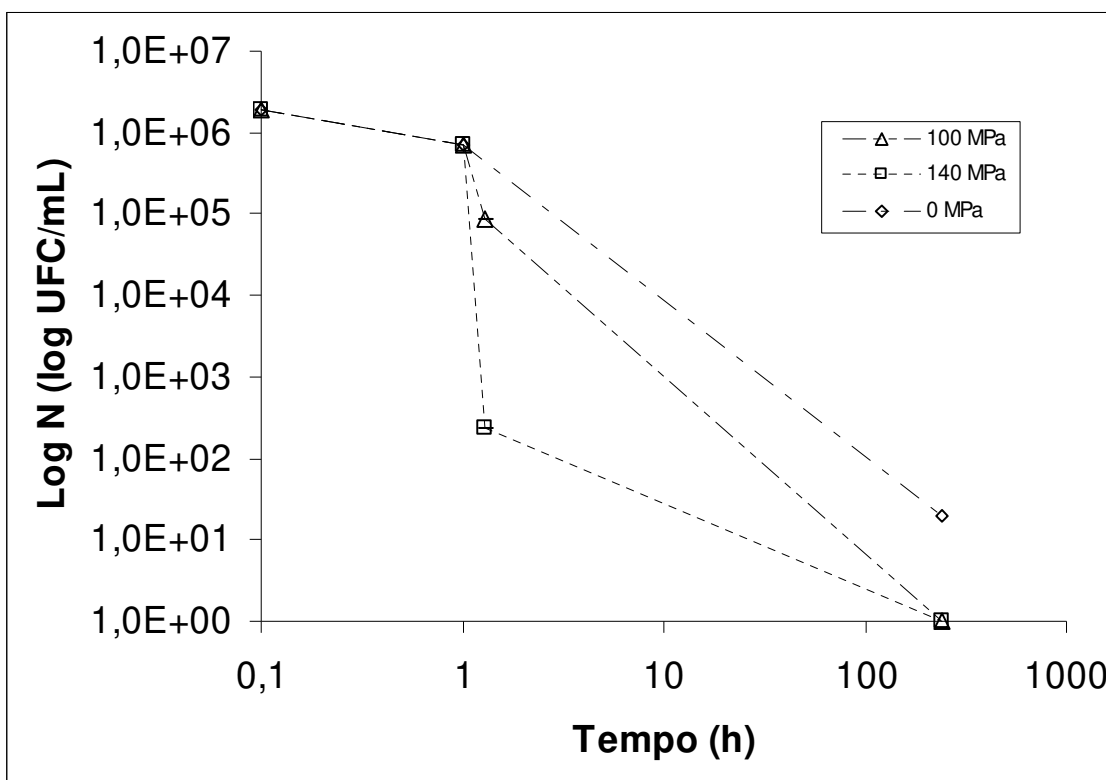


Figura 6.4 – Contagem de $\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ de *Lactobacillus brevis* em cerveja pilsen submetida ao tratamento com $100 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de lisozima combinado com ultra alta pressão dinâmica a 100 e 140 MPa.

Foi observado na Figura 6.4 que o tratamento apenas com lisozima foi capaz de promover uma redução de cerca um ciclo logarítmico da carga de microrganismos. O tratamento por alta pressão dinâmica a 100 MPa foi capaz de

reduzir cerca de um ciclo logarítmico da carga inicial em concordância com os resultados anteriormente expostos na Figura 6.3. A 140 MPa foi observada a redução de cerca de 4 ciclos logarítmicos. MASSCHALCK *et al.* (2001) sugeriu que a exposição à ultra alta pressão hidrostática pode causar a sensibilização de microrganismos à nisina e lisozima aumentando a ação dos antimicrobianos, especificamente quando aplicada em pulsos de pressão, pela exposição dos sítios hidrofóbicos das moléculas em água nas condições de redução de volume, e conseqüente maior interação com as paredes e membranas do microrganismo, onde agem os antimicrobianos lisozima e nisina.

DIELS *et al.* (2005) utilizou lisozima (100 mg.L^{-1}) e observou que em pressões maiores ou igual a 150 MPa houve um efeito da lisozima sobre o microrganismo após tratamento por alta pressão dinâmica aumentado, atribuído ao aumento da permeabilidade da célula, devido ao componente hidrostático (ainda que pequeno) do processamento a alta pressão.

Tal efeito não pode ser observado no presente trabalho, devido as baixas pressões praticadas (até 140 MPa) em função da resistência diminuída do microrganismo em cerveja. Pelos mesmos motivos VANNINI *et al.* (2004) não observou o aumento da permeabilidade a lisozima pela alta pressão.

Foi observado também na Figura 6.4 que a lisozima continuou atuando sobre o *L. brevis*, causando no decorrer do tempo (10 dias) a destruição da carga inicial do microrganismo nas amostras tratadas a por alta pressão dinâmica. O processo utilizado não promoveu seleção de microrganismos resistentes à lisozima que continuou agindo no decorrer do tempo de prateleira medido, o que foi observado por MASSCHALCK *et al.* (2000) para o tratamento por alta pressão hidrostática.

6.4 CONCLUSÃO

Nisina mostrou-se um antimicrobiano eficaz contra as bactérias Gram positivas contaminantes de cerveja. *L. delbruecki* mostrou grande sensibilidade a

nisina ($0,8 \text{ mg.L}^{-1}$) e lisozima (1 mg.L^{-1}) e seu crescimento pode ser controlado por estes antimicrobianos em cerveja.

Nenhum antimicrobiano testado, por sua vez, foi eficiente em inibir as leveduras selvagens indicando que o método de controle microbiológico não pode ser utilizado isoladamente para a conservação de cerveja.

O microrganismo Gram negativo aeróbio (*A. aceti*) não pôde ser controlado pelos antimicrobianos. Como tal condição provém de problemas de incorporação de oxigênio ou de problemas de estaqueidade ou condições de barreira da embalagem, a garantia de conformidade no processamento minimiza os perigos de contaminação pelo microrganismo.

Uma sugestão para trabalhos futuros é a avaliação da capacidade de sensibilização pela alta pressão dinâmica dos microrganismos estudados aos bioprotetores, uma vez que no presente trabalho microrganismos que não puderam ser controlados pelos bioprotetores (*A. aceti* e leveduras selvagens) não foram submetidos ao tratamento combinado.

Nisina e lisozima não tiveram suas atividades reduzida pelo tratamento por alta pressão dinâmica até 300 MPa. Assim, o uso de nisina como barreira ao crescimento de bactérias lácticas contaminantes de cervejas não é antagonizado pelo tratamento. Sinergismos não foram avaliados devido à alta sensibilidade do *L. brevis* a nisina, sendo difícil estabelecer uma dosagem prática subletal em cerveja.

O tratamento combinado com alta pressão e lisozima foi eficiente, com redução inicial das contagens em um ciclo logarítmico pela exposição a 100 mg.L^{-1} de lisozima por uma hora, seguido da redução pelo processamento a alta pressão dinâmica (cerca de 4 ciclos logarítmicos a 140 MPa) e continuação da ação da lisozima no decorrer do período do teste com completa desativação do microrganismo. Não se observou tampouco a seleção de microrganismos resistentes durante a estocagem do produto processado desta forma.

6.5 BIBLIOGRAFIA

ASCHEE, P.V. Microbieel Becerf van Bier. **Cerevisia**. 17(3), 45-57, 1992.

BOUAOUINA, H; DESRUMAUX, A; LOISELA, C.; LEGRAND, J Functional properties of whey proteins as affected by dynamic high-pressure treatment. **International Dairy Journal**, 2005.

BRIGGS, D.E.; HOUGH, J.S.; STEVENS, R.; YOUNG, T.W. **Malting and Brewing Science**. Vol. 2, Ed. Chapman & Hall, 1981.

BROOKMAN J. S. Mechanism Of Cell Disintegration In A High-Pressure Homogenizer. **Biotechnology and Bioengineering** 16 (3): 371-383, 1974.

CHAN, W.C.; DODD, H.M.; HORN, N.; MACLEAN, K.; LIAN, L.Y.; BYCROFT, B.W.; GASSON, M.J.; ROBERTS, G.C.K. Structure-activity relationships in the peptide antibiotic nisin: role of dehydroalanine 5. **Applied-and-environmental-microbiology** (USA). v. 62(8) 2966-2969, 1996.

CHIHIB, N.E.; MONNERAT, L.; MEMBRE. J.M.; THOLOZAN, J.L.. Nisin, temperature and pH effects on growth and viability of *Pectinatus frisingensis*, a Gram-negative, strictly anaerobic beer-spoilage bacterium. **Journal of Applied Microbiology**. 87: (3) 438-446, 1999.

CHUNG, WILFRED; HANCOCK, ROBERT E.W. Action of lysozyme and nisin mixtures against lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**. Volume: 60(1) 25-32, 2000.

DE VUYST, L.; VANDAMME, E.J. **Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. Microbiology, Genetics and Applications**. 1 Ed. Blackie Academic & Professional. Londres 1994.

DIELS, A M. J., CALLEWAERT L, WUYTACK E Y., MASSCHALCK B, MICHIELS C W. Moderate Temperatures Affect *Escherichia coli* Inactivation by

High-Pressure Homogenization Only through Fluid Viscosity. **Biotechnology Progress**, 20, 151-157, 2004.

FLOURY, J; BELLETTREB J, LEGRAND JACK, DESRUMAUX, A. Analysis of a new type of high pressure homogeniser. A study of the flow pattern **Chemical Engineering Science** 59 (2004) 843 – 853.

FRANCHI, M.A.; SERRA,G.E; CRISTIANINI, M. The use of biopreservatives in the control of bacterial contaminants of sugarcane alcohol fermentation. **Journal of Food Science**. Vol 68(7) 2310-2315, 2003.

GÄNZLE M.G, ULMER H.M., VOGEL R.F. High Pressure Inactivation of *Lactobacillus plantarum* in a Model Beer System **Journal Of Food Science**, Vol. 66, No. 8, 2001.

GARRIGA M., AYMERICH M.T., COSTA S., MONFORT J.M , HUGAS M. Bactericidal synergism through bacteriocins and high pressure in a meat model system during storage **Food Microbiology**, 2002, 19, 509-518.

HAMMOND, J; BRENNAN, M.; PRICE, A. The control of microbial spoilage of beer. **Journal of the Institute of Brewing**. 105(2), 113-120, 1999.

HOLLEROVA, I e KIBIZNIAKOVA,P. Monitoring Gram positive bacterial contamination in czech breweries. **Journal of the Institute of Brewing**. 107 355-358. 2001.

IBRAHIM, H.R. On the novel catalytically-independent antimicrobial function of hen-white lysozyme: a conformation-dependent activity. **Nahrung Food**. 3-4 187-193, 1998.

IBRAHIM, H.R.; HIGASHIGUCHI, S.; SUGIMOTO, Y.; AOKI, T. Role of divalent cations in the novel bactericidal activity of the partially unfolded lysozyme. **Journal-of-agricultural-and-food-chemistry (USA)**. 45(1) 89-94, 1997.

JESPERSEN, L.; JAKOBSEN, M. specific spoilage microorganisms in breweries and laboratory media for their detection. **International Journal for Food microbiology**. 33, 139-155, 1996.

LISERRE, A M. LANDGRAF M, DESTRO, M.T., FRANCO B.D.G.M. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by a bacteriocinogenic *Lactobacillus sake* strain in modified atmosphere-packaged Brazilian sausage. **Meat Science** 61 (2002) 449–455, 2002.

LUCK, E.; JAGER, M. Antimicrobial Food Additives. **Characteristics, Uses and Effects**. Ed. Springer, 2nd. Ed., Berlim, 1997.

MAKKI, F.; DURANCE, T.D. Thermal inactivation of lysozyme as influenced by pH, sucrose and sodium chloride and inactivation and preservative effects in beer. **Food Research International**. 29 (7) 635-645,1996.

MASSCHALCK, B.; HOUDT, R.V.; HAVER,E.G.R.V.;MICHIELS, C.W. Inactivation of Gram-negative bacteria by lysozyme, denatured lysozyme and lysozyme-derived peptides under high hydrostatic pressure. **Applied and Environmental Microbiology**. 67(1) 339 – 344. 2001.

MESSENS, W; DE VUYST L. Inhibitory substances produced by *Lactobacilli* isolated from sourdoughs—a review. **International Journal of Food Microbiology** 72 (2002) 31– 43

MIKYSKA A, HRABAK M, HASKOVA D, et al. The role of malt and hop polyphenols in beer quality, flavour and haze stability **Journal Of The Institute Of Brewing** 108 (1): 78-85 2002

MONTVILLE, T.J.; CHEN, Y. Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions. **Applied microbiology and biotechnology** (1998) 50, 511-519, 1998.

OGDEN K, TUBB R.S inhibition of beer-spoilage lactic-acid bacteria by nisin. **Journal of the Institute of Brewing** 91 (6): 390-392 1985

OGDEN K, WAITES M.J.. the action of nisin on beer spoilage lactic-acid bacteria. **Journal of the Institute of Brewing** 92 (5): 463-467, 1986.

POPPER, L; KNORR, D. Applications of high-pressure homogenization for food preservation. **Food Technology**. 84-89, 1990.

PROCTOR, V.A. The chemistry of lysozyme and it's use as a food preservative and a pharmaceutical. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. 26 359-395. 1988.

ROGERS, A.M.; MONTVILLE, t.j. Improved agar diffusion assay for nisin quantification. **Food Biotechnology**. 5(2), 161-168, 1991.

SAKAMOTO K,. KONINGS W. N. Beer spoilage bacteria and hop resistance. **International Journal of Food Microbiology** 89 (2003) 105– 124

SATOKARI , R.; JUVONEN, R.; MALLISON , K.; VON WRIGHT, A.; HAIKARA, A. Detection of beer spoilage bacteria *Megasphaera* and *Pectinatus* by polymerase chain reaction and colorimetric microplate hybridization. **International Journal of Food Microbiology**. 45, 119–127, 1998.

STUPIELLO, M.G.S. **Avaliação de Metodologia para Estudo da Ação de Alguns Antimicrobianos frente a Bactérias Gram + Isoladas da Fermentação**. Tese de Mestrado, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, USP, 1993.

VANNINI L, LANCIOTTI R, BALDI D, Interactions between high pressure homogenization and antimicrobial activity of lysozyme and lactoperoxidase. **International Journal of Food Microbiology** 94 (2): 123-135, 2004.

VAUGHAN A, ROUSE S, VAN SINDEREN D Investigating the antimicrobial efficacy of a lactococcal bacteriocin for the development of microbiologically stable beer. **Journal of the Institute of Brewing** 110 (3): 181-188, 2004.

WINKOWSKI, K; CRANDALL, A.D.; MONTVILLE, T.J. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Lactobacillus bavaricus* MN in beef systems at refrigeration temperatures. **Applied and Environmental Microbiology**. 59(8), 2552-2557, 1993.

WUYTACK, E.Y.; DIELS, A.M.J.; MICHIELS, C.W. Bacterial inactivation by high-pressure homogenisation and high hydrostatic pressure. **International Journal of Food Microbiology**. 77 (3): 205-212, 2002.

CAPÍTULO 7 - ESTUDO DOS EFEITOS DO TRATAMENTO POR ALTA PRESSÃO DINÂMICA SOBRE A QUALIDADE DA CERVEJA – COR, TURBIDEZ E POTENCIAL DE ÓXIDO REDUÇÃO.

7.1 INTRODUÇÃO

Cerveja Pilsen é uma cerveja de baixa fermentação ou Lager, caracterizada pela sedimentação da levedura de fermentação ao final do processo de maturação. Industrialmente é envasada em latas metálicas ou garrafas de vidro, pasteurizada para garantia da estabilidade microbiológica. É o tipo de cerveja mais difundido no mercado brasileiro, e caracteristicamente é uma bebida de cor clara, espuma densa, límpida e de médio a baixo teor alcoólico (aproximadamente 4,5°GL). Comumente é estabilizada microbiologicamente em túneis de pasteurização, após o enchimento das latas ou garrafas de vidro.

No entanto, métodos alternativos a pasteurização em túnel vêm sendo empregados pela indústria cervejeira com o intuito de garantir a estabilidade microbiológica do produto minimizando os efeitos indesejáveis da aplicação de calor.

Equipamentos do tipo “pasteurizador flash” são eficientes na preservação da qualidade de cerveja, pois minimizam a formação de aromas indesejáveis a papel e papelão (aldeídos de cadeias longas) conforme WACKERBAUER e ZUFALL (1998). Estes compostos estão relacionados com a oxidação e envelhecimento de cervejas (FURUSHU *et al.*, 1998). Métodos não térmicos são amplamente difundidos, tais como a filtração em membranas, mas com prejuízos à estabilidade de espuma e turbidez reversível (HAERNULV e LARSSON, 1992).

CASTELLARI *et al.* (2000) utilizaram alta pressão hidrostática (600 MPa, 5 minutos) para estabilizar microbiologicamente amostras de cerveja. O tratamento promoveu a redução de quatro ciclos logarítmicos de bolores e leveduras e também das bactérias lácticas, estabilizando o produto durante a vida útil de 49 dias. Não se observou alterações significativas na qualidade da cerveja após o

processamento, que reteve seus parâmetros de qualidade (cor, turbidez e amargor). A utilização de tecnologia de alta pressão foi descrita para estabilização microbiológica e coloidal, isomerização de α -ácidos, e melhora de filtrabilidade da cerveja para valores próximos aos da água pura pela ação da alta pressão sobre os β -glucanos e seus géis, utilizando 300 e 500 MPa por 5 minutos (FISCHER *et al.*, 2000)

Um parâmetro de qualidade importante no processamento de cerveja é o escurecimento resultante da reação de Maillard: TAMAOKA *et al.* (1991) utilizou alta pressão para estudar seus efeitos neste mecanismo químico. Aplicando 50 a 500 MPa a 50°C na fase da reação de condensação de aminas com carbonilas, não observou diferenças significativas nas reações. Para as reações de escurecimento, no entanto, pressões de 50 a 200 MPa foram suficientes para suprimi-las, a um volume de ativação de 13 a 27 mL/mol. A ionização e formação de ligações são favorecidas pela compressão e volumes de ativação ΔV negativos, ao passo que neutralização e quebra de ligações são favorecidas por ΔV positivos.

A presença de polifenóis provenientes do malte e do lúpulo tem importante ação antioxidante contribuindo para o valor oxiredutor, mas são promotores da formação indesejada de turbidez (MIKYŠKA *et al.*, 2002). A estabilização e a remoção destes taninos se torna necessária para prevenir a formação de complexos tanino – proteínas que causam a turvação e formação de precipitados em cervejas (NARZISS, 1987; BRIGGS, 1981).

O objetivo do presente trabalho é de avaliar a qualidade da cerveja tipo pilsen submetida a alta pressão dinâmica, avaliando-se a cor, a turbidez e o potencial redox do prouto tratado.

7.2 MATERIAL E MÉTODOS

7.2.1 Matéria Prima

Cerveja de marca comercial tipo pilsen, com pH 4,5, 2,5°Brix e 4,7°GL não pasteurizada (chopp) foi adquirida para os testes de estabilização microbiológica e enzimática.

7.2.2 Tratamento por ultra alta pressão dinâmica

Foi utilizado para os ensaios o equipamento de ultra-alta pressão, tipo homogeneizador UAP (Stansted Fluid Power Ltd.), com capacidade para tratar 260 mL/minuto de amostra em regime contínuo. A pressão de trabalho do equipamento foi fixada em 250 MPa para o teste de vida útil e 100, 150, 200, 250 e 300 MPa para as medições de cor e turbidez em colorímetro.

O equipamento foi acoplado a um trocador de calor por serpentina na saída da válvula de homogeneização para resfriar a amostra, de modo a minimizar os efeitos do calor gerado na válvula de homogeneização sobre a qualidade da cerveja. O sistema foi sanitizado com álcool etílico a 70% incluindo os tanques de amostra e produto e mangueiras de conexão para garantir a assepsia dos testes. A manipulação e tomada das amostras foram realizadas em capela de fluxo laminar horizontal acoplada ao sistema. A cerveja tratada foi envasada em garrafas de vidro de 355 mL previamente lavadas com CO₂ e arrolhadas com tampas metálicas.

7.2.3 Efeito da pressão de tratamento sobre a cor e turbidez da cerveja

Cor segundo o padrão CIE L*a*b* e turbidez padrão Hunterlab foram medidas em um colorímetro ColorQuest – Hunterlab utilizando software de conversão da mesma marca.

7.2.4 Análise da qualidade de cerveja durante a vida útil

Foram realizadas análises químicas nas amostras tratadas para caracterizar as transformações ocorridas durante o processamento. As análises foram: cor (ASBC 55121); turbidez total (AOAC 970.14) utilizando padrão de formazina; dióxido de carbono em cerveja (método AOAC 940.17), potencial de óxido redução - ITT (indicator time test) pelo método DCI. As análises foram realizadas no decorrer de 100 dias para avaliação da qualidade da cerveja durante a vida útil.

7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.3.1 Efeito da pressão de tratamento sobre a cor e turbidez da cerveja

O gráfico da Figura 7.1 mostra o efeito da pressão de tratamento por ultra alta pressão dinâmica na turbidez de chopp tipo pilsen nas temperaturas de entrada de 6 e 25°C.

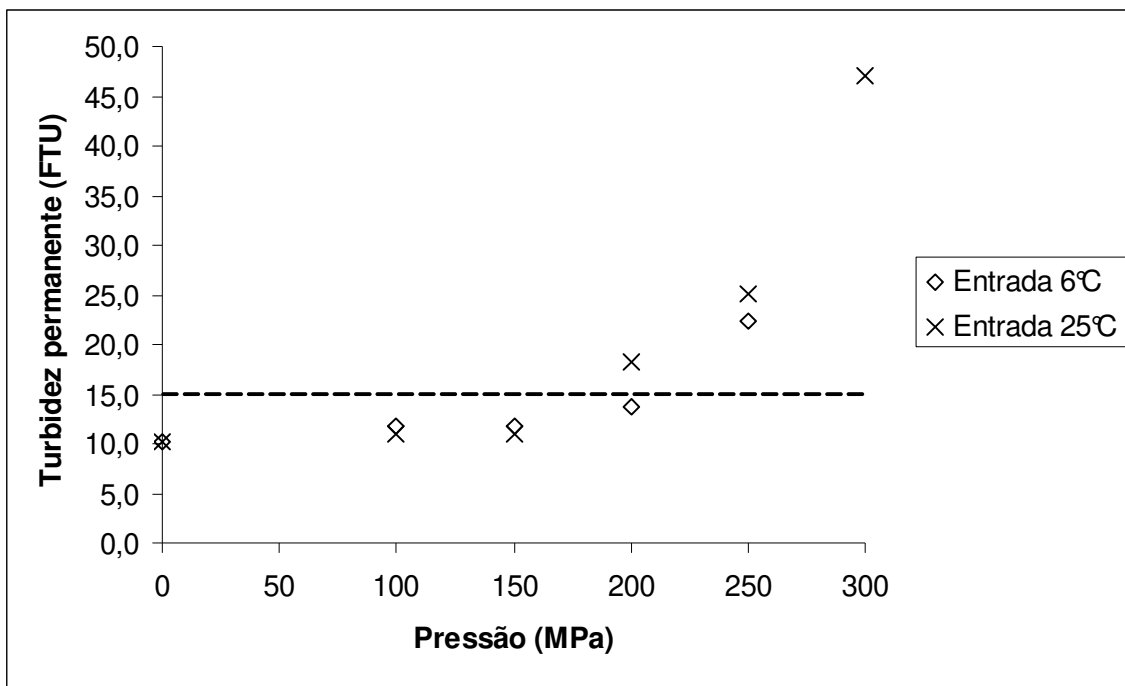


Figura 7.1 – Turbidez permanente de chopp tratado por ultra alta pressão dinâmica nas temperaturas de entrada de 6 e 25°C.

Na Figura 7.1 foi observado que o chopp tratado até 150 MPa apresentou características de turbidez abaixo de 15 FTU, mas a partir de 200 MPa constatou-se um aumento da turbidez.

Pôde-se observar que o aumento de turbidez foi mais dependente da pressão de tratamento que da temperatura de entrada de produto.

A formação de turbidez pode ser atribuída à desestabilização de taninos e a desnaturação de proteínas presentes na cerveja. Mudanças estruturais e de propriedades tecnológicas em proteínas pela aplicação de alta pressão dinâmica foram descritas por KHEADR *et al.* (2002) e LANCIOTTI *et al.* (2004).

A Figura 7.2 mostra a relação entre pressão de tratamento e turbidez (absoluta) medida segundo o padrão Hunterlab.

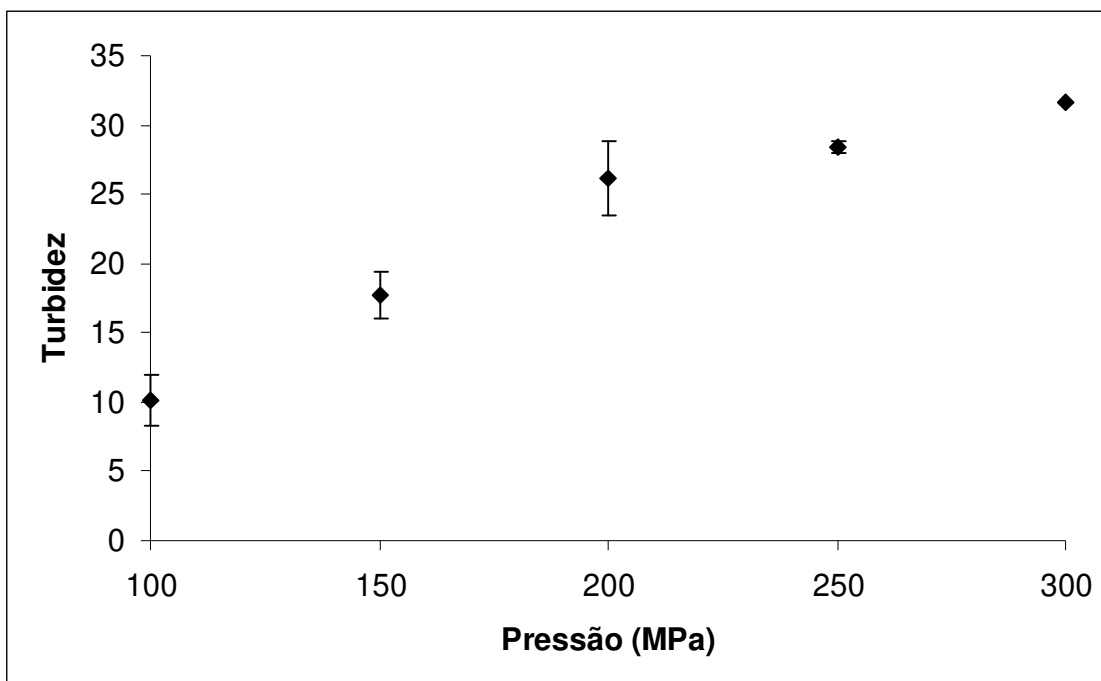


Figura 7.2 – Turbidez (padrão Hunterlab) em função da pressão de tratamento por ultra alta pressão dinâmica de chopp tipo pilsen.

O estudo da evolução da turbidez em função da pressão pode ser confirmado utilizando-se outro método de determinação de turbidez, mostrado na Figura 7.2. Pôde-se confirmar a tendência de aumento de turbidez segundo o aumento da pressão, e houve aumento significativo da turbidez no chopp tratado em relação ao chopp sem tratamento (turbidez de 7,8).

CASTELLARI *et al.* (2000) obtiveram cervejas mais turvas por alta pressão hidrostática (600 MPa por 5 minutos) que por pasteurização térmica (60°C por 10 minutos) - cerca do dobro da turbidez reversível após um dia do tratamento e cerca de 158 NTU contra 47 NTU de turbidez permanente após 8 dias de

estocagem, para alta pressão e tratamento térmico, respectivamente. O efeito das variáveis foi significativo a $p < 0,01$.

É importante salientar que o tratamento a alta pressão hidrostática difere essencialmente do processo dinâmico (FANTIN *et al.* 1996), em que o componente hidrostático se limita a cerca de 17,5 segundos no equipamento, mas de maneira análoga mas mecanisticamente diferente, ocorre a ação desnaturante sobre as proteínas. A Figura 7.3 mostra o efeito da pressão de tratamento sobre a cor de chopp tipo pilsen.

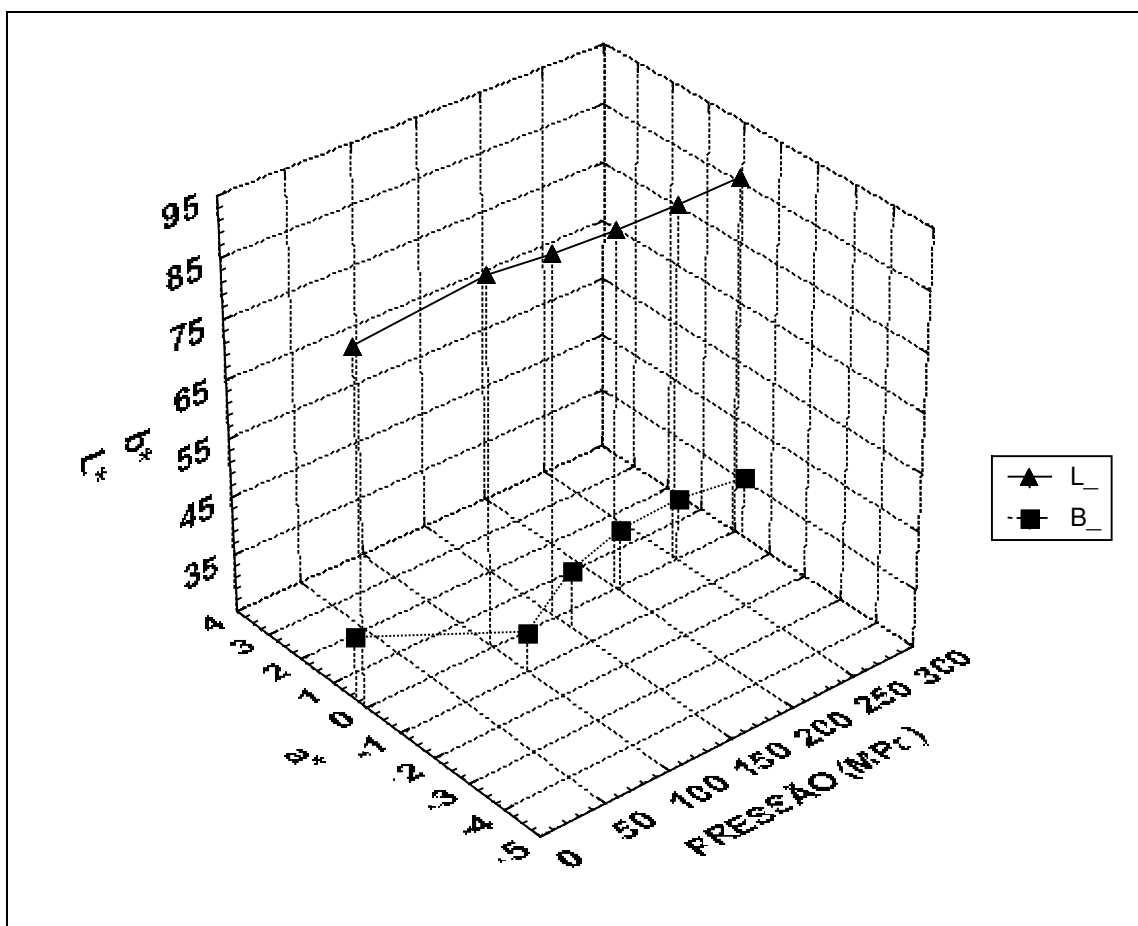


Figura 7.3 – Cor padrão Cie L*a*b* de chopp tipo pilsen tratado por ultra alta pressão dinâmica.

Foram observadas segundo a Figura 7.3, pequenas variações na luminosidade e cor do chopp processado por ultra alta pressão dinâmica. Estes dados são condizentes com as observações de TAMAOKA *et al.* (1991) que mostra que a formação de cor pela reação de Maillard é reduzida sob alta pressão. CASTELLARI *et al.* (2000), tratando cervejas por alta pressão hidrostática a 600 MPa, também obtiveram produtos pouco alterados com relação ao atributo da cor (Cie L*a*b*).

7.3.2 Análise da qualidade de cerveja durante a vida útil do produto

A Figura 7.4 mostra a relação entre o potencial de óxido redução (método DCI) de chopp tratado por ultra alta pressão a 250 MPa, pressão efetiva para estabilização microbiológica de cerveja e o acompanhamento durante o tempo de estocagem de 100 dias, a temperatura ambiente (aproximadamente 25°C).

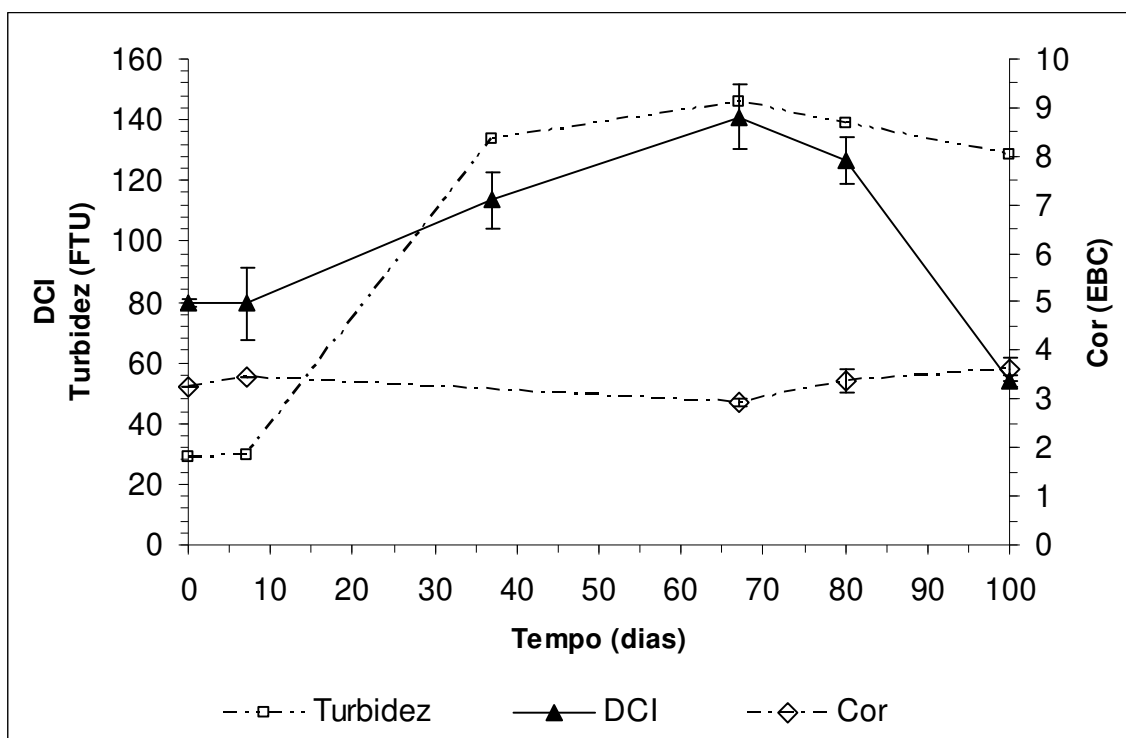


Figura 7.4 - Potencial de óxido redução, cor e turbidez de chopp pilsen medido antes e depois do tratamento por ultra alta pressão dinâmica a 250 MPa e acompanhamento durante a vida útil.

Foi observado na Figura 7.4 que o tratamento por ultra alta pressão dinâmica não afetou significativamente o potencial de oxido redução do chopp logo após o tratamento, mas observou-se um aumento deste potencial até cerca de 60 dias de vida útil seguido de um rápido declínio, atingindo valores inferiores aos do chopp inicial no centésimo dia. Tal comportamento foi constatado em testes preliminares realizados com cervejas pasteurizadas por método térmico. Por serem testes preliminares não foi comparado o desempenho entre os métodos térmico e por ultra alta pressão dinâmica.

A turbidez foi pouco afetada logo após o processamento, mas observou-se um grande aumento dos valores deste parâmetro durante o tempo de estocagem. Houve dificuldade em medir a turbidez devido à sedimentação (dos compostos causadores da turbidez) ocorrida nas garrafas e conseqüentemente coeficientes de variação de até 23,2% foram obtidos.

A cor foi pouco modificada durante o tempo de estabilidade estudado, e não foi observada tendência de aumento nos valores de cor, tendo o produto praticamente mantido a característica inicial. Observações semelhantes foram obtidas por CASTELLARI *et al.* (2000) na estocagem de cervejas processadas por alta pressão hidrostática (600 MPa por 5 minutos) por 48 dias no atributo cor, mantendo-se praticamente inalteradas. No entanto os valores de turbidez cresceram no decorrer da estocagem. Tal aumento pode ser minimizado pela utilização de tratamentos adequados de estabilização físico-química como o uso de filtração adicionada de sílicas, PVPP, retirada de proteínas entre outros (NARZISS, 1987).

7.4 CONCLUSÃO

Cervejas tratadas por alta pressão dinâmica apresentaram boa retenção de cor após o tratamento, e pouca alteração durante a estocagem.

A turbidez foi bastante afetada pelo tratamento por ultra alta pressão da cerveja. A temperatura de processo pode influenciar a formação de turbidez. Deve-se notar que a cerveja utilizada no teste não havia sido estabilizada físico-quimicamente, ou seja não passou pelo processo de filtração ou tratamento por sílica ou PVPP (tratamentos comumente empregados na indústria) o que implica em susceptibilidade de desenvolver turbidez e que cervejas bem estabilizadas podem apresentar resultados diferentes de turbidez.

O valor do potencial de óxido redução foi monitorado nos testes e foi pouco afetado pelo tratamento de alta pressão dinâmica. Este resultado indica que o processo pode ter um efeito positivo na preservação das características sensoriais do produto, uma vez que a oxidação da cerveja ocorre na medida da queda do potencial redutor. Trabalhos futuros poderão elucidar o efeito direto deste processamento sobre as características sensoriais do produto. Este enfoque não foi dado neste trabalho, pois a tecnologia de construção da máquina de alta pressão dinâmica envolve a utilização de ligas de metais não sanitárias; o advento de um equipamento construído com materiais compatíveis com a produção de alimentos viabilizaria estes ensaios, bem como uma futura aplicação comercial.

7.5 BIBLIOGRAFIA

BRIGGS, D.E.; HOUGH, J.S.; STEVENS, R.; YOUNG, T.W. **Malting and Brewing Science**. Vol. 2, Ed. Chapman & Hall, 1981.

CASTELLARI, M.; ARFELLI, G.; RIPONI, C.; CARPI, G.; AMATI, A. High Hydrostatic Pressure Treatment for Beer Stabilization. **Journal of Food Science**. 65(6), 974-977, 2000.

FANTIN, G; FOGAGNOLO, M; GUERZONI ME. Effect of high hydrostatic pressure and high pressure homogenization on the enantioselectivity of microbial reductions **Tetrahedron-Asymmetry** 7 (10): 2879-2887 , 1996

FISCHER, S.; HÖHN, G.; MEYER-PITROFF, R. Influence of hydrostatic high pressure on the filterability of beer. **MBAA Technical Quarterly**. 37(4) 515-518, 2000.

FURUSHU, S.; KOBAYASHI, M.; MAKAE, M.; TAKASHIU, M.; TAMAKI, T.; SHIUOTSUKA, K. A developed descriptive sensory test reveals beer changes during storage. **MBAA Technical Quarterly**. 36(2) 163-166, 1999.

HAERNULV, B.G.; LARSSON, T. A study of the influence of pasteurization and membrane filtration on the quality of Swedish lagers. **MBAA Technical Quarterly**. 29: 143-146, 1992.

KHEADR, E., VACHONA J.F., PAQUINA P, FLISSA I., Effect of dynamic high pressure on microbiological, rheological and microstructural quality of Cheddar cheese. **International Dairy Journal** 12 (2002) 435–446, 2002.

KNORR, D. Effects of High-Hydrostatic-Pressure Process on Food Safety and quality. **Food Tecnology**. 156 – 161, 1993.

LANCIOTTI R, VANNINI L, PITTIA P, M E GUERZONI, M.E. Suitability of high-dynamic-pressure-treated milk for the production of yoghurt. **Food Microbiology** 21 (2004) 753–760, 2004.

MIKYSKA A, HRABAK M, HASKOVA D, et al. The role of malt and hop polyphenols in beer quality, flavour and haze stability **Journal of the Institute of Brewing** 108 (1): 78-85 2002

NARZISS, L. Beer Stability. **Brauwelt International**. 1987. I- 46-50.

SCHWIEZOW, M.H. **Malt beverages and brewing Materials. Official methods of analysis AOAC international**. 16 Ed., 3ª revisão , Capítulo 27, Volume II p.1- 21, Mariland, EUA, 1997.

TAMAOKA, T; ITOH, N.; HAYASHI, R. High pressure effect on Maillard reaction. **Agriculture, Biology and Chemistry**. 55(8), 2041-2074, 1991.

WACKERBAUER, K; ZUFALL, C. Pasteurization and beer quality. **Cerevisia**, proc EBC congress (Maastricht), 37-43, 1997.

WUYTACK, E.Y.; DIELS, A.M.J.; MICHIELS, C.W. Bacterial inactivation by high-pressure homogenisation and high hydrostatic pressure. **International Journal of Food Microbiology**. 77 (3): 205-212, 2002.

CAPÍTULO 8 - CONCLUSÕES GERAIS

Nisina se mostrou um antimicrobiano eficaz contra as bactérias Gram positivas contaminantes de cerveja. *L. delbruecki* mostrou grande sensibilidade a nisina ($0,8 \text{ mg.L}^{-1}$) e lisozima (1 mg.L^{-1}) e seu crescimento pode ser controlado por estes antimicrobianos em cerveja.

Nenhum antimicrobiano testado, por sua vez, foi eficiente em inibir as leveduras selvagens indicando que o método de controle microbiológico não pode ser utilizado isoladamente para a conservação de cerveja.

O microrganismo Gram negativo aeróbio (*A. aceti*) não pôde ser controlado pelos antimicrobianos. Como tal condição provém de problemas de incorporação de oxigênio ou de problemas de estanqueidade ou condições de barreira da embalagem, a garantia de conformidade no processamento minimiza os perigos de contaminação pelo microrganismo.

O tratamento por ultra-alta pressão dinâmica foi eficaz na redução de contagens de microrganismos caracteristicamente contaminantes de cerveja. Mesmo em contagens iniciais bastante altas (cerca de 6 ciclos logarítmicos), praticadas para que se pudesse medir as reduções devido a pressão, o processo pôde eliminar a totalidade da carga inicial em pressões inferiores a 300 MPa.

Lactobacillus delbrueckii, um termolactobacilo, foi o mais resistente ao tratamento por alta pressão, tendo apresentado recuperação de microrganismos viáveis a pressão de 200 MPa. Desta forma, o *L. delbrueckii* pode ser utilizado como o alvo do processo de alta pressão dinâmica para cervejas do tipo pilsen.

O processamento por alta pressão dinâmica de *L. delbrueckii* em cerveja tipo pilsen exibiu uma dependência positiva entre a pressão de trabalho e a destruição do microrganismo. Foi observado que a morte do microrganismo resultou de uma injúria irreversível, e injúria subletal não pode ser observada.

Por fim, o tratamento por múltiplos ciclos de processamento a pressões subletais teve como consequência um efeito aditivo, não tendo sido observado sinergismo por sensibilização do microrganismo ou desenvolvimento de resistência em ciclos subsequentes.

As temperaturas de entrada de produto tiveram grande influência na eficiência de destruição do microrganismo *L. delbruecki*, com cerca de 3 ciclos logarítmicos do microrganismo de diferença de destruição entre a temperatura mais alta (50°C) e a mais baixa (10°C).

O aumento da concentração dióxido de carbono, ao contrário do esperado, não promoveu uma maior inativação celular.

Para a lisozima, o valor de MIC de *Lactobacillus brevis* foi de 50 mg.L⁻¹, no entanto a inibição foi de caráter transitório.

A adição de 100 mg.L⁻¹ de lisozima a uma suspensão de *L. brevis* causou uma redução de 1,26 ciclos em 4 horas de contato, mostrando que a lisozima pode ser usada para controlar e reduzir contaminações de *L. brevis*.

O tratamento por alta pressão dinâmica da lisozima gerou perda de atividade enzimática (cerca de 50% a 300 MPa). No entanto não houve correlação entre a perda de atividade enzimática e antimicrobiana.

O tratamento por alta pressão dinâmica de suspensões de *L. brevis* em tampão fosfato a pressões entre 150 e 170 MPa causaram um efeito subletal, com redução de 1,0 ciclos logarítmicos a 150 MPa, e D_p de 5.5 MPa. A pressão de 180 MPa causou total inativação da carga inicial do microrganismo (10⁶ CFU.mL⁻¹) mostrando que o processo foi eficaz contra o *L. brevis*.

No tratamento combinado entre lisozima e alta pressão dinâmica, observou-se um efeito aditivo e sinérgico - cerca de 1,0 ciclo logarítmico puderam ser constatados a 160 e 170 MPa devido ao sinergismo dos efeitos.

Nisina foi capaz de controlar o crescimento de *L. brevis* em cerveja adicionada a 3,0 mg.L⁻¹, sendo o estudo com contaminantes diversos um tema relevante para futuros estudos.

Nem a nisina nem a lisozima tiveram suas atividades antimicrobianas reduzidas pelo tratamento por alta pressão dinâmica até 300 MPa. Assim, o uso de nisina como barreira ao crescimento de bactérias lácticas contaminantes de cervejas não é antagonizado pelo tratamento. Sinergismos não foram avaliados devido à alta sensibilidade do *L. brevis* a nisina sendo difícil estabelecer uma dosagem prática subletal em cerveja.

O tratamento combinado com alta pressão e lisozima foi eficiente e aditivo, com redução inicial das contagens em um ciclo logarítmico pela exposição a 100 mg.L⁻¹ de lisozima por uma hora, seguido da redução pelo processamento a alta pressão dinâmica (cerca de 4 ciclos logarítmicos a 140 MPa) e continuação da ação da lisozima no decorrer do período do teste com completa desativação do microrganismo. Não se observou tampouco a seleção de microrganismos resistentes durante a estocagem do produto processado desta forma. A estas pressões não foi observado sinergismo entre os tratamentos.

As cervejas estudadas, tratadas por alta pressão dinâmica apresentaram boa retenção de cor após o tratamento, e pouca alteração durante a estocagem.

O valor do potencial de óxido redução foi monitorado nos testes e foi pouco afetado pelo tratamento de alta pressão dinâmica.

A turbidez foi bastante afetada pelo tratamento por ultra alta pressão da cerveja. A temperatura de processo pode influenciar a formação de turbidez ainda que o efeito da pressão é muito mais importante. Deve-se notar que a cerveja utilizada no teste não havia sido estabilizada físico-quimicamente, o que implica em maior susceptibilidade na turvação e que cervejas bem estabilizadas podem apresentar resultados diferentes de turbidez.

Assim, trabalhos futuros utilizando cervejas estabilizadas por uso de sílicas ou polímeros como a polivinil polipirrolidona (PVPP) e utilizando tratamentos combinados como o realizado no presente trabalho, podem mostrar-se eficientes sem diminuir a qualidade especificamente a estabilidade física da cerveja.

Outros trabalhos no campo da análise sensorial poderão elucidar o efeito direto do processamento por alta pressão dinâmica sobre as características sensoriais do produto. Este enfoque não foi dado neste trabalho, pois a tecnologia de construção da máquina de alta pressão dinâmica envolve a utilização de ligas de metais não sanitárias; o advento de um equipamento construído com materiais compatíveis com a produção de alimentos viabilizaria estes ensaios, bem como uma futura aplicação comercial. Estes trabalhos, utilizando ferramentas de análise de componentes principais e análise sensorial descritiva dos produtos tratados por alta pressão dinâmica e pasteurização, podem quantificar as notas indesejáveis de aldeídos de cadeia longa e produtos de oxidação resultantes do processo térmico, e verificar se o processo não térmico oferece vantagens de qualidade de aroma para a cerveja.

CAPÍTULO 9 - BIBLIOGRAFIA

ABBE, T; KROCKEL, L; HILL, C. Bacteriocins: mode of action and potencial in food preservation and control of food poisoning. **International Journal of Food Microbiology**. (25)169-185. 1995.

AKASAKA, K.; TEZUKA, T.; YAMADA, H. Pressure-induced changes in the folded structure of Lysozyme. **Journal Molecular Biology**. 271 671-678, 1997.

ASCHEE, P.V. Microbieel Becerf van Bier. **Cerevisia**. 17(3), 45-57, 1992.

BANG, W.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.. High hydrostatic pressure and carbon dioxide inactivation of *Saccharomyces cerevisiae*. **IFT annual meeting Book of Abstracts**, 1999.

BLACK E P, ALAN L. KELLYA, FITZGERALD G. The combined effect of high pressure and nisin on inactivation of microorganisms in milk. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**. 6 (2005) 286 – 292

BOUAOUINA, H; DESRUMAUX, A; LOISELA, C.; LEGRAND, J Functional properties of whey proteins as affected by dynamic high-pressure treatment. **International Dairy Journal**, 2005.

BOWER, C.K; DAESCHEL, M.A. Resistance responses of microorganisms in food environments. **International Journal of Food Microbiology**, Volume: 50, (1-2) 33-44, 1999.

BOWER, C.K;. BOTHWELL, M.K; MCGUIRE J.. Lantibiotics as surface active agents for biomedical applications. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, (22) 259–265, 2001.

BRIGGS, D.E.; HOUGH, J.S.; STEVENS, R.; YOUNG, T.W. **Malting and Brewing Science**. Vol. 2, Ed. Chapman & Hall, 1981.

BROOKMAN J. S. Mechanism Of Cell Disintegration In A High-Pressure Homogenizer. **Biotechnology and Bioengineering** 16 (3): 371-383, 1974.

CAMPOS, F. P. "Estudo do processamento de suco de laranja através da tecnologia de homogeneização a ultra alta pressão".. 1v. 100p. Mestrado. Universidade Estadual de Campinas - Tecnologia De Alimentos, 2004

CASADEI M.A. ,. INGRAM R, HITCHINGS E., ARCHER J.,HEAT J.E. Resistance of *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* and *Lactobacillus delbrueckii* in relation to pH and ethanol. **International Journal of Food Microbiology** 63 (2001) 125–134, 2001.

CASTELLARI, M.; ARFELLI, G.; RIPONI, C.; CARPI, G.; AMATI, A. High Hydrostatic Pressure Treatment for Beer Stabilization. **Journal of Food Science**. 65(6), 974-977, 2000.

CHAN, W.C.; DODD, H.M.; HORN, N.; MACLEAN, K.; LIAN, L.Y.; BYCROFT, B.W.; GASSON, M.J.; ROBERTS, G.C.K. Structure-activity relationships in the peptide antibiotic nisin: role of dehydroalanine 5. **Applied-and-environmental-microbiology** (USA). v. 62(8) 2966-2969, 1996.

CHIHIB, N.E.; MONNERAT, L.; MEMBRE. J.M.; THOLOZAN, J.L.. Nisin, temperature and pH effects on growth and viability of *Pectinatus frisingensis*, a Gram-negative, strictly anaerobic beer-spoilage bacterium. **Journal of Applied Microbiology**. 87: (3) 438-446, 1999.

CHUNG, WILFRED; HANCOCK, ROBERT E.W. Action of lysozyme and nisin mixtures against lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**. Volume: 60(1) 25-32, 2000.

COLOMBIÉ, S.; GAUNAND, A.; LINDET, B. Lysozyme inactivation and aggregation in stirred-reactor. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. Volume: 11(4-6) 559-565, 2001.

DE VUYST, L.; VANDAMME, E.J. **Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. Microbiology, Genetics and Applications.** 1 Ed. Blackie Academic & Professional. Londres 1994.

DEASCHEL, M. A; BRUSLIND, L.; CLAWSON, J. Application of the enzyme lysozyme in brewing. **Technical Quarterly.** Volume: 36 (2) 219-222, 1999.

DIELS, A M. J., CALLEWAERT L, WUYTACK E Y., MASSCHALCK B, MICHIELS C W. Moderate Temperatures Affect *Escherichia coli* Inactivation by High-Pressure Homogenization Only through Fluid Viscosity. **Biotechnology Progress**, 20, 151-157, 2004.

DÜRING, K.; PORSCHE, P.; MAHN, A.; BRINKMANN, O. ; GIEFFERS, W. The non-enzymatic microbicidal activity of lysozyme. **Federation of European Microbiological Societies- Microbiology Letters.** 449 93-100, 1999.

DUTREUX, N ; NOTERMANS, S.; GONGORA-NIETO, M.M.; BARBOSA-CANOVAS, G.V.; SWANSON B.G. Effects of combined exposure of *Micrococcus luteus* to nisin and pulsed electric fields. **International Journal of Food Microbiology.** 60 (2000) 147-152, 2000.

FANTIN, G; FOGAGNOLO, M; GUERZONI ME. Effect of high hydrostatic pressure and high pressure homogenization on the enantioselectivity of microbial reductions **Tetrahedron-Asymmetry** 7 (10): 2879-2887 , 1996

FISCHER, S; HÖHN, G.; MEYER-PITROFF, R. Influence of hydrostatic high pressure on the filterability of beer. **MBAA Technical Quarterly.** 37(4) 515-518, 2000.

FLOURY, J; BELLETTREB J, LEGRAND JACK, DESRUMAUX, A. Analysis of a new type of high pressure homogeniser. A study of the flow pattern **Chemical Engineering Science** 59 (2004) 843 – 853

FLOURY, J; LEGRAND JACK, DESRUMAUX, A. Analysis of a new type of high pressure homogeniser. Part B. study of droplet break-up and re-coalescence phenomena. **Engineering Science**, 2005.

FRANCHI, M.A.; SERRA,G.E; CRISTIANINI, M. The use of biopreservatives in the control of bacterial contaminants of sugarcane alcohol fermentation. **Journal of Food Science**. Vol 68(7) 2310-2315, 2003.

FURUSHU, S.; KOBAYASHI, M.; MAKAE, M.; TAKASHIU, M.; TAMAKI, T.; SHIUOTSUKA, K. A developed descriptive sensory test reveals beer changes during storage. **MBAA Technical Quarterly**. 36(2) 163-166, 1999.

GÄNZLE M.G, ULMER H.M., VOGEL R.F. High Pressure Inactivation of *Lactobacillus plantarum* in a Model Beer System **Journal Of Food Science**, Vol. 66, No. 8, 2001.

GAO Y.C., ZHANG G.P., KRENZ, S; DARIUS S, POWER J, LAGARDE, G. Inhibition of spoilage lactic acid bacteria by lysozyme during wine alcoholic fermentation **Australian Journal Of Grape And Wine Research** 8 (1): 76-83, 2002.

GARRIGA M. , AYMERICH M.T., COSTA S., MONFORT J.M , HUGAS M. Bactericidal synergism through bacteriocins and high pressure in a meat model system during storage **Food Microbiology**, 2002, 19, 509-518

GILL, A.O.; HOLLEY, R.A. Surface application of lysozyme, nisin, and EDTA to inhibit spoilage and pathogenic bacteria on ham and bologna. **Journal Of Food Protection** 63 (10): 1338-1346, 2000.

GILL, A.O.; RICHARD, A.H. Inhibition of bacterial growth on ham and bologna by lysozyme. **Food Research International**. 33, 83-90, 2000.

GOUESBET G, JAN G, BOYAVAL P. *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus* thermotolerance. **Lait** 81 (1-2): 301-309, 2001.

HAERNULV, B.G.; LARSSON, T. A study of the influence of pasteurization and membrane filtration on the quality of Swedish lagers. **MBAA Technical Quarterly**. 29: 143-146, 1992.

HAMMOND, J; BRENNAN, M.; PRICE, A. The control of microbial spoilage of beer. **Journal of the Institute of Brewing**. 105(2), 113-120, 1999.

HASHIZUME, C.; KIMURA, K.; HAYASHI,R. Kinetic analysis of yeast inactivation by high pressure treatment at low temperature. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**. 59(8), 1455-1458, 1995.

HAYES, M.G.; FOX, P.F.; KELLY, A.L. Potential applications of high pressure homogenisation in processing of liquid milk. **Journal of Dairy Research** 72 (1): 25-33 FEB 2005

HOLLEROVA, I e KIBIZNIAKOVA,P. Monitoring Gram positive bacterial contamination in czech breweries. **Journal of the Institute of Brewing**. 107 355-358. 2001.

HOLZAPFEL, W.H.; GEISEN, R.; SCHILLINGER, U. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. **International Journal of Food Microbiology**. 24(3) 343-362, 1995.

HONG, S.I.; PYUN, Y.R. Physiological changes of *Lactobacillus plantarum* by high pressure carbon dioxide treatment. anais do congresso do institute of food technology – **IFT book of abstracts**. 1999.

IBRAHIM, H. R.;HIGASHIGUCHI, S.; SUGIMOTO, Y.; AOKI, T. Antimicrobial synergism of partially-denatured lysozyme with glycine: effects of sucrose and sodium chloride. **Food Research International**. 29(8) 771-777, 1996b.

IBRAHIM, H.R. On the novel catalytically-independent antimicrobial function of hen-white lysozyme: a conformation-dependent activity. **Nahrung Food**. 3-4 187-193, 1998.

IBRAHIM, H.R.; HIGASHIGUCHI, S.; SUGIMOTO, Y.; AOKI, T. Role of divalent cations in the novel bactericidal activity of the partially unfolded lysozyme. **Journal-of-agricultural-and-food-chemistry (USA)**. 45(1) 89-94,1997.

IBRAHIM, H; HIGASHIGUCHI, S; JUNECA, L.R; KIM, M; YAMAMOTO, T. A structural phase of heat-denatured lysozyme with novel antimicrobial action. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 44 1416-1423, 1996a.

IBRAHIM, H. R.; MATSUZAKI, T.; AOKI, T. Genetic evidence that antibacterial activity of lysozyme is independent of its catalytic function. **Federation of European Biochemical Societies**. 506 27-32, 2001.

JESPERSEN, L.; JAKOBSEN, M. specific spoilage microorganisms in breweries and laboratory media for their detection. **International Journal for Food microbiology**. 33, 139-155, 1996.

KAISER, A.L.; MONTVILLE, T.J. Purification of the bacteriocin bavaricin mn, and characterization of its mode of action against *Listeria monocytogenes* Scott a cells and lipid vesicles. **Applied and Environmental Microbiology**. 62(12): 4529-4525, 1996.

KAISER, A.L.; MONTVILLE, T.J. The influence of pH and growth rate on production of the bacteriocin bavaricin mn, in batch and continuous fermentations. **Journal of Applied Bacteriology**. 75: 536-540, 1993.

KHEADR, E., VACHONA J.F., PAQUINA P, FLISSA I., Effect of dynamic high pressure on microbiological, rheological and microstructural quality of Cheddar cheese. **International Dairy Journal** 12 (2002) 435–446, 2002.

KIM, W.J. Bacteriocins Of Lactic-Acid Bacteria - Their Potentials As Food Biopreservative. **Food Reviews International**. 9: (2) 299-313, 1993.

KLEINIG A R ;. MIDDELBERG A P. J .The Correlation of Cell Disruption With Homogenizer Valve Pressure Gradient Determined by Computational Fluid Dynamics **Chemical Engineering Science**, Vol. 51, No. 23, pp. 5103 5110, 1996.

KLEINIG A R ;. MIDDELBERG A P. J. On the mechanism of microbial cell disruption in high pressure homogenization, **Chemical Engineering Science**, 53 (5) 891 – 898, 1998.

KNORR, D. effects of high-hidrostatic-pressure processes on food safety and quality. **Food Technology**. 46(7),156-161, 1993.

KUWANO , K;, TANAKA, N; SHIMIZU T; NAGATOSHI,K.; NOUB S; SONOMOTO K. Dual antibacterial mechanisms of nisin Z against Gram-positive and Gram-negative bacteria International. **Journal of Antimicrobial Agents** 26 (2005) 396–402.

LACROIX, N.; FLISS, I; MAKHLOUF, J. Inactivation of pectin methylesterase and stabilization of opalescence in orange juice by dynamic high pressure. **Food Research International** 38 (2005) 569–576

LANCIOTTI R, VANNINI L, PITTIA P, M E GUERZONI, M.E. Suitability of high-dynamic-pressure-treated milk for the production of yoghurt. **Food Microbiology** 21 (2004) 753–760, 2004.

LANCIOTTI, R; GARDINI, F; SINIGAGLIA, M; GUERZONI, M.E. Effects of growth conditions on the resistance and spoilage species to high pressure homogenization. **Letters in Applied Microbiology**. 22 165-168,1996.

LANCIOTTI, R; SINIGAGLIA, M; ANGELINI, P; GUERZONI, M.E. Effects of homogenization pressure on the survival and growth of some spoilage and pathogenic micro-organisms. **Letters in Applied Microbiology**. 18 319-322,1994.

LEWUS, C.B.; MONTVILLE, T.J. Further characterization of bacteriocins plantaricin bn, bavaricin mn, and pediocin a. **Food Biotechnology**. 6(2), 153-174, 1993.

LISERRE, A M. LANDGRAF M, DESTRO, M.T., FRANCO B.D.G.M. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by a bacteriocinogenic *Lactobacillus sake* strain in modified atmosphere-packaged Brazilian sausage. **Meat Science** 61 (2002) 449–455, 2002.

LOSSO, J.N.; NAKAI, S.; CHARTER, E.A. Lysozyme. Naidu, A. S. **Natural Food Antimicrobial Systems**. 1st ed., Boca Raton: CRC press, 2000, Ch 6, 185-210.

LUCK, E.; JAGER, M. Antimicrobial Food Additives. **Characteristics, Uses and Effects**. Ed. Springer, 2nd. Ed., Berlim, 1997.

MAKKI, F.; DURANCE, T.D. Thermal inactivation of lysozyme as influenced by pH, sucrose and sodium chloride and inactivation and preservative effects in beer. **Food Research International**. 29 (7) 635-645,1996.

MASSCHALCK, B.; HOUDT, R.V.; HAVER,E.G.R.V.;MICHIELS, C.W. Inactivation of Gram-negative bacteria by lysozyme, denatured lysozyme and lysozyme-derived peptides under high hydrostatic pressure. **Applied and Environmental Microbiology**. 67(1) 339 – 344. 2001.

MASSCHALCK, B; GARCÍA-GRAELLS, C; HAVER, E.V; MICRIELS, C.W. Inactivation of high pressure resistant *Escherichia coli* by lysozyme and nisin under high pressure. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**. 1 39-47, 2000.

MESSENS, W; DE VUYST L. Inhibitory substances produced by *Lactobacilli* isolated from sourdoughs—a review. **International Journal of Food Microbiology** 72 (2002) 31– 43

MIKYSKA A, HRABAK M, HASKOVA D, et al. The role of malt and hop polyphenols in beer quality, flavour and haze stability **Journal Of The Institute Of Brewing** 108 (1): 78-85 2002

MONTVILLE, T.J.; CHEN, Y. Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions. **Applied microbiology and biotechnology** (1998) 50, 511-519, 1998.

NARZISS, L. Beer Stability. **Brauwelt International**. 1987. I- 46-50.

NATTRESS, F.M; YOST,C.K; BAKER,L.P. Evaluation of the ability of lysozyme and nisin to control meat spoilage bacteria. **International Journal of Food Microbiology**. 70 111-119. 2001.

NOMA, S.; SHIMODA, M.; HAYAKAWA, I. Improvement of pressure-inactivation effect with rapid decompression procedure. **International Congress on Engineering of Food – ICEF9 Montpellier**, Book of Abstracts, 2004.

O'MAHONY, A.; O'SULIVAN, T.; WALSH, Y.; VAUGHAN, A.; MAHER, M.; FITZGERALD, G.F.; SINDERNEN, D. Characterization of antimicrobial producing lactic acid bacteria from malted barley. **Journal of the Institute of Brewing**. 106(6), 403-410, 2000.

OGDEN K, TUBB R.S inhibition of beer-spoilage lactic-acid bacteria by nisin. **Journal of the Institute of Brewing** 91 (6): 390-392 1985

OGDEN K, WAITES M.J.. the action of nisin on beer spoilage lactic-acid bacteria. **Journal of the Institute of Brewing** 92 (5): 463-467, 1986.

PERIAGO, P.M.; MOEZELAAR, R. Combined effect of nisin and carvacrol at different pH and temperature levels on the viability of different strains of *Bacillus cereus*. **International Journal of Food Microbiology** .v 68 141–148, 2001

POPPER, L; KNORR, D. Applications of high-pressure homogenization for food preservation. **Food Technology**. 84-89, 1990.

PRIEST, F.G.; CAMPBELL, I. Brewing Microbiology. **Chapman & Hall Food Science Book**. 134-142, 1999.

PROCTOR, V.A. The chemistry of lysozyme and its use as a food preservative and a pharmaceutical. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. 26 359-395. 1988.

ROGERS, A.M.; MONTVILLE, t.j. Improved agar diffusion assay for nisin quantification. **Food Biotechnology**. 5(2), 161-168, 1991.

SAIKUMAR MV, GLATZ CE, LARSON MA Crystallization of lysozyme at high-pressures. **Journal of Crystal Growth** 151 (1-2): 173-179, 1995.

SAKAMOTO K., KONINGS W. N. Beer spoilage bacteria and hop resistance. **International Journal of Food Microbiology** 89 (2003) 105– 124

SANGRONIS, E; PTHAKAMURY, U; RAMOS, A.M.; IBARZ, A; CANOVAS, G.B.V.; SWANSON, B.G. La alta presión hidrostática: una alternativa en el procesamiento no térmico de alimentos. **Alimentaria**, v-43,93, 1997.

SATOKARI , R.; JUVONEN, R.; MALLISON , K.; VON WRIGHT, A.; HAIKARA, A. Detection of beer spoilage bacteria *Megasphaera* and *Pectinatus* by polymerase chain reaction and colorimetric microplate hybridization. **International Journal of Food Microbiology**. 45, 119–127, 1998.

SCHWIEZOW, M.H. **Malt beverages and brewing Materials. Official methods of analysis AOAC international**. 16 Ed., 3ª revisão , Capítulo 27, Volume II p.1- 21, Mariland, EUA, 1997.

SHEARER, A.E.H.; DUNNE, C.P.; SIKES, A.; HOOVER, D.G. Bacterial spore inhibition and inactivation in foods by pressure, chemical preservatives, and mild heat. **J. of Food Protection**. 63(11), 1503-1510, 2000.

SIMPSON, W.J. Ionophoric action of trans-isohumulone on *Lactobacillus brevis*. **Journal of General Microbiology**.139: 1041-1045 Part 5 MAY 1993

SMITH, A.; SMITH, P. Antibacterial activity of bitter resins derived from recovered hopped wort. **Journal of the Institute of Brewing**. 99: 43-45, 1993.

STUPIELLO, M.G.S. **Avaliação de Metodologia para Estudo da Ação de Alguns Antimicrobianos frente a Bactérias Gram Positivas Isoladas da Fermentação**. Tese de Mestrado, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, USP, 1993.

TAHIRI, I., MAKHLOUF J, PAQUIN P, FLISS, I. Inactivation of food spoilage bacteria and Escherichia coli O157:H7 in phosphate buffer and orange juice using dynamic high pressure. **Food Research International** (2005)

TAMAOKA, T; ITOH, N.; HAYASHI, R. High pressure effect on Maillard reaction. **Agriculture, Biology and Chemistry**. 55(8), 2041-2074, 1991.

TAUSHER, B. Pasteurization of food by hydrostatic high pressure: chemical aspects. **Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und- Forschung**. 200: 3-13, 1995.

VANNINI L, LANCIOTTI R, BALDI D, Interactions between high pressure homogenization and antimicrobial activity of lysozyme and lactoperoxidase. **International Journal of Food Microbiology** 94 (2): 123-135, 2004.

VAUGHAN A, ROUSE S, VAN SINDEREN D Investigating the antimicrobial efficacy of a lactococcal bacteriocin for the development of microbiologically stable beer. **J. of the Institute of Brewing** 110 (3): 181-188, 2004.

WACKERBAUER, K; ZUFALL, C. Pasteurization and beer quality. **Cerevisia**, proc EBC congress (Maastricht), 37-43, 1997.

WINKOWSKI, K; CRANDALL, A.D.; MONTVILLE, T.J. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Lactobacillus bavaricus* MN in beef systems at refrigeration temperatures. **Applies and Environmental Microbiology**. 59(8), 2552-2557, 1993.

WUYTACK, E.Y.; DIELS, A.M.J.; MICHIELS, C.W. Bacterial inactivation by high-pressure homogenisation and high hydrostatic pressure. **International Journal of Food Microbiology**. 77 (3): 205-212, 2002.

YAMAZAKI, K.; MURAKAMI, M.; KAWAI, Y.; INOUE, N.; MATSUDA, T. Use of nisin for inhibition of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in acidic drinks. **Food Microbiology**.17(3), 315-320, 2000.

ZAPICO, P.; PAZ, M.; MEDINA, M; NUNEZ, M. The effect of homogenization of whole milk, skim milk and milk fat on nisin activity against *Listeria innocua*. **International Journal of Food Microbiology** 46 (1999) 151–157, 1999.

ZIMMERMAN, F.; BERGMAN, C. Isostatic high pressure equipment for food preservation. **Food Technology**. 46(7),162-163, 1993.

ZUFALL, C.; WACKERBAUER, K. The biological impact of flash pasteurization over a wide temperature interval. **Journal of the Institute of Brewing**. 106(3), 163-168, 2000.

ANEXOS

ANEXO 1 – História térmica do ensaio de influência da temperatura de entrada sobre a destruição de *L. delbruecki*.

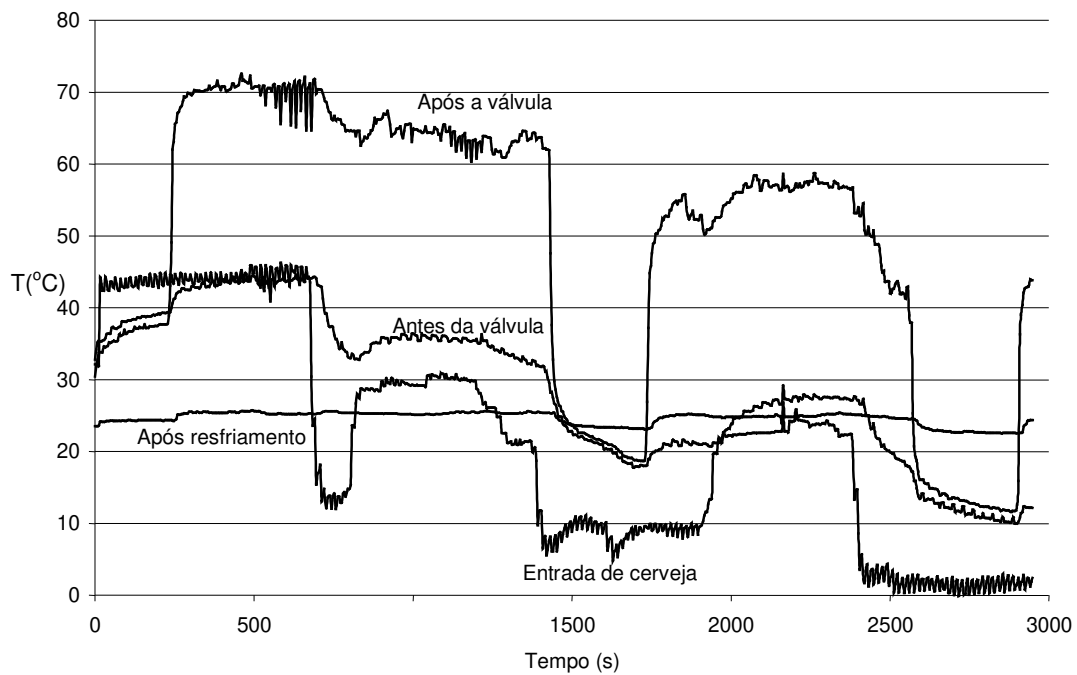


Figura 1 – Exemplo de história térmica do ensaio de avaliação do efeito da temperatura de entrada na eficiência da ruptura celular.

ANEXO 2 – Recirculação no sistema de alta pressão dinâmica.

A Figura 1 esquematiza a recirculação no sistema de alta pressão dinâmica:

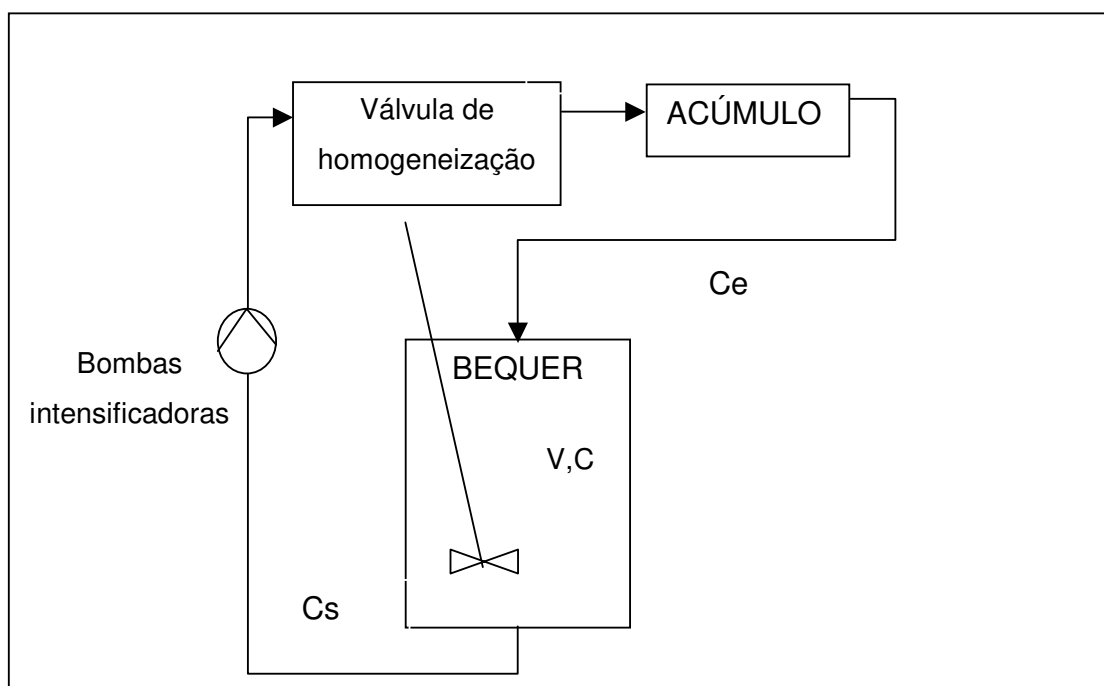


Figura 1 – Esquema de um sistema de alta pressão dinâmica em recirculação.

Sejam as variáveis: Q = vazão de produto (constante), C_e = concentração de células viáveis na entrada do reservatório, C_s = concentração de células viáveis na saída do reservatório, V = volume do reservatório, C = concentração de células viáveis no reservatório, R = concentração reduzida de células viáveis na válvula de homogeneização à pressão de trabalho.

E as relações:

$$Q = cte$$

$$C_e = C_s - R$$

Balço de massa no Reservatório –

$$\frac{\delta m}{\delta t} = \dot{m}_e - \dot{m}_s \Rightarrow$$

$$\frac{dC.V}{dt} = Q.C_e - Q.C_s \Rightarrow$$

Considerando mistura perfeita no reservatório e substituindo, temos:

$$V/Q \cdot \frac{dC}{dt} = C - C + R$$

Integrando entre C_0 e C_t obtém-se:

$$\int_{C_0}^{C_t} V/Q \cdot \frac{dC}{dt} = \int_0^t R \cdot dt \Rightarrow C_t = C_0 - \frac{R \cdot Q}{V} \cdot t$$

A Figura 2 mostra as contagens de microrganismos viáveis ao longo do tempo de circulação através do sistema de alta pressão dinâmica a 100 MPa de uma suspensão de *L. delbruecki* e resultados obtidos da aplicação do modelo.

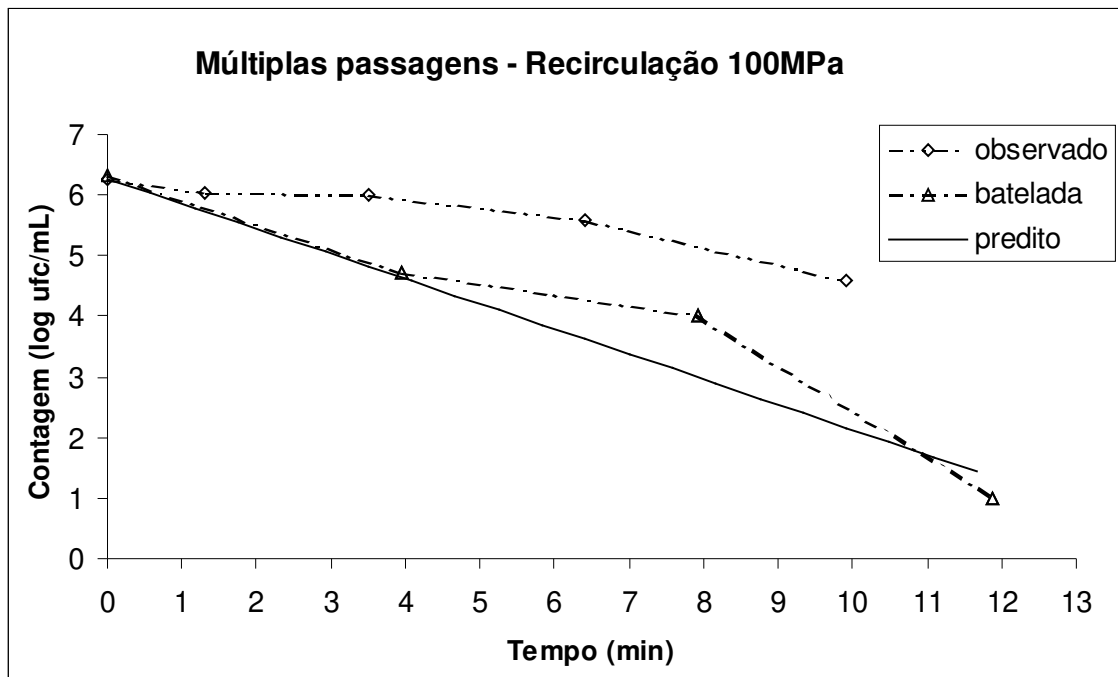


Figura 2 – Recirculação de suspensão de microrganismos pelo sistema de alta pressão dinâmica a 100 MPa. Valores obtidos sob recirculação (observado), dados obtidos por passagens sucessivas (batelada) e dados teóricos obtidos da equação (predito).

Foi observado que o modelo se aproximou do processo em batelada e houve uma divergência na curva do processo de recirculação. Tal observação mostrou que o acúmulo no sistema não é desprezível e que o fluxo do produto através do sistema não pode ser considerado do tipo “plug flow”. Utilizando um modelo de Energia pôde-se obter um comportamento semelhante quando se atribui um acúmulo (em forma de um reservatório após a válvula de homogeneização), como observado na Figura 3.

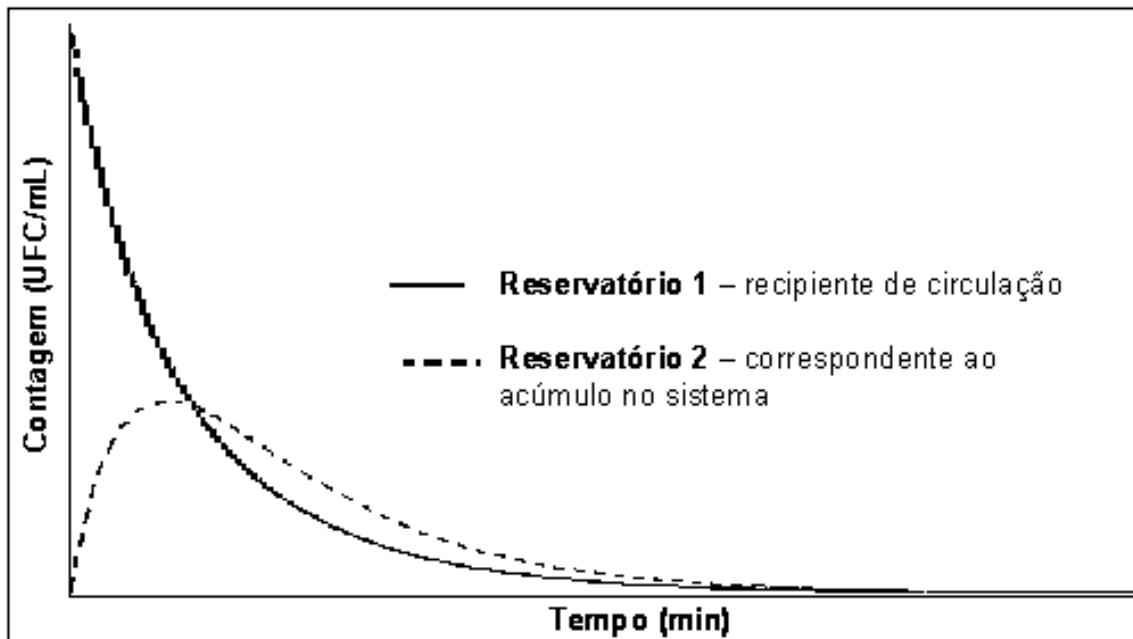


Figura 3 – resultado de simulação aplicando um modelo de Energia para descrever o fenômeno.

A curva referente ao reservatório 1 é uma função logarítmica equivalente ao modelo obtido anteriormente. A curva do reservatório 2 mostra o acúmulo em função do tempo e a contagem final é a soma das funções. Assim, pode-se concluir que o acúmulo resulta em uma divergência na curva do reservatório 1, que tende a uma aproximação pela eluição total da concentração contida no reservatório. Se considerarmos a construção da máquina, podemos observar que devido às peculiaridades do sistema de alta pressão, há fatores que favorecem o acúmulo nas tubulações e conexões do sistema, dificultando a eluição, reduzindo as velocidades médias na tubulação e criando verdadeiros reservatórios ao longo da linha. Tais detalhes construtivos explicam os resultados obtidos nos ensaios preliminares de recirculação e indicam a necessidade de um estudo de soluções de desenho para possibilitar a minimização do acúmulo no sistema necessário em um desenho sanitário adequado para fabricação de alimentos.

A Figura 4 mostra o comportamento de eluição de bactérias durante um processo de limpeza com água.

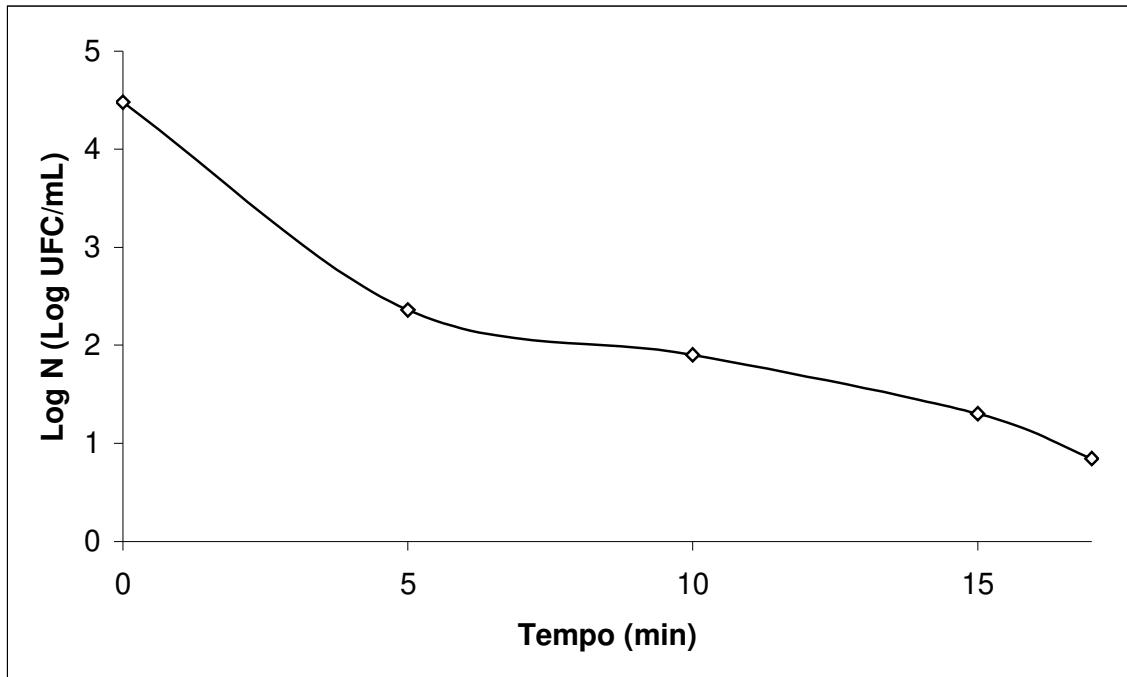


Figura 4 – Eluição de bactérias durante o processo de limpeza com água do sistema.

A Figura 4 ilustra o problema do acúmulo e mostra que inicialmente a eluição foi intensa e ocorreu rápida redução da contagem, porém no período subsequente uma lenta eluição dos microrganismos foi observada indicando novamente que ocorreu um acúmulo no processo de eluição.

ANEXO 3 – Curva de calibração de turbidez.

A Figura 1 mostra a curva de calibração que correlaciona as concentrações de uma série de diluições de padrão de formazina com a absorbância.

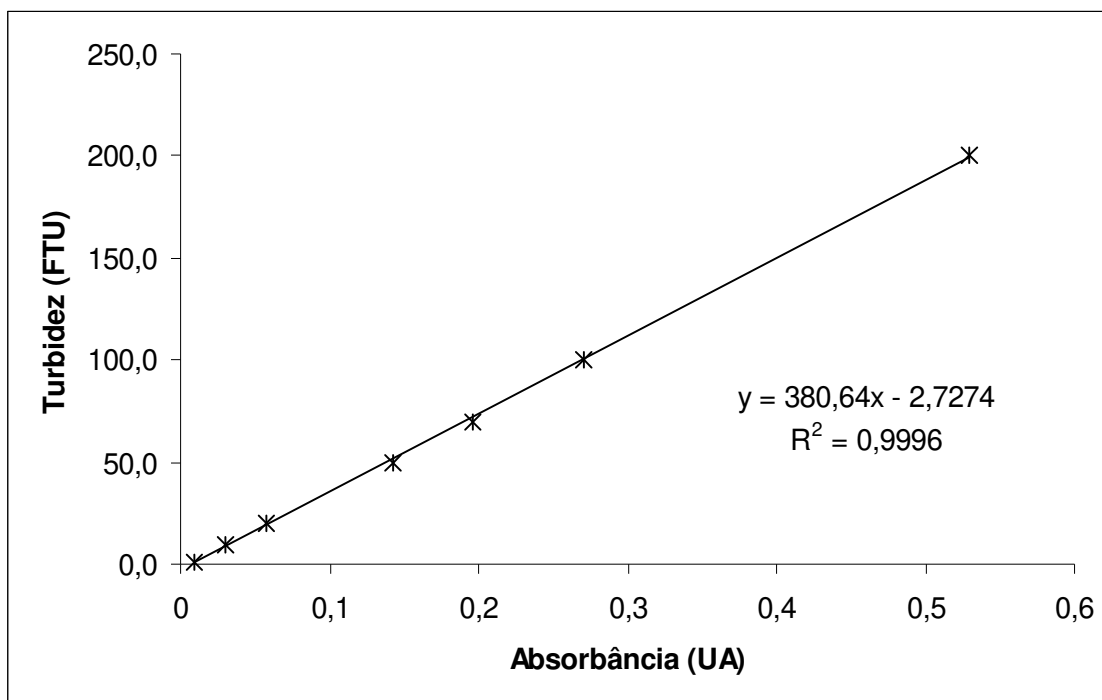


Figura 1 – Curva de calibração de turbidez. A sigla FTU corresponde a Unidades de Turbidez de Formazina.

Obteve-se, segundo a Figura 1 uma boa correlação e linearidade entre as medidas de absorbância e turbidez das soluções padrão.