

## DETERIORAÇÃO DE REFRIGERANTES POR LEVEDURAS SOFT DRINK DETERIORATION BY YEASTS

ROCHA, C. D.<sup>1</sup>; SCHMIDT, H. J.<sup>2</sup>; MONTEIRO, C.<sup>3</sup>; ODEBRECHT, E.<sup>3</sup>

1. Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Patologia, Parasitologia e Microbiologia – UFPR, Curitiba, PR.

2. Doutor do Centro de Engenharia (CENG) da Companhia Brasileira de Bebidas (AmBev), Jacareí, SP.

3. Doutoradas do Programa de Pós-Graduação em Patologia, Parasitologia e Microbiologia – UFPR, Curitiba, PR.

Recebido em: 07/2004 Aprovado em: 08/2004

### RESUMO

Refrigerantes são bebidas não alcoólicas carbonatadas e constituem ótima fonte de glicídios. A composição química adocicada, o pH menor que 4,3, a  $a_w$  maior que 0,90 e a atmosfera dos refrigerantes oferece condições favoráveis ao desenvolvimento de diversos microrganismos, incluindo leveduras deteriorantes. A deterioração ocasionada nos refrigerantes não constitui um risco à saúde das pessoas, mas este fenômeno prejudica a imagem de fábricas de refrigerantes, como também pode causar sérias perdas econômicas. Essas perdas podem ser minimizadas com o rastreamento da origem dos focos de contaminação, bem como conhecendo o risco potencial que cada levedura representa para o produto. As leveduras comumente detectadas em bebidas não alcoólicas carbonatadas, são as *Brettanomyces* sp, *Candida lipolytica*, *Candida* sp, *Criptococcus albidus*, *Cryptococcus laurentii*, *Debaryomyces hansenii*, *Hanseniaspora* sp, *Hansenula* sp, *Kloeckera* sp, *Kluyveromyces* sp, *Zygosaccharomyces baillii*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula rubra*, *Pichia* sp, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces* sp., *Saccharomycodes ludwigii*, *Schizosaccharomyces* sp, e *Zygosaccharomyces* sp.

PALAVRAS CHAVE: refrigerantes, deterioração, leveduras.

### ABSTRACT

Soft drinks are non alcoholic carbonated beverages that become an excellent source of glycidis. Sugar composition, pH lower than 4.3,  $a_w$  higher than 0.90 and atmosphere of soft drinks are conditions that contribute for the development of many microorganisms, including spoilage yeasts. Soft drink deterioration is not a health risk for people, but this phenomenon damages the beverage companies image and can yield serious economic damages. This problem could be reduced knowing the contamination focus origin, and also understanding the potential risk that each yeast represents to the product. The common yeasts found in nonalcoholic carbonated beverages are *Brettanomyces* sp, *Candida lipolytica*, *Candida* sp, *Criptococcus albidus*, *Cryptococcus laurentii*, *Debaryomyces hansenii*, *Hanseniaspora* sp, *Hansenula* sp, *Kloeckera* sp, *Kluyveromyces* sp, *Zygosaccharomyces baillii*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula rubra*, *Pichia* sp, *Saccharomyces cerevisiae* *Saccharomyces* sp, *Saccharomycodes ludwigii*, *Schizosaccharomyces* sp and *Zygosaccharomyces* sp.

KEY WORDS: soft drinks, deterioration, yeasts.

## INTRODUÇÃO

Refrigerantes são bebidas não alcoólicas carbonatadas e constituem ótima fonte de glicídios. São elaborados a partir de uma mistura de água com açúcar, em um processo no qual essa mistura é aquecida até atingir uma temperatura de 90°C, clarificada, adicionada de xarope filtrado e resfriada em um trocador de calor. A adição de aromas, sucos naturais, extratos vegetais, antioxidantes, acidulantes, corantes e conservantes é opcional. Após essa etapa, a percentagem de açúcar (°Brix) é corrigida, o xarope é transportado em tubos de aço-inox, por impulsão de bombas, a um misturador, onde é diluído, homogeneizado com água potável e CO<sub>2</sub>. Em seguida o xarope diluído é enviado à enchedora, onde ocorre o envase.

A composição química adocicada, o pH menor que 4,3, a  $a_w$  maior que 0,90 e a atmosfera dos refrigerantes oferece condições favoráveis ao desenvolvimento de microrganismos aeróbios, microaerofílicos e anaeróbios facultativos, como bactérias, leveduras e fungos filamentosos (TANIWAKI et al., 1999).

Apesar da osmotolerância e fermentação causada por leveduras em refrigerantes não constituir um risco à saúde das pessoas, esse fenômeno prejudica a imagem de fábricas de refrigerantes, como também pode causar sérias perdas econômicas (NDAGIJIMANA et al., 2004). Essas perdas podem ser minimizadas com o rastreamento da origem dos focos de contaminação, bem como conhecendo o risco potencial que cada levedura representa para o produto. Nesse sentido, torna-se importante enumerar, isolar e conhecer as propriedades das leveduras presentes nas matérias-primas e insumos utilizados como suco, açúcar, xarope, CO<sub>2</sub>, água de processo, garrafas e rolhas, fases do processo, equipamentos que entram em contato direto ou indireto com a bebida, bem como o produto final.

## PREVALÊNCIA DE LEVEDURAS EM REFRIGERANTES

De acordo com MORAIS et al. (2003) a Vigilância Sanitária do Estado de Minas Gerais analisou 100 amostras de refrigerantes coletadas aleatoriamente em estabelecimentos comerciais no interior e capital desse Estado, sob o parâmetro contagem de bolores e leveduras, no ano de 2000. A prevalência de leveduras foi: *Zygosaccharomyces rouxii*, *Rhodotorula mucilaginosa* e *Cryptococcus albidus*.

A alta concentração de açúcares e sais existentes na composição dos refrigerantes favorece a multiplicação de leveduras osmofílicas, entre as quais os gêneros mais freqüentes são *Zygosaccharomyces*, *Rhodotorula* e *Pichia* (PRIBYLOVA et al., 2003).

STRATFORD et al. (2002) menciona o isolamento de *Candida davenportii* sp. nov. como tendo sido isolada de um tanque de estocagem de xarope. Essa levedura é osmotolerante, resistente à conservantes e capaz de se desenvolver em condições muito ácidas. É considerada fonte potencial de deterioração de refrigerantes e mostrou bom crescimento em refrigerantes contendo frutas e extrato de cola.

As leveduras comumente detectadas em bebidas não alcoólicas carbonatadas, como as *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida lipolytica* e *Zygosaccharomyces baillii* as quais toleram ambientes ácidos e são resistentes aos conservantes químicos sorbato de potássio e o benzoato de sódio (BATTEY et al., 2002).

Segundo NDAGIJIMANA et al. (2004) um incidente de contaminação microbiológica foi registrado em bebidas carbonatadas sabor laranja de uma fábrica na Itália, em julho de 2001, onde 300.000 unidades foram deterioradas por *Saccharomyces cerevisiae*, levedura altamente fermentadora, causadora de turvação, deformação em garrafas e alterações no sabor e odor.

Para BACK (2001) aos baixos valores de pH das bebidas carbonatadas não alcoólicas favorecem a prevalência de deterioração por leveduras fermentadoras acidófilas ou acidotolerantes, como as *Saccharomyces* e *Zygosaccharomyces* bem como por não fermentadoras, como *Rhodotorula*, *Candida*, *Hansenula* e *Pichia*. BACK (2003) realizou um levantamento das análises microbiológicas de identificação de leveduras em cervejas e bebidas não alcoólicas carbonatadas no Laboratório de Análises Microbiológicas de Bebidas da Universidade de Weihenstephan, Munique, na Alemanha, relativo a um período de 15 anos. As mais comumente detectadas foram *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula rubra*, *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus laurentii*, *Brettanomyces* sp., *Candida* sp., *Kloeckera* sp., *Pichia* sp., *Saccharomyces* sp., *Saccharomycodes ludwigii*, *Schizosaccharomyces* sp., *Debaryomyces hansenii*, *Zygosaccharomyces* sp., *Hanseniaspora* sp., *Hansenula* sp e *Kluyveromyces* sp.

---

## FATORES QUE INFLUENCIAM A ESTABILIDADE MICROBIOLÓGICA DOS REFRIGERANTES

Componentes de refrigerantes como sucos de frutas aumentam a suscetibilidade de bebidas à contaminação microbiológica, devido a maior quantidade de nutrientes. A constatação de leveduras em alimentos indica má qualidade da matéria-prima ou falhas higiênicas ao longo do processamento. A presença de pseudomicélio visível, substância estranha à constituição normal dos refrigerantes, pode constituir-se em uma razão para a rejeição do produto em questão (MISLIVEC et al., 1992).

Segundo PITT & HOCKING (1997) é essencial à manutenção de um rigoroso programa de limpeza e sanitização na linha de produção de bebidas, pois leveduras osmofílicas podem desenvolver-se continuamente em equipamentos e sua presença no produto provavelmente será detectada apenas após um período de tempo considerado grande.

De acordo com BACK (2001) um importante fator que colabora com a contaminação por leveduras em bebidas carbonatadas não pasteurizadas é a presença de concentrações suficientes de zinco. Bebidas com quantidades de zinco acima de 0,1 – 0,2mg/L, podem apresentar alto crescimento de leveduras em curto prazo.

## IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS

A identificação de leveduras provenientes de alimentos representa difícil tarefa mesmo para estudiosos do assunto, pois as características de suas colônias e a morfologia microscópica apresentam valores limitados ao pesquisador. Muitos sistemas simplificados para identificação de leveduras têm sido publicados na literatura, bem como métodos manuais como o Enterotube da Roche e automáticos como o API da Biomerieux, que se encontram disponíveis no comércio. Infelizmente todos são direcionados à área médica e necessitam serem complementados com testes bioquímicos e fisiológicos, como a fermentação de carboidratos, assimilação de padrões em uma escala de fontes de carbono e nitrogênio e o crescimento em diversas temperaturas (HARRIGAN, 1998). Um Método satisfatório para identificar leveduras a nível de gênero é o das Regras Kluvéricas (SCHMIDT, 1991).

## PRINCIPAIS LEVEDURAS DETERIORANTES DE REFRIGERANTES E SUAS CARACTERÍSTICAS

### - *Brettanomyces bruxellensis*

Apresentam células elipsóides, fermentam dextrinas, produzem ácido acético a partir da glicose e compostos fenólicos, que fornecem sabores alterados em refrigerantes, cervejas e vinhos, sintetizados por suas enzimas extracelulares como pectinesterases e proteases (PITT & HOCKING, 1997).

### - *Candida parapsilosis*

Possuem colônias brancas, superfície fosca e quando vistas ao microscópio estereoscópico apresentam finos filamentos. Suas células em Malt Extract Ágar (MEA) possuem formato elipsóide, ocorrem isoladas, aos pares ou em cadeias. Apresentam fraco crescimento em Ágar Czapeck e Ágar Malte Acético (PITT & HOCKING, 1997).

- *Hansenula anomala*

Produzem colônias brilhosas de cor bege ou branca com aspecto rugoso em meio sólido e em meio líquido, formam uma película seca e escura. As células são esféricas ou ovais com presença de "botões" e freqüentemente formam pseudomicélio. Possuem células pequenas, ovaladas a alongadas, geralmente isoladas e formadoras de película delgada. Fermentam a glicose, galactose, sacarose, maltose, rafinose e sintetizam acetaldeído (SCHMIDT, 1991).

- *Hanseniospora valbyensis* (antigamente denominada *Kloeckera apiculata*)

Apresentam colônias de margens circulares e coloração marrom pálida. Suas células são pequenas e elipsóides, formam botões terminais ocorrendo sozinhas ou em pares. Em culturas velhas raramente são produzidos ascósporos em MEA, não apresentando crescimento em Ágar Czapek e Ágar Malte Acético. Encontram-se em bebidas, principalmente em sucos de laranja concentrados (PITT & HOCKING, 1997). São osmofílicas e fermentam rapidamente apenas a glicose (SCHMIDT, 1991).

- *Pichia membranaefaciens*

Suas colônias são brancas e podem ser facilmente distinguidas pela formação de pequenos ascósporos em Ágar Malte Acético num período de sete dias. Apresentam células alongadas com resistência à pHs baixos, sensibilidade ao calor e atividade enzimática através das pectina-metil-esterases e outras proteases extracelulares. São aeróbias, osmofílicas, fornecendo aroma de chucrute aos produtos contaminados. Fermentam rapidamente a glicose, galactose, sacarose, maltose e rafinose. Sintetizam ácido acético e ésteres ao invés de álcool (SCHMIDT, 1991).

- *Rhodotorula rubra* e *Rhodotorula glutinis*

Possuem colônias com margens circulares sendo na maioria das vezes elipsóides. Seu aspecto é mucóide de coloração rosa a vermelha e possuem a capacidade de crescer em ambientes refrigerados. Suas espécies já foram isoladas de bebidas, e podem causar sua deterioração (HARRIGAN, 1998). São resistentes a altas temperaturas e capazes de produzir lipases e proteases extracelulares. Essa levedura não é fermentadora, mas formadora de muco viscoso, desenvolvem-se com freqüência em água de poço tratada e no ar ambiente (PITT & HOCKING, 1997).

- *Saccharomyces cerevisiae*

Apresentam colônias brancas, de margens circulares e superfície brilhosa. Suas células são geralmente esféricas a cilíndricas, ocorrendo isoladas, em pares ou em cadeias. Ascósporos podem ser formados após longa incubação em meio MEA, apresentando pobre crescimento em Ágar Czapeck e Ágar malte acético. São fermentadoras de diversos açúcares como glicose, galactose, sacarose, maltose e rafinose (SCHMIDT, 1991).

- *Saccharomyces ludwigii*

Possuem células isoladas, ovaladas e com formato de solas de sapato. Fermentam a glicose, frutose, sacarose e rafinose (SCHMIDT, 1991).

- *Schizosaccharomyces pombe*

Apresentam colônias pequenas de bordos lisos, circulares, brancas e brilhantes. Suas células quando maduras possuem formato elipsóide e algumas vezes aparecem cicatrizes. Caracterizam-se pela multiplicação vegetativa por fissão lateral e por formarem ascas com quatro ascósporos. São xerofílicas, resistentes a maioria dos conservantes de alimentos como o ácido benzóico (PITT & HOCKING, 1997). Aparecem isoladas ou em pseudomicélio (SCHMIDT, 1991).

- *Zygosaccharomyces bailii*

Leveduras de colônias brancas quase hemisféricas de superfície brilhosa, com células largas e elipsóides, que se multiplicam por brotamento caracteristicamente na região subapical, ocorrendo isoladas, aos pares ou em curtas cadeias. Apresentam capacidade de crescimento em presença de ácidos fracos utilizados como conservantes, como o sórbico, benzóico, acético e propiônico, bem como em ambiente com SO<sub>2</sub> (PITT & HOCKING, 1997). Suas células são grandes, alongadas e muito granuladas, ocorrendo isoladas ou em pseudomicélio. Trata-se de leveduras osmofílicas, que fermentam lentamente (SCHMIDT, 1991)

HARRIGAN (1998) demonstrou que sua resistência a conservantes ocorre em função de sua exposição a baixos níveis de conservantes. Os focos de proliferação mais relevantes são as tubulações de enchimento, as válvulas de diafragma, medidores de pressão e porção final de filtros esterilizantes. Também podem ocorrer em óleos lubrificantes e contaminar produtos através de aerossóis formados pela movimentação das máquinas.

- *Zygosaccharomyces rouxii*

São largamente conhecidas por sua habilidade de crescer em ambientes com altas concentrações de sais e/ou açúcares, fermentadoras e deteriorantes, o que as transforma num dos maiores problemas para as indústrias de sucos de frutas, concentrados e bebidas em geral (PRIBYLOVA et al., 2003).

Apresentam colônias brancas de superfície brilhosa em MEA, não apresentando crescimento em Ágar Czapeck e Ágar Malte Acético. Ocorrem aos pares ou em grupamentos pequenos, apresentando ascósporos quando presentes em ambientes de baixa atividade de água e alta concentração de açúcares.

## CONCLUSÃO

As leveduras quando presentes nas bebidas carbonatadas não alcoólicas podem levar à sua deterioração ou determinar a estas bebidas características desagradáveis ao consumidor, denegrindo a imagem da indústria que os produziu além de levar a sérias perdas econômicas.

*Brettanomyces bruxellensis* sintetizam ácido acético a partir da glicose e compostos fenólicos, que fornecem sabores alterados em refrigerantes. *Hansenula anomala* fermentam vigorosamente a glicose, assim como outros açúcares e a partir de seus produtos pode ocorrer produção de ésteres aromáticos além de formar uma película delgada.

*Hanseniospora valbyensis* sintetizam proteases extracelulares, beta-glucosidade, acetoína, eritritol, sorbitol e etanol. *Pichia membranaefaciens* formam película branca e viscosa devido à formação de pseudomicélio sobre bebidas e apresentam resistência a conservantes. *Rhodotorula rubra* e *Rhodotorula glutinis* formam biofilmes, nos quais abriga

bactérias e leveduras fermentadoras deteriorantes de bebidas. *Saccharomyces cerevisiae* apresentam extrema capacidade fermentativa, produzem enzimas extracelulares como poli-galcturonase e proteases. *Saccharomyces ludwigii* fermentam a glicose, frutose, sacarose e rafinose. *Schizosaccharomyces pombe* são xerofílicas, resistentes à maioria dos conservantes de alimentos como o ácido benzóico. *Zygosaccharomyces bailii* desenvolvem-se em linhas de enchimento, cuja assepsia é imperfeita. Estes fatores levam essas leveduras a criar adaptação e capacidade de se desenvolver em altas concentrações de conservantes.

*Zygosaccharomyces rouxii* são capazes de crescer em aw de 0,65 em soluções de frutose e de 0,65 em soluções de sacarose/glicerol. Produzem gás e possuem a capacidade de inflar garrafas e até causar explosão das mesmas

## REFERÊNCIAS

- BACK, W. Susceptibility of new beverage products-avoiding microbial problems. Brauwelt International, 3: 218-221, 2001.
- BACK, W. Biofilme in der Brauerei und Getränkeindustrie - 15 Jahre Praxiserfahrung. Brauwelt On Line, 24/25, 2003.
- BATTEY, A. S.; DUFFY, S.; SCHAFFNER, D. W. Modeling Yeast Spoilage in Cold-Filled Ready to Drink Beverages with *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii* and *Candida lipolytica*. Applied and Environmental Microbiology. New Jersey: vol 68, nº4 p.1901-1906, 2002
- HARRIGAN, W. F. Laboratory Methods in Food Microbiology. 3.ed. San Diego: Academic Press, 1998, p. 351-359.
- MISLIVEC, P.B.; BEUCHAT, L.R.; COUSIN, M. A. Yeasts and Molds. In: VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D. F. Editor. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 3. ed. Washington: APHA; 1992. p. 239 - 243.
- MORAIS, V.A.D.; MADEIRA, J. E. G. C.; DIAS, E. C.; BONCOMPAGNI, A. C.;
- GONÇALVES, R. C. P.; CARVALHO, E. Avaliação Microbiológica de amostras de refrigerantes comercializados no Estado de Minas Gerais. Ver. Inst. Adolfo Lutz, 62 (1): 1- 4, 2003.
7. NDAGIJIMANA, M.; BELLETTI, R.; LANCIOTTI, M. E.; GUERZONI, M. E.; GARDINI, F. Effect of Aroma Compunds on the Microbial Stabilization of Orange-based Soft Drinks. J. Food Sci, 69:20-24, 2004.
8. PITT, J. I.; HOCKING, A. D. Fungi and Food Spoilage. 2.ed. Maryland: Aspen Publishers Inc. 1997.
9. PRIBYLOVA, L.; DE MONTIGNY, J.; POTIER, S.; SYCHROVÁ, H. Physiological Properties of the Osmotolerant Yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. Microbiol. Methods, 55, 2, p. 481-484 2003.
10. SCHMIDT, H. J. Moderne Mikrobiologie in Erfrischungsgetränketrieben und Brauereien. Brauwelt, v.4, p.116 -119.1994.
11. STRATFORD, M.; BOND, C.; JAMES, S.; ROBERTS, N.; STEELS, H. *Candida davenportii* sp.nov., a potential soft drinks spoilage yeast isolated from a wasp. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52, 4, p. 1369 -1375, 2002.
12. TANIWALKI, M. H.; IAMANAKA, B.T.; BANHE, A. A. Comparision of culture media to recover fungi from flour and tropical fruit pulp. J. Food Mycol. 2, p.291-302, 1999.
- THOMAS, D. S.; DAVENPORT, R. R. *Zygosaccharomyces bailii* - A Profile of Characteristics and Spoilage Activities. Food Microbiol. 2: 157-169, 1985.