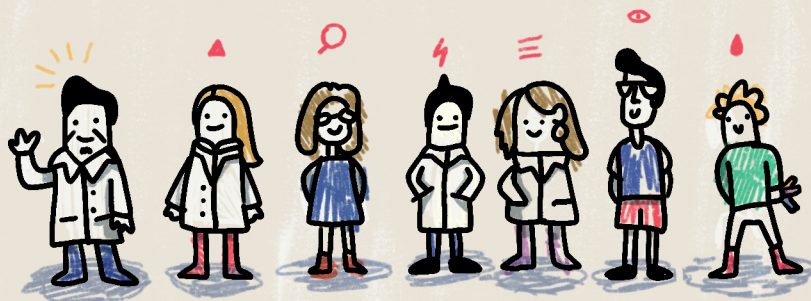


# Microbiología Cervecera

MANUAL TEÓRICO PRÁCTICO



AGRONOMIA  
FACULTAD de  
U.N.L.Pam.

FACULTAD de  
**AGRONOMIA**  
Universidad Nacional de La Pampa







Microbiología cervecera: manual teórico práctico / Lucas Pablo Dalmaso  
[et al.]; editado por Lucas Pablo Dalmaso; ilustrado por Marcos Abel Dalmaso. - la ed.  
Toay; Lucas Pablo Dalmaso, 2020.  
Libro digital, PDF

Archivo Digital: descarga y online  
ISBN 978-987-86-6088-2

1. Microbiología Aplicada. 2. Cervezas. I. Dalmaso, Lucas Pablo, ed. II. Dalmaso, Marcos  
Abel, ilus.  
CDD 663.42

#### **MICROBIOLOGÍA CERVECERA, Manual Teórico Práctico.**

Dalmaso, Lucas Pablo (edit.)

Noviembre de 2020, Toay, La Pampa, Argentina.

Corrección de estilo: *Viviana Jorgelina Cenizo*.

Diseño gráfico y maquetación: *Leopoldo Andrés Boschero*.

Ilustración de portada y contratapa: *Marcos Abel Dalmaso (@marquila\_ok)*.

ISBN 978-987-86-6088-2

Este manual fue financiado por Facultad de Agronomía, UNLPam y la Secretaría de Políticas Universitarias a través del Programa de Vinculación Tecnológica Universidades Agregando Valor.

La referencia a marcas comerciales no conlleva ni preferencia ni aval alguno de los autores ni de las instituciones de filiación de los mismos.

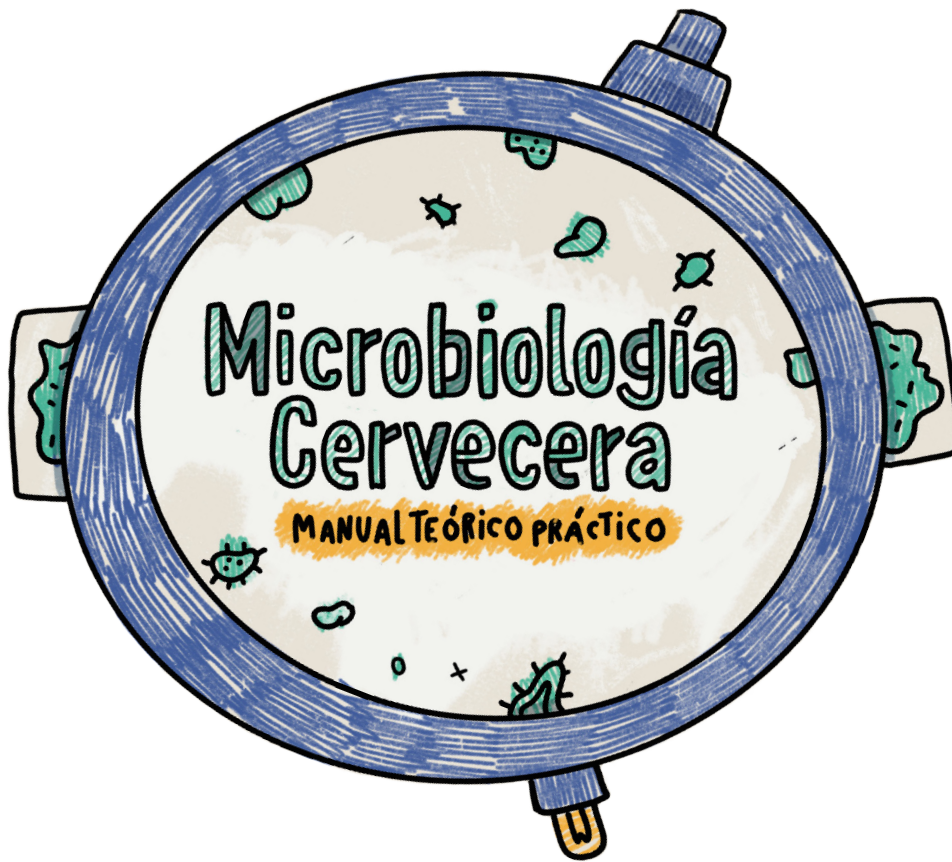


Microbiología Cervequera, manual teórico práctico tiene licencia CC BY-NC-ND 4.0. Para ver una copia de esta licencia, visite <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0>



EDITOR

Lucas Pablo Dalmaso



AGRONOMIA  
FACULTAD de  
U.N.L.Pam.

FACULTAD de  
**AGRONOMIA**  
Universidad Nacional de La Pampa



# PRÓLOGO

Al iniciarnos en la elaboración de cerveza, exceptuando a profesionales o estudiantes de carreras afines, tenemos un total desconocimiento de los procesos químicos y microbiológicos involucrados. Si queremos mejorar la calidad de nuestras cervezas, vamos a tener que comprender inexorablemente que es lo que está sucediendo en cada etapa de nuestro proceso de elaboración, al menos en un determinado grado de profundidad para poder reproducirlo de manera controlada.

Este manual es, sin dudas, un atajo a ese entendimiento y un gran aporte a la comunidad cervecera de La Pampa y a todos los cerveceros de habla hispana, ya sea que estén transitando esos primeros pasos de estudio antes de la primera cocción, hagan cerveza en casa como hobby o formen parte de un emprendiendo comercial. Comprende desde cuestiones básicas de protocolos de limpieza, hasta el manejo de levaduras para la reutilización, análisis microbiológicos para detectar contaminantes y posibles soluciones a problemas comunes que puedan surgir.

En el caso de los microcerveceros que deseen instalar un laboratorio en fábrica esta guía nos brinda la información necesaria sobre las instalaciones requeridas, los elementos con los que debemos contar para tal fin y los fundamentos para llevar adelante controles desde muy simples a más complejos, que van a ayudarnos a mejorar nuestro proceso de elaboración de forma cuantitativa en pos de garantizar la calidad y la estabilidad de nuestros productos en el tiempo y la consistencia entre lotes. Soy un convencido que el camino para lograr mejores cervezas está en la aplicación de la ciencia y la tecnología. El esfuerzo de Lucas Dalmasso y sus colaboradores en recabar toda la información presente en este manual, explicado de manera práctica y con un léxico accesible a todos, es un gran aporte en esa dirección.

**Fernando Hernández**

MERIDIANO QUINTO

*Mejor Microcervecería – Copa Argentina de Cervezas 2020*





# ÍNDICE

## CAPÍTULO 1: BASES PARA LA CORRECTA LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN

<b>1.1 LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN</b>	Pág. 19
<b>1.2 LIMPIEZA DE EQUIPOS</b>	Pág. 19
1.2.1 Agentes para limpieza de equipos	
1.2.1.1 Limpiadores de base alcalina	
1.2.1.2 Limpiadores de base ácida	
1.2.1.3 Detergentes neutros	
1.2.2 Métodos de limpieza del equipo	
1.2.2.1 Sistemas CIP	
1.2.2.2 Sistemas COP	
<b>1.3 DESINFECCIÓN / SANITIZACIÓN</b>	Pág. 21
1.3.1 Agentes desinfectantes	
<b>1.4 PROGRAMA DE LIMPIEZA Y SANITIZACIÓN</b>	Pág. 22
1.4.1 Programas CIP	

## CAPÍTULO 2: CONTAMINANTES MICROBIANOS EN CERVEZA

<b>2.1 MICROORGANISMOS</b>	Pág. 27
<b>2.2 FUENTES DE CONTAMINACIÓN</b>	Pág. 29
2.2.1 Aire	
2.2.2 Agua	
2.2.3 Malta	
2.2.4 Lúpulo	
2.2.5 Levadura	
2.2.6 Adjuntos cerveceros	
<b>2.3 MICROORGANISMOS CONTAMINANTES</b>	Pág. 30
2.3.1 Bacterias del ácido láctico (BAL)	
2.3.2 Bacterias del ácido acético	
2.3.3 Enterobacterias	
2.3.4 <i>Pectinatus</i> spp.	
2.3.5 <i>Megasphaera</i> spp.	
2.3.6 <i>Zymomonas mobilis</i>	
2.3.7 <i>Bacillus</i> spp.	
2.3.8 Levaduras ambientales	
2.3.8.1 <i>Brettanomyces</i> ssp.	
<b>2.4 SUCESIÓN MICROBIANA</b>	Pág. 34

## **CAPÍTULO 3: FERMENTACIÓN DE CERVEZAS**

<b>3.1 CALIDAD DE LA FERMENTACIÓN .....</b>	<b>Pág. 39</b>
<b>3.2 BASES PARA UNA BUENA FERMENTACIÓN .....</b>	<b>Pág. 40</b>
3.2.1 Levadura	
3.2.2 Nutrientes	
3.2.2.1 Carbohidratos	
3.2.2.2 Nitrógeno	
3.2.2.3 Oxígeno	
3.2.2.4 Zinc	
3.2.3 Control de temperatura	
3.2.4 Fermentador adecuado	
3.2.5 Monitoreo de Fermentación	
<b>3.3 CURVAS DE CRECIMIENTO DE LEVADURAS .....</b>	<b>Pág. 46</b>
3.3.1 Fase de latencia	
3.3.2 Fase de crecimiento exponencial	
3.3.3 Fase estacionaria	
<b>3.4 DENSIDAD .....</b>	<b>Pág. 48</b>
<b>3.5 ATENUACIÓN .....</b>	<b>Pág. 48</b>
<b>3.6 FLOCULACIÓN Y SEDIMENTACIÓN .....</b>	<b>Pág. 50</b>
<b>3.7 DESCANSO DE DIACETILO .....</b>	<b>Pág. 50</b>
<b>3.8 CLARIFICACIÓN EN FRÍO .....</b>	<b>Pág. 51</b>
<b>3.9 FACTORES DE ESTRÉS EN LEVADURAS .....</b>	<b>Pág. 52</b>
3.9.1 Estrés térmico	
3.9.2 Estrés por etanol	
3.9.3 Estrés osmótico	
3.9.4 Estrés nutricional	
3.9.5 Estrés oxidativo	
3.9.6 Estrés por envejecimiento	

## **CAPÍTULO 4: REUTILIZACIÓN DE LEVADURAS**

<b>4.1 REUTILIZACIÓN DE LEVADURAS .....</b>	<b>Pág. 57</b>
<b>4.2 COSECHA DE LEVADURA .....</b>	<b>Pág. 57</b>
<b>4.3 VIABILIDAD DE LEVADURAS .....</b>	<b>Pág. 60</b>
<b>4.4 TASAS DE INOCULACIÓN .....</b>	<b>Pág. 61</b>



## **CAPÍTULO 5: LABORATORIO MICROBIOLÓGICO EN CERVECERÍAS**

<b>5.1 LABORATORIO PARA CERVECERÍAS .....</b>	<b>Pág. 67</b>
<b>5.2 NORMAS DE TRABAJO EN LABORATORIOS .....</b>	<b>Pág. 68</b>
<b>5.3 ELEMENTOS Y MATERIALES MÁS FRECUENTES DE UN LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA .....</b>	<b>Pág. 70</b>
<b>5.4 MANEJO DE MICROORGANISMOS EN EL LABORATORIO .....</b>	<b>Pág. 76</b>
<b>5.5 ESTERILIZACIÓN .....</b>	<b>Pág. 76</b>
5.5.1 Métodos físicos	
5.5.1.1 Calor Directo (Flameado)	
5.5.1.2 Calor Húmedo	
5.5.1.3 Calor Seco	
5.5.1.4 Filtración	
5.5.1.5 Radiación	
5.5.2 Métodos químicos	
5.5.2.1 Mecanismos de acción de las sustancias antimicrobianas	
<b>5.6 MEDIOS DE CULTIVO .....</b>	<b>Pág. 81</b>
5.6.1 Clasificación de los medios de cultivo	
5.6.2 Preparación de medios de cultivo	
<b>5.7 DESCRIPCIÓN DE COLONIAS EN CAJA .....</b>	<b>Pág. 82</b>
<b>5.8 TÉCNICAS BÁSICAS DE MICROBIOLOGÍA .....</b>	<b>Pág. 84</b>
5.8.1 Plaqueo de medios de cultivo	
5.8.2 Dilución en serie	
5.8.3 Siembra de microorganismos	
5.8.4 Tinciones	

## **CAPÍTULO 6: MÉTODOS DE CONTROL DE CALIDAD DE LEVADURA Y CERVEZA**

<b>6.1 MUESTREO DE CERVEZA DESDE FERMENTADORES .....</b>	<b>Pág. 91</b>
<b>6.2 PRUEBA DE MOSTO FORZADO .....</b>	<b>Pág. 91</b>
<b>6.3 PRUEBA DE DIACETILO .....</b>	<b>Pág. 94</b>
<b>6.4 PRUEBA DE FERMENTACIÓN FORZADA .....</b>	<b>Pág. 95</b>
<b>6.5 PRUEBA DE ESTABILIDAD DEL MOSTO INOCULADO .....</b>	<b>Pág. 95</b>
<b>6.6 ENSAYOS DE FERMENTACIÓN .....</b>	<b>Pág. 96</b>
<b>6.7 PRUEBA DE DETERIORO DE PRODUCTO TERMINADO .....</b>	<b>Pág. 97</b>
<b>6.8 HISOPADO DE SUPERFICIES .....</b>	<b>Pág. 97</b>
6.8.1 Muestreo con hisopos de algodón estériles	
9.8.2 Muestreo húmedo con hisopos de algodón estériles con Caldo Letheen	

## **6.9 RECUESTO DE COLONIAS EN PLACA ..... Pág. 100**

6.9.1 Reglas para la expresión de resultados

6.9.2 Recuento con Agar mosto

6.9.3 Recuento con Medio WLN y WLD

6.9.4 Recuento con Medio UBA

6.9.5 Recuento con Medio ABD

6.9.6 Recuento con Medio HLP

6.9.7 Recuento con Medio LMDA

6.9.8 Recuento con Medio LWYM

## **6.10 DETERMINACIÓN DE BACTERIAS COLIFORMES ..... Pág. 110**

6.10.1 Análisis Presuntivo

6.10.2 Análisis Confirmativo

## **CAPÍTULO 7: MICROSCOPIA PARA LABORATORIOS CERVECEROS**

### **7.1 MICROSCOPIO ÓPTICO ..... Pág. 115**

7.1.1 Elementos mecánicos

7.1.2 Elementos ópticos

7.1.3 Sistema de iluminación

### **7.2 RECOMENDACIONES PARA EL USO DEL MICROSCOPIO ÓPTICO ..... Pág. 117**

### **7.3 USO DEL MICROSCOPIO ..... Pág. 117**

7.3.1 Técnica de inmersión

### **7.4 OBSERVACIÓN DE MICROORGANISMOS ..... Pág. 119**

7.4.1 Preparados frescos

7.4.2 Preparación de frotis

7.4.3 Coloración simple con Azul de Metileno

7.4.4 Coloración de Gram

7.4.5 Viabilidad de levaduras por el método de tinción con Azul de Metileno

7.4.6 Cámara de Neubauer

7.4.6.1 Recuento de levadura con Cámara de Neubauer

7.4.6.2 Cantidad de levadura necesaria para inocular un fermentador

7.4.6.3 Software ImageJ

7.4.6.4 Aplicación para celulares microBrew.AR

## **CAPÍTULO 8: SOLUCIÓN DE PROBLEMAS DE FERMENTACIÓN Y REUTILIZACIÓN**

### **8.1 PROBLEMAS RELACIONADOS CON LA DINÁMICA DE LA FERMENTACIÓN Pág. 133**

8.1.1 Retraso del inicio

8.1.2 La fermentación no termina

<b>8.2 PROBLEMAS RELACIONADOS CON LA ATENUACIÓN .....</b>	<b><i>Pág. 135</i></b>
<b>8.3 PROBLEMAS RELACIONADOS CON LA FLOCULACIÓN .....</b>	<b><i>Pág. 136</i></b>
<b>8.4 PROBLEMAS RELACIONADOS CON SABORES Y AROMAS .....</b>	<b><i>Pág. 136</i></b>
8.4.1 Diacetilo	
8.4.2 Dimetil Sulfuro (DMS)	
8.4.3 Acetaldehído	
8.4.4 Alcoholes superiores	
8.4.5 Fenoles	
8.4.6 Azufre	
8.4.7 Acidez	
8.4.8 Ácido Isovalérico	
<b>8.5 PROBLEMAS RELACIONADOS CON LEVADURA PARA REUTILIZACIÓN .....</b>	<b><i>Pág. 139</i></b>
8.5.1 Baja viabilidad de la levadura	
8.5.2 Conservación en frío de levadura cosechada	
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b><i>Pág. 141</i></b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b><i>Pág. 147</i></b>



# **CONTAMINANTES MICROBIANOS EN CERVEZA**

MICROORGANISMOS

FUENTES DE CONTAMINACIÓN

MICROORGANISMOS CONTAMINANTES

SUCESIÓN MICROBIANA





## CAPÍTULO 2: CONTAMINANTES MICROBIANOS EN CERVEZA

Gallace, María Eugenia y Dalmasso, Lucas Pablo

La cerveza es una bebida alcohólica que se elabora desde tiempos inmemoriales y, desde el punto de vista microbiológico, es un alimento seguro que no propicia el crecimiento de microorganismos patógenos. Sin embargo, es sensible al crecimiento de bacterias, hongos y levaduras, que pueden modificar las características sensoriales y analíticas del producto terminado (Assche, 1992). La exposición directa de la cerveza al ambiente puede favorecer el crecimiento y supervivencia de microorganismos que se encuentran en ella, y afectar su calidad final.

El monitoreo permanente de cada una de las etapas de producción es imprescindible para detectar contaminación microbiana. La estabilidad microbiológica del producto final puede verse comprometida desde las primeras etapas de la producción, ya que los organismos descomponedores pueden acceder en cualquier parte del proceso de elaboración. Los equipos y las materias primas pueden estar contaminados microbiológicamente, en ese caso, la cerveza no cumplirá con las expectativas del cervecero ya que los contaminantes microbianos ocasionan sabores desagradables y turbidez en la cerveza, factores que afectan directamente su calidad (Bamforth, 2002; Sakamoto y Konings, 2003).

En este capítulo, se abordará de manera general la biología de los microorganismos, se describirán microorganismos contaminantes, las fuentes de contaminación y sus efectos sobre la cerveza.

### 2.1 MICROORGANISMOS

Se denominan microorganismos a todos aquellos grupos de organismos que se asemejan entre sí por poseer una estructura y organización sencilla y tamaño muy pequeño como bacterias, protozoos, algas microscópicas y hongos que son reagrupados para su estudio en la ciencia denominada Microbiología. Los hongos son un grupo grande y variado con células más complejas (poseen núcleo celular) y se pueden clasificar en mohos, setas y levaduras. Las levaduras son hongos unicelulares cuyo metabolismo realiza el proceso de fermentación de hidratos de carbono a etanol y dióxido de carbono.

Los microorganismos se pueden agrupar según su relación con el oxígeno (O<sub>2</sub>) en aerobios y anaerobios (Tabla 2.1). Los aerobios estrictos (o simplemente aerobios) pueden crecer a concentraciones normales de oxígeno (el aire tiene un 21% de oxígeno) y respiran oxígeno en su metabolismo. Los microaerófilos, en cambio, son aerobios que pueden usar O<sub>2</sub> solo cuando está a una concentración más baja que la del aire (5 – 10% de oxígeno). Algunos organismos no pueden respirar oxígeno y reciben el nombre de anaerobios. Existen tres tipos de anaerobios: estrictos, aquellos que el oxígeno inhibe o incluso mata, aerotolerantes, que pueden tolerar el O<sub>2</sub> y crecer en su presencia aunque no lo respiren; y facultativos, aquellos que en condiciones adecuadas de nutrientes y cultivo pueden crecer en ausencia de O<sub>2</sub>, pero se desarrollan mejor si está presente (Frioni, 2005; Brock, 2015).

Tabla 2.1: Relaciones de los microorganismos con el oxígeno.

GRUPO		RELACIÓN CON EL OXÍGENO
Aerobios		
	Estrictos	Necesitan O <sub>2</sub>
	Microaerófilos	Necesitan O <sub>2</sub> , pero a concentración menor que la atmosférica



GRUPO		RELACIÓN CON EL OXÍGENO
Anaerobios		
	Estrictos	El O <sub>2</sub> es perjudicial o letal
	Aerotolerantes	No es necesario el O <sub>2</sub> No crecen mejor con O <sub>2</sub>
	Facultativos	No es necesario el O <sub>2</sub> , pero crecen mejor con O <sub>2</sub>

En microbiología, se conocen diversas formas de bacterias que pueden observarse a través del uso del microscopio. Las células de morfología esférica u ovoide se conocen como cocos, las de forma alargada, *bacilos* o *bastones*. También algunos bacilos pueden formar espirales y se denominan *espirilos*, y aquellos con forma de coma, *vibrios*. Algunas bacterias, luego de la división celular, quedan unidas formando agrupaciones, los cocos de a pares se denominan *diplococos*, cocos en largas cadenas son llamados *estreptococos*, en forma de racimos se llaman *estafilococos*, y los que se disponen formando cubos tridimensionales se llaman *sarcinas*. De la misma manera encontraremos *diplobacilos* y *estreptobacilos*.

Las bacterias, por otro lado, pueden clasificarse en dos grandes grupos en relación a la composición y estructura de la pared celular (Figura 2.1). Las Gram positivas (G+) tienen una membrana lipídica (membrana citoplasmática) rodeada externamente por una gruesa capa de peptidoglicano (pared celular). Esta gruesa capa les confiere una gran resistencia a estas bacterias. Las Gram negativas (G-) poseen una delgada capa de peptidoglicano y una segunda membrana externa con lipopolisacáridos (LPS), entre ambas membranas se encuentra el espacio periplásmico. Esta clasificación tiene importancia como primera prueba para diferenciar grupos de microorganismos. Para poder clasificarlas existe una tinción compuesta denominada “Coloración de Gram” que se describe en el capítulo 7.

La coloración de Gram fue diseñada para bacterias, sin embargo se puede utilizar en una levaduras, que se tiñen como G+ (color violeta) ya que son organismos eucariotas con paredes gruesas sin peptidoglicanos. En este caso no es la composición química sino la estructura física de la pared lo que le confiere la “Gram positividad”.

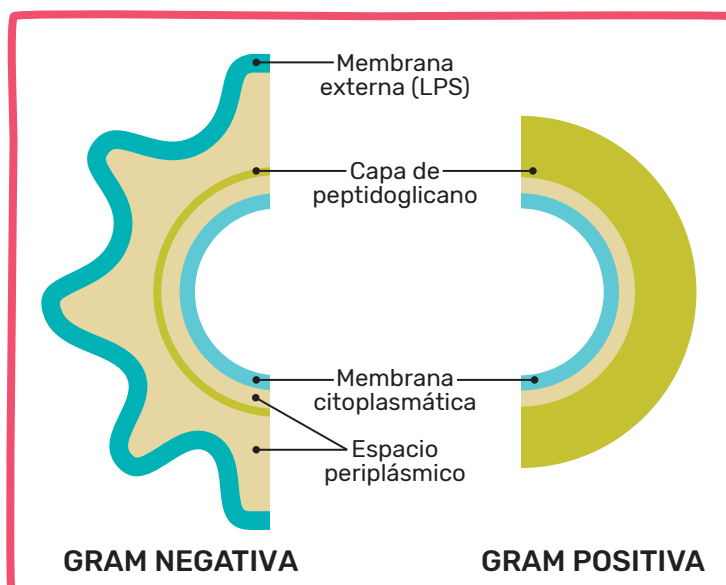


Figura 2.1: Esquema de la pared celular de bacterias Gram positivas y Gram Negativas.

## 2.2 FUENTES DE CONTAMINACIÓN

La contaminación microbiana en cerveza se puede originar de diferentes fuentes y se clasifican en:

- **Contaminaciones primarias:** son aquellos que se originan a partir de las materias primas y en los equipos de elaboración.
- **Contaminaciones secundarias:** aquellos que se introducen en la cerveza durante el embotellado, enlatado o embarrilado.

La mitad de los problemas microbiológicos documentados pueden atribuirse a contaminaciones secundarias (una lata o un barril contaminado), sin embargo las consecuencias de las contaminaciones primarias pueden ser más graves, con la posible pérdida de un lote completo (Vaughan et al., 2005).

La mayoría de los potenciales contaminantes de la cerveza se originan a partir de las materias primas y de los equipos de elaboración de cerveza mal higienizados y sanitizados. Las materias primas como la malta, el lúpulo y ocasionalmente el agua de elaboración, puede estar infectadas por microorganismos los cuales deben ser eliminados durante el proceso de preparación para evitar el deterioro del mosto y la cerveza (Hill y Bamforth, 2009).

### 2.2.1 Aire

A pesar de no verlos, hay microorganismos en el ambiente, y las partículas en suspensión funcionan como transportadoras que contaminan distintas áreas de elaboración de cerveza. Existen evidencias de presencia de bacterias de los géneros *Acetobacter*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Pectinatus*, *Pediococcus*, *Pseudomonas*, *Shigella* y *Streptococcus* y varias levaduras y mohos aislados del aire alrededor de la línea de llenado de varias cervecerías (Henriksson y Haikara, 1991).

### 2.2.2 Agua

El agua utilizada para la elaboración de la cerveza debe ser potable, es decir apta para el consumo humano y libre de microorganismos contaminantes. Por otra parte, el agua para la preparación de cerveza se hierve durante el proceso, por lo cual la mayor preocupación es introducir microorganismos durante el proceso de fermentación, por ejemplo durante la limpieza y enjuague de recipientes con agua contaminada (Hill y Bamforth, 2009).

### 2.2.3 Malta

Las cebadas y maltas contaminadas tienen consecuencias conocidas por los cerveceros, una de las más relevantes es el llamado efecto *Gushing*, que resulta de la reducción de la estabilidad de los gases y provoca la expulsión espontánea de cerveza de la botella. En algunas investigaciones de cepas fúngicas de los géneros *Fusarium*, *Nigrospora* y *Trichoderma* se aislaron pequeñas proteínas, hidrofobinas, presentes en las paredes celulares fúngicas y se demostró que provocan “Gushing” (Sarlin et al., 2005). Las hidrofobinas se combinan con el dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y forman pequeñas “capsulas” donde el CO<sub>2</sub> queda atrapado, esto le confiere una mayor susceptibilidad a las diferencias de presión, por lo que al abrirse una botella estas “cápsulas” explotan silenciosamente liberando gran cantidad de CO<sub>2</sub> y la cerveza termina expulsándose en forma de espuma.

Por otra parte, otra de las consecuencias de la contaminación de las cebadas y maltas, es la potencialidad que tienen ciertos hongos de producir toxinas, las micotoxinas (del griego

*mykes*, hongo y el latín *toxicum*, veneno) son sustancias químicas que pueden ser nocivas para el hombre y los animales. Durante la producción de cerveza, los granos contaminados pueden transmitir sustancias perjudiciales para la salud como, la aflatoxina B1, la ocratoxina A, la zearalona, el deoxinivalenol y las fumosinas B1 y B2 entre otras. Además del daño potencial para los humanos, las micotoxinas pueden también afectar el proceso de fermentación debido a su influencia en la actividad de la levadura. En la bibliografía existen antecedentes de la relación aparente entre la capacidad de determinadas cepas de hongos para producir zearalona y el “Gushing” (Hill y Bamforth, 2009).

#### 2.2.4 Lúpulo

El lúpulo es una planta conocida por sus características de aroma y sabor y por sus propiedades antisépticas. La mayoría de las bacterias Gram positivas son inhibidas por el lúpulo, aunque las bacterias Gram negativas no se ven afectadas. El secado del lúpulo luego de la cosecha, reduce las posibilidades de contaminación microbiana posterior.

#### 2.2.5 Levadura

En las cervecerías, la fuente más común de contaminación microbiana es, probablemente, durante la inoculación de levadura en el mosto. Es importante y necesario conocer la pureza microbiológica de las levaduras utilizadas para obtener un producto de calidad y evitar que se convierta en una fuente de contaminación. Actualmente, se encuentran muchas cepas disponibles en el mercado y su caracterización es imprescindible para el control de calidad de la producción (Manzano et al., 2005). La contaminación de las cepas comerciales con levaduras ambientales (en algunos casos *Saccharomyces*) y bacterias puede contribuir de manera positiva o negativa en las propiedades y características de la cerveza.

#### 2.2.6 Adjuntos cerveceros

En cervecería es común la adición de azúcares, jarabes y miel durante la ebullición del mosto. Estos adjuntos pueden transferir esporas bacterianas, principalmente del género *Bacillus*, que resisten altas temperaturas, incluso cierto periodo de ebullición y pueden persistir en la cerveza terminada (Hill y Bamforth, 2009).

### 2.3 MICROORGANISMOS CONTAMINANTES

#### 2.3.1 Bacterias del ácido láctico

Las bacterias del ácido láctico (BAL) son las principales contaminantes de las cervezas, representan aproximadamente entre el 60 y 90% de los incidentes de contaminación ya que tienen la capacidad de fermentar los azúcares a ácido láctico (Back, 1994; 2003). Se caracterizan por ser anaeróbicas facultativas, tienen forma de cocos o bastones y son Gram positivas. Si bien las BAL son útiles en la industria alimentaria y se utilizan en una amplia gama de productos fermentados, pueden al mismo tiempo deteriorar muchos alimentos y bebidas.

El agregado de lúpulo para conferir aroma y sabor a la cerveza ejerce además un efecto antibacteriano sumamente beneficioso. Los compuestos del lúpulo, principalmente iso-alfa-ácidos, tienen un efecto nocivo en las bacterias Gram positivas. Los iso-alfa-ácidos actúan como ionóforos, cambian el gradiente de pH existente a través de la membrana citoplasmática de las bacterias, y reducen la fuerza protónica, de esta manera las bacterias no pueden incorporar nutrientes y mueren. Sin embargo, algunas cepas de las BAL como las de *Lactobacillus* spp., poseen cierta ventaja adaptativa y son resistentes al lúpulo. Esta ventaja es mediada por los

genes *horA* y *horC* que codifican una bomba de expulsión de los ácidos amargos del lúpulo fuera de la célula, así como ácido glicerol teicoico que inhibe la penetración de los ácidos del lúpulo en la membrana.

**“La presencia de bacterias lácticas resistentes al lúpulo es crucial, porque esa resistencia les permite desarrollarse en la cerveza.”**

Las BAL se han adaptado para crecer en un ambiente ácido como el que se encuentra en las bebidas fermentadas, lo que produce una acidificación excesiva de la cerveza también turbidez y sabores desagradables (Back, 2005) (Tabla 2.2).

Tabla 2.2: Características de diferentes especies de bacterias del ácido láctico y su acción en la cerveza.

ESPECIES	CARACTERÍSTICAS	CONSECUENCIAS EN LAS CERVEZAS
<i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus lindneri</i> <i>Lactobacillus coryniformis</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus plantarum</i>	Tienen forma de bastón, son heterofermentativas* <sup>1</sup> y su temperatura óptima de crecimiento es de 30 °C a un pH de 4 a 5.	Producen súper atenuación debido a su capacidad para fermentar almidón y dextrinas. Acidifican la cerveza y pueden generar turbidez.
<i>Pediococcus damnosus</i> <i>Pediococcus parvulus</i> <i>Pediococcus acidilactici</i>	Tienen forma de cocos, diplococos o tétradas, son homofermentativas* <sup>2</sup> y microaerófilas. La temperatura óptima para su crecimiento es de 22-25 °C y muchas cepas crecen hasta 35 °C.	Disminuyen la estabilidad de la espuma, pueden generar diacetilo, precipitados, turbidez y acidificación de la cerveza. <i>P. damnosus</i> produce exopolisacáridos y en casos extremos proporcionan a la cerveza un aspecto gelatinoso.

\*<sup>1</sup> Además del ácido láctico producen más de un compuesto, principalmente etanol y CO<sub>2</sub>.

\*<sup>2</sup> Fermentan los azúcares y producen solo ácido láctico.

### 2.3.2 Bacterias del ácido acético

Las bacterias del ácido acético se caracterizan por ser estrictamente aerobios, están presente en todas partes ya que se encuentran en el ambiente. Se clasifican como Gram negativas, poseen forma cocoide o de bastones cortos, la temperatura óptima para su crecimiento y reproducción es de 25–30 °C, con un máximo de 37 °C. El pH óptimo para su crecimiento es de 5–6, aunque tienen capacidad de desarrollarse a pH de 3,6–3,8. Este grupo de bacterias oxidan el etanol a ácido acético en medios ácidos o neutros, característica que se usa comercialmente para la producción de vinagre, pero no hace falta decir que es muy perjudicial para el cervecero. En las cervecerías se han reportado dos géneros, *Acetobacter* que posee oxidación de tipo completa, oxida ácido acético y láctico a dióxido de carbono y agua, y *Gluconobacter* que no posee la capacidad de realizar la oxidación completa. Ambos géneros son resistentes a la actividad bacteriostática del lúpulo, el ácido y el etanol, características que les permite crecer y como consecuencia dañar la cerveza (Van Vuuren y Priest, 1996). Las bacterias del ácido acético se encuentran de manera activa en los pequeños residuos de cerveza que quedan expuestos al aire debido al mal saneamiento en general de las válvulas, llaves, trampas de aire, líneas de cerveza, debajo de las juntas, entre otros (Back, 2005).

### 2.3.3 Enterobacterias

Las enterobacterias se caracterizan por ser anaerobios facultativos, capaces de crecer en presencia o ausencia de oxígeno, son Gram negativas y poseen forma de bastones cortos. El etanol y el pH bajo, inhiben su crecimiento por lo que solo son responsables del deterioro de la cerveza en productos con bajo contenido de alcohol (< 2% en volumen) y un pH relativamente alto (> 4,2) (Priest y Stewart, 2006).

Algunas especies consideradas perjudiciales para la cerveza son *Hafnia protea*, *Rahne-lla aquatilis*, *Citrobacter freundii* y *Raoultella terrigena*. Estas especies pueden producir efectos desagradables a través de la formación de sulfuro de dimetilo (DMS) que confiere a la cerveza sabor a vegetales cocidos, y acetoína que le proporciona sabor a manteca (Importante: no confundir acetoína con acetona, son compuestos diferentes). El impacto del DMS y la acetoína persiste hasta la cerveza envasada y produce sabores indeseados más o menos fuertes, dependiendo del grado de contaminación. Además, estas bacterias secretan enzimas, peptidasas y proteinasas, que pueden afectar la estabilidad de la espuma de la cerveza (Back, 2005).

### 2.3.4 *Pectinatus* spp.

Las bacterias del género *Pectinatus*, como *P. cerevisiiphilus*, *P. frisingensis* y *P. haikarae* fermentan varios azúcares, alcoholes y ácidos orgánicos, tienen formas de bacilos alargados, son Gram negativas y anaeróbios estrictos. Pueden crecer a temperaturas entre 15–40 °C, siendo óptimo entre 30–32 °C. Estas bacterias pueden crecer en cualquier cerveza, siempre que el valor de pH sea superior a 4,4 y el contenido de oxígeno sea muy bajo (< 0,3 mg/L).

*Pectinatus* spp. puede identificarse en base a la concentración de grandes cantidades de ácido propiónico y sulfuro de hidrógeno en la cerveza, este último le confiere olor a huevo podrido y turbidez (Haikara y Henriksson, 1992). También producen diversos ácidos grasos, ácido acético, dimetil sulfuro (DMS) y en menor proporción acetoína.

### 2.3.5 *Megasphaera* spp.

Estas bacterias se caracterizan por ser Gram negativas, son de forma ovalada o circular, agrupadas en pares o en cadenas de cuatro y anaeróbicos estrictos. El rango de temperatura de crecimiento es de 15–37 °C, con un óptimo de 28–30 °C. Su potencial para deteriorar cervezas está restringido por su sensibilidad al etanol (> 2,8% v/v) y al pH ácido (Haikara y Lounatmaa, 1987). Algunas especies representativas de este género contaminante de cerveza son *M. cerevisia*, *M. paucivorans* y *M. sueciensis*.

El género *Megasphaera* produce varios ácidos orgánicos (acético, valérico, isovalérico) y ácidos grasos, especialmente ácido butírico y sulfuro de hidrógeno. Los signos de deterioro incluyen turbidez y sabores extraños de la síntesis de compuestos orgánicos de ácido sulfúrico (Haikara y Helander, 2002). Sin embargo, pueden pasar varias semanas antes de que la turbidez sea evidente (Briggs, 2004). Además, es un contaminante secundario típico en las salas de embotellado o enlatado, y es común que se encuentre en cervezas envasadas no pasteurizadas. Su comportamiento es muy similar al de *Pectinatus* spp. Las contaminaciones mixtas de esta especie con *Lactobacillus brevis* o *L. casei* también son frecuentes. Con esta última, se produce un crecimiento en dos etapas, en la primera *Lactobacillus* sp. produce ácido láctico que *Megasphaera cerevisia* utiliza a través de su metabolismo en la segunda etapa (Back, 2005).

### 2.3.6 *Zymomonas mobilis*

Es una bacteria Gram negativa, anaeróbica facultativa con forma de bastón. Se caracterizan por su modo único de catabolismo entre las bacterias, obtiene energía química a través de la degradación de nutrientes orgánicos transformándolo en etanol (fermentación etanólica).



Esta especie crece en condiciones anaeróbicas pero tolera el oxígeno, puede fermentar glucosa y fructosa pero no maltosa. Es tolerante al etanol y puede sobrevivir a fermentaciones de mostos de altas densidades en las que se forman 12–13% v/v de etanol (tolera hasta 16% v/v). Tiene una temperatura de crecimiento óptima relativamente alta de  $25 \pm 3$  °C, por eso tiende a ser una de las bacterias de descomposición más común en las cervecerías que producen tipo Ale en comparación con aquellas que elaboran Lager a temperaturas más bajas. El mosto infectado produce acetaldehído con aroma característico a manzana podrida, y forman además, etanol, ácido acético, ácido láctico, acetoína y glicerol (Van der Kühle y Jespersen, 1998). El valor de pH de la cerveza no se reduce o solo ligeramente.

En cervezas envasadas contaminadas, puede ocurrir sobrecarbonatación. Un sabor afrutado no deseado evoluciona en las cervezas, probablemente relacionado principalmente con los metabolitos sulfuro de hidrógeno y acetaldehído. También se forman fuertes neblinas y sedimentos, y las cervezas no cumplen con las expectativas del consumidor (Back, 2005).

### 2.3.7 *Bacillus* spp.

Se trata de un bacilo Gram positivo, esporulado, anaerobio facultativo y móvil. La temperatura de crecimiento es entre 5 y 55 °C y su óptimo de 30–37 °C. Algunas cepas pueden provocar intoxicación alimentaria causando diarrea y dolor abdominal que puede durar hasta 24 horas (CDCP, 1994). Se han encontrado *Bacillus cereus* y *Bacillus licheniformes* en algunas cervezas de elaboración doméstica pero no es habitual en aislamientos en cervecerías.

### 2.3.8 Levaduras ambientales

Las levaduras ambientales (salvajes) son aquellas que no han sido domesticadas, y que se encuentran naturalmente en el ambiente y en las materias primas, por lo cual no están bajo el control del cervecero y pueden resultar en cervezas con aromas y sabores indeseados. Estas levaduras se conocen colectivamente como levaduras ambientales (Deák, 2008) y se las clasifica en *Saccharomyces* y no *Saccharomyces* (Boulton y Quain, 2006). Habitualmente la contaminación con levaduras ambientales puede reconocerse por la producción de compuestos fenólicos. Si bien la ebullición del mosto elimina la mayoría de los microorganismos y luego se inocula con levaduras comerciales, también es el momento en el que otros tipos de levaduras no deseadas pueden colonizar el mosto durante el inicio de la fermentación.

La mayoría de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* no pueden utilizar dextrinas y estas persisten en la cerveza, donde contribuyen a la plenitud y la sensación en boca. Algunas cepas clasificadas originalmente como *S. diastaticus* se reclasificaron como *S. cerevisiae* var. *diastaticus*, poseen glucoamilasa y, en consecuencia, pueden utilizar dextrinas. La contaminación de las fermentaciones con levaduras diastáticas conduce a una súper atenuación del mosto y cervezas densidad final baja; ocasionalmente, se han utilizado para producir las llamadas cervezas “ligeras”.

La contaminación con levadura diastásica de la cerveza embotellada no pasteurizada es potencialmente peligrosa, ya que pueden desarrollarse concentraciones anormalmente altas de dióxido de carbono con el consiguiente riesgo de explosión de botellas. Incluso las cervezas embotelladas hacen espuma y se detiene el proceso de extracción.

Otra levadura contaminante es *Pichia membranefaciens*, frecuente en la cerveza y el vino. Las especies de *Brettanomyces* y *Dekkera* son productoras de ácido acético, aunque fermentativas, generalmente no causan una amenaza al proceso de elaboración habitual de la cerveza dado que no pueden propagarse en condiciones anaeróbicas (Priest y Stewart, 2006).

Las levaduras como *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Torulaspora* y *Zygosaccharomyces*, pueden causar serios problemas en la fermentación. Son potencialmente capaces de competir



con la levadura de cultivo y, aunque generalmente no la matan, crecen más rápido, por lo que desplazan a la levadura de cultivo en generaciones sucesivas. Las levaduras silvestres no flocculan bien y generalmente pasan al acondicionamiento, donde también pueden tener efectos organolépticos perjudiciales en las cervezas de post fermentación.

El crecimiento de levaduras silvestres puede causar la producción de sabores desagradables, particularmente por la síntesis de compuestos fenólicos considerados indeseables en la mayoría de los estilos de cerveza especialmente cuando se encuentran en una concentración excesiva. A pesar de esto, se sabe que estos compuestos son contribuyentes esenciales del sabor y aroma característico de las cervezas blancas belgas (hechas con trigo no malteado), cervezas alemanas Weizen (hechas con trigo malteado) y cervezas Rauch. Sin embargo, en muchas otras cervezas Ales especiales, el sabor fenólico es importante para la percepción general (Vanbeneden et al, 2008).

#### 2.3.8.1 *Brettanomyces* spp.

Las levaduras del género *Brettanomyces* son conocidas por su importante papel en la producción de cervezas Lambic, Gueuze y otras cervezas especiales de origen belga (Van Oevelen et al., 1976; Martens, 1996; Vanderhaegen et al., 2003). En la última década se incrementó el uso de *Brettanomyces* spp. para producir cervezas.

Las especies de este género habituales en cervcerías son *B. bruxellensis* (con mayor número de cepas) y *B. anomalus*. Estas levaduras son de crecimiento más lento que las levaduras de cerveza habitual y son capaces de realizar fermentaciones a partir de cultivo puro. Algunas de las cepas de *Brettanomyces* son capaces de completar la fermentación en 35 días (Yakobson, 2010).

El papel del oxígeno en el crecimiento y la producción de ácido acético por *Brettanomyces* spp. ha sido cuidadosamente estudiado en vinos y fermentaciones alcohólicas industriales (Ciani y Ferraro, 1997; Abbott et al., 2005a, 2005b). Se ha demostrado que cantidades moderadas a bajas de oxígeno estimulan la producción de biomasa celular, y en condiciones semiaeróbicas producen mayor crecimiento celular (Aguilar Uscanga et al., 2003). Los niveles de etanol y ácido acético que se producen durante el cultivo discontinuo aeróbico dependen de los niveles de aireación.

El género *Brettanomyces* utiliza glucosa y etanol para la producción de ácido acético bajo niveles elevados de oxígeno. Sin embargo Freer (2002) demostró que no todas las cepas pueden usar ambos compuestos como fuentes de carbono y que existe una alta variabilidad en los niveles de ácido acético producido por diferentes cepas. También se ha demostrado que temperaturas más altas disminuyen el tiempo requerido para alcanzar la concentración celular máxima, con tasas de crecimiento óptimas entre 25 y 32 °C (Brendam et al., 2008).

## 2.4 SUCESIÓN MICROBIANA

Existen cervezas especiales donde las fermentaciones mixtas son deseadas, y generan estilos particulares como las Lambic de origen belga. Estas cervezas pueden servir de modo ejemplificador para explicar una sucesión microbiana.

La cerveza Lambic se produce por fermentación espontánea y en ella se encuentran diversos microorganismos. Van Oevelen et al. (2014) y Verachtert (1995) lograron identificar más de dos mil bacterias y levaduras e identifican cuatro fases en este tipo especial de elaboración de cerveza:

- **Fase de enterobacterias:** desde el tercer al séptimo día desde de la producción del mosto hasta los 30 o 40 días. Se caracteriza por presencia de bacterias como *Enterobacter* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Hafnia alvei*, y levaduras como *Hanseniaspora uvarum*, *Dairensis naumovia* y *Saccharomyces uvarum*.

- **Fase de fermentación principal:** se establece durante el segundo, tercer y hasta el cuarto mes desde la elaboración del mosto y se caracteriza por el aislamiento de *Saccharomyces cerevisiae*, *S. bayanus/pastorianus* y *S. uvarum*.
- **Fase de acidificación:** inicia después de tres o cuatro meses y se caracteriza por el aumento de *Pediococcus* spp. y ocasionalmente *Lactobacillus* spp.
- **Fase de maduración:** ocurre luego de seis u ocho meses, donde *Brettanomyces* sp. es frecuente.

A nivel local existen cervecerías artesanales en las que algunas de sus cervezas son de fermentación mixta, sin embargo el escenario más habitual son las cervezas de monocultivo. En éstas es ideal que no esté presente ningún microorganismo foráneo a la cepa de levadura elegida por el cervecero, de todas maneras, siempre existe riesgo de contaminación microbiológica debido a que la producción de cerveza no es un proceso estéril y el mosto es un ambiente rico nutrientes y se encuentra vulnerable ante microorganismos oportunistas. Una vez que el mosto es transformado en cerveza por la levadura, es mucho más resistente a las contaminaciones microbianas, pero aun así se mantiene la amenaza constante de contaminación.

Ocasionalmente, las cervezas de monocultivo se contaminan por poblaciones mixtas de *Lactobacilos*, *Pediococos*, *Pectinatus* y *Megasphaera*. En esos casos, el deterioro generalmente ocurre en dos fases. Primero, las bacterias del ácido láctico se desarrollan eliminando el oxígeno residual y producen principalmente ácido láctico, que posteriormente es utilizado como fuente de carbono de los contaminantes de cerveza estrictamente anaeróbicos *Pectinatus* y *Megasphaera* (Back, 2005).