

Grado en Biología

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

Microorganismos termorresistentes en la producción de cerveza. Estudio inicial.

Microorganismos termorresistentes na produción da cervexa. Estudo inicial.

Thermoresistant microorganisms in the production of beer. Initial study.



Lucía Pardo Ripoll

Julio, 2017

Tutor(es) Académico: Carmen Rioboo Blanco
Pablo Fidalgo Paredes

Dña. Carmen Rioboo Blanco, Profesora Contratada Doctora Interina y D. Pablo Fidalgo Paredes, Profesor Asociado tipo 3, del Área de Microbiología del Departamento de Biología de la Universidad de La Coruña

INFORMAN:

Que el presente Trabajo de Fin de Grado presentado por la alumna LUCÍA PARDO RIPOLL y titulado

“Microorganismos termorresistentes en la producción de cerveza. Estudio inicial.”

“Microorganismos termorresistentes na produción da cervexa. Estudo inicial.”

“Thermoresistant microorganisms in the production of beer. Initial study.”

ha sido realizado en el Laboratorio de Microbiología y autorizan su presentación para que pueda ser juzgado por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, expiden y firman el presente informe en A Coruña, a 20 de julio de 2017.

Fdo.: D. Pablo Fidalgo Paredes

Fdo.: Dña. Carmen Rioboo Blanco

Índice

Introducción	1
Objetivo	5
Material y métodos	5
Elección de los puntos de muestreo	5
Toma de la muestra	6
Medios de cultivo	6
Simulación del proceso de pasteurización.....	7
Recuento de microorganismos viables por siembra en placa.....	7
Aislamiento y obtención de cultivos puros	8
Determinación de la temperatura de destrucción termal	9
Determinación del tipo de pared celular	9
Tinciones de las cepas	10
Resultados y discusión	10
Tratamiento de pasteurización y obtención de cultivos puros.....	10
Caracterización térmica de los cultivos puros obtenidos	11
Conclusiones	18
Bibliografía	21

Resumen

La cerveza es el alimento resultante de la fermentación, mediante levaduras seleccionadas, de un mosto cervecero obtenido a partir de materias primas naturales: el agua, la cebada malteada o malta y el lúpulo.

Los problemas microbiológicos asociados a la producción de cerveza son, en su práctica totalidad, aquellos relacionados con la presencia de malos olores y alteraciones visibles causadas por el crecimiento de microorganismos ajenos a los que participan en la fermentación, bien durante la elaboración de la cerveza o bien en la cerveza como producto terminado. Los contaminantes microbianos que encontramos pueden incluir desde las denominadas levaduras y mohos salvajes hasta una serie de géneros bacterianos como *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Pectinatus*.

En el proceso de producción de la cerveza, la estabilización microbiológica del producto elaborado tiene por función la eliminación de todos los microorganismos que pudieran producir alteraciones en las cualidades organolépticas de la cerveza y/o suponer una modificación en la calidad del producto. La estabilización térmica del producto o pasteurización puede realizarse antes del envasado (pasteurización flash, ultrafiltración), o estabilización después del envasado (túneles de pasteurización).

La simulación de la pasteurización flash a 75 °C de muestras de cerveza especial y sin alcohol, permitió el aislamiento de microorganismos termorresistentes representados únicamente por bacterias Gram-positivas.

Las bacterias Gram-positivas con forma de coco representan la mayoría de la población termorresistente, y se caracterizan todas ellas porque un pequeño porcentaje de la población es capaz de sobrevivir a tratamientos térmicos flash de 80 - 85 °C en 1,5 min. Ninguna de ellas fue capaz de soportar tratamientos térmicos a 90 °C en 2 min.

También se aislaron bacterias bacilares Gram-positivas formadoras de esporas. En este caso, la forma vegetativa no soporta el tratamiento a 75 °C, pero la spora es viable en tratamientos a 100 °C de temperatura final.

Son necesarios nuevos estudios que nos permitan identificar las especies, caracterizar bien el comportamiento de las bacterias cocoides en los tratamientos entre 75 y 85 °C, así como determinar la capacidad de estas bacterias de crecer en el producto final y de aquí dar lugar a su alteración microbiológica.

Resumo

A cervexa é o alimento resultante da fermentación por lévedos seleccionados, dun mosto de cervexa obtido a partir de materias primas naturais: auga, malta e lúpulo.

Os problemas microbiolóxicos asociados coa produción de cervexa son, case enteiramente, aqueles relacionados coa presenza de cheiros e cambios visíbeis causados polo crecemento doutros microorganismos que non son aqueles implicados na fermentación, ben durante a fabricación da cervexa ou

ben na cervexa como produto acabado. Os contaminantes microbianos que atopamos poden incluír dende lévedos e fungos silvestres ata unha serie de xéneros bacterianos, como *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Pectinatus*.

No proceso de produción da cervexa, a estabilización microbiolóxica do produto procesado ten a función da eliminación de todos aqueles microorganismos que son capaces de causar alteracións nas cualidades organolépticas da cervexa e/ou conducen a unha modificación na calidade do produto. A estabilización térmica do produto ou a pasteurización pode realizarse antes do envase (pasteurización flash, ultrafiltración), ou despois do envasado (pasteurización túnel).

A simulación da pasteurización flash a 75 °C das mostras de cervexa especial e sen alcohol, permitiu o illamento de microorganismos termorresistentes representados únicamente por bacterias Gram-positivas.

As bacterias Gram-positivas con forma de coco representan a maioría da poboación termorresistente, e caracterízanse todas elas porque un pequeno porcentaxe da poboación é capaz de sobrevivir a tratamentos térmicos flash de 80 – 85 °C en 1,5 min. Ninguna delas foi capaz de soportar tratamentos térmicos a 90 °C en 2 min.

Tamén illáronse bacterias bacilares Gram-positivas formadoras de esporas. Neste caso a forma vexetativa non soporta o tratamento a 75 °C, pero a espóra é viable en quentamentos a 100 °C de temperatura final.

Son necesarios novos estudos que nos permitan identificar as especies, caracterizar ben o comportamento das bacterias cocoides nos tratamentos entre 75 e 85 °C, así como determinar a capacidade destas bacterias de crecer no produto final e dar lugar á súa alteración microbiolóxica .

Abstract

Beer is the food resulting from the fermentation, by selected yeasts, of a brewer's wort obtained from natural raw materials: water, malted barley or malt and hops.

The microbiological problems associated with the beer production are almost entirely those related to the presence of bad smells and visible alterations caused by the growth of microorganisms outside of those that participate in fermentation, either during the brewing process or in the beer as a finished product. The microbial contaminants include from the so-called yeasts and wild fungi to a number of bacterial genus such as *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Pectinatus*.

In the brewing, the microbiological stabilization of the beer has the function of preventing the growth of microorganisms that may cause alterations in the sensory characteristics of the beer and/or provoke a change in the final quality of the product. Thermal stabilization of the product or pasteurization can be carried out before packaging (flash pasteurization, ultrafiltration), or after packaging (pasteurization tunnels).

The simulation of the flash pasteurization at 75 °C of special and alcohol-free beer samples allowed the isolation of heat-resistant microorganisms, only represented by Gram-positive bacteria.

Gram-positive coccus bacteria represent the foremost heat-resistant population and they are characterized by being able to survive up to 80 - 85 °C/1.5 min heat flash procedures. Nevertheless none of them were capable of withstanding 90 °C / 2 min heat treatment.

Bacillary spore-forming Gram-positive bacteria were also isolated. But in this case, the vegetative state does not survive to the 75 °C treatment, otherwise the spore is feasible in 100 °C process.

Further research is needed to identify species, to characterize the behaviour of coccus bacteria (75 and 85 °C treatments) and to determine the growth of these bacteria in the final product.

Palabras clave: pasteurización, Bacterias Gram-positivas, cerveza, industria cervecera.

Palabras clave: pasteurización, Bacterias Gram-positivas, cervexa, industria cervexeira.

Keyword: pasteurization, Gram-positive bacteria, beer, brewing.

Introducción

La cerveza es el alimento resultante de la fermentación, mediante levaduras seleccionadas, de un mosto cervecero obtenido a partir de materias primas naturales, tal y como se define en el *Real Decreto 678/2016 por el que se aprueba la norma de calidad de la cerveza*. Mosto cervecero es aquel procedente de malta de cebada, sola o mezclada con otros cereales (maíz, arroz,...), en el que el almidón se transforma en azúcares por digestión enzimática, sometido a un proceso de cocción y aromatizado con flores de lúpulo.

Cuatro son los elementos imprescindibles para la fabricación de una cerveza, tal y como hoy la conocemos: el agua, la cebada malteada (la malta), la levadura y el lúpulo. Se permite la utilización de otros productos amiláceos o también azúcares siempre y cuando la malta represente, al menos, el 50 % en masa del total de la materia prima empleada (*Real Decreto 678/2016 por el que se aprueba la norma de calidad de la cerveza*).

El almacenamiento y conservación de estas materias primas debe realizarse a una temperatura adecuada, por debajo de los 20 – 22 °C para evitar la contaminación y desarrollo de microorganismos que crezcan y puedan alterar la calidad de los ingredientes. Por este motivo, las salas de almacenamiento cuentan con cámaras refrigeradas con controles de temperatura (Calleja Colorado, 2013).

El proceso de producción (Figura 1) del que se obtiene como resultado el producto final llamado cerveza es muy complejo. Se inicia en el malteado y termina en el envasado. Entre ambos, destacan otros procesos como la molienda, la maceración, la filtración, la cocción, el enfriamiento del mosto, la fermentación, la maduración, la clarificación, la carbonatación y el pre-llenado (Hijos de Rivera, 2010a).

Tal y como se define en el *Real Decreto 678/2016 por el que se aprueba la norma de calidad de la cerveza*, según las características físico-químicas podemos distinguir, entre otros, los siguientes tipos de cerveza:

- Cerveza especial: Cerveza con un extracto seco primitivo superior o igual al 13 por 100 en masa e inferior al 15 por 100 en masa.
- Cerveza sin alcohol: Cerveza cuya graduación alcohólica sea menor al 1 por 100 en volumen.

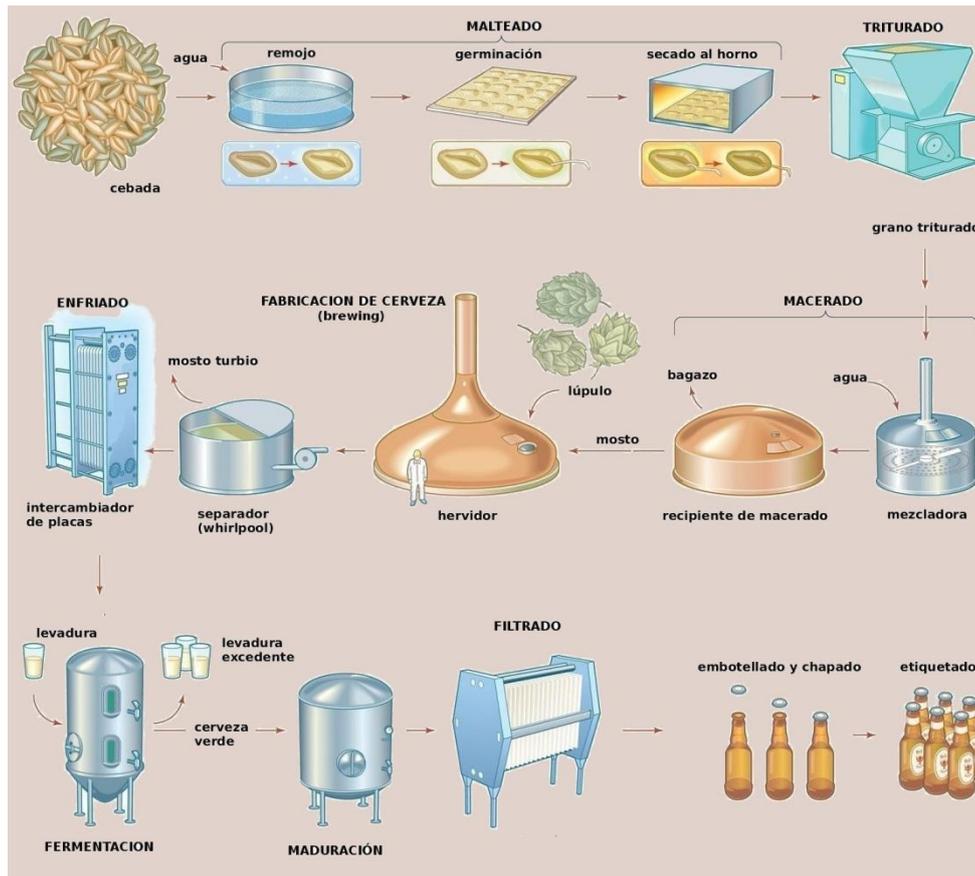


Figura 1: Proceso de elaboración de la cerveza (Encyclopaedia Britannica, Inc, 2012).

Los problemas microbiológicos asociados a la producción de cerveza son, en su práctica totalidad, aquellos relacionados con la presencia de malos olores y alteraciones visibles causadas por el crecimiento de microorganismos ajenos a los que participan en la fermentación, bien durante la elaboración de la cerveza o bien en la cerveza como producto terminado (Varnam y Sutherland, 1997; Hornsey, 2002). Esto afecta negativamente al proceso de producción de la misma, a la calidad del producto final y a su vida útil.

A lo largo de las últimas décadas, la adopción por la industria alimentaria de normas de higiene y seguridad alimentaria, así como las mejoras en el diseño y construcción de equipos, junto con la amplia aplicación de la refrigeración, la pasteurización y la ultrafiltración han reducido la incidencia de las alteraciones por contaminaciones de origen microbiológico. Sin embargo, siempre existe el riesgo de sufrir una alteración, cuyas consecuencias financieras, tanto directas como indirectas, pueden ser lo suficientemente graves como para amenazar la continuidad de las compañías cerveceras más pequeñas (Varnam y Sutherland, 1997; Hornsey, 2002).

En general, la cerveza no es un buen medio para que tenga lugar el crecimiento microbiano, lo que se refleja claramente en el escaso número de microorganismos que son capaces de crecer en ella (Varnam y Sutherland, 1997). En la cerveza existen cinco factores intrínsecos que controlan el crecimiento microbiano y que deben ser tolerados en su conjunto por cualquier microorganismo que pretenda desarrollarse en ella, éstos son: el bajo pH, el bajo potencial de oxido-reducción, el relativamente bajo contenido en

nutrientes, la presencia de etanol y de otros metabolitos, y la presencia de las isohumulonas del lúpulo que son compuestos antimicrobianos en el sentido de que disipan el gradiente de pH trans-membrana de los microorganismos, inhibiendo así el crecimiento y la posible descomposición del producto (Haakensen *et al.*, 2009; Bokulich y Bamforth, 2013).

Los contaminantes microbianos pueden incluir, junto a las denominadas levaduras y mohos salvajes, a una serie de géneros bacterianos (Tabla 1) pertenecientes a grupos como las bacterias ácido acéticas, ácido lácticas, *Enterobacteriaceae* o anaerobias Gram-negativas como el género *Pectinatus* (Jespersen y Jakobsen, 1996; Sakamoto y Konings, 2003).

Tabla 1: Contaminantes bacterianos más frecuentes en una industria cervecera (Hijos de Rivera, 2010b).

Mosto	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Enterobacter, Escherichai, Citrobacter, Kleibsiella, Serratia, Hafnia, Obesubacterium</i> • <i>Pseudomonas</i> • <i>Bacillus</i> • <i>Micrococcus, Kocuria</i> • <i>Lactobacillus, Pediococcus, Lactococcus</i> • <i>Acetobacter, Gluconobacter</i>
Levadura	<ul style="list-style-type: none"> • Bacterias del mosto • <i>Pediococcus, Lactobacillus, Lactococcus</i> • <i>Kocuria</i> • <i>Pectinatus</i>
Fermentación	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Pediococcus, Lactobacillus</i> • Bacterias del mosto • <i>Acetobacter, Gluconobacter</i>
Almacenamiento	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Pediococcus, Lactobacillus</i>
Cerveza embotellada	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Pediococcus, Lactobacillus, Lactococcus</i> • <i>Megasphaera, Pectinatus</i> • <i>Bacillus, Pseudomonas, Kocuria</i>

La elaboración de cervezas con bajo contenido en alcohol es un caso particular, ya que la eliminación prácticamente total de un factor de estrés no solo facilita el crecimiento de microorganismos alterantes de la cerveza sino que también permite el crecimiento de otros microorganismos. Las cervezas bajas en alcohol requieren un tratamiento de pasteurización para ser estables, pero a su vez la ausencia de etanol provoca que la pasteurización sea menos eficaz que en el caso de cervezas normales (Varnam y Sutherland, 1997; Hornsey, 2002).

La pasteurización es un tratamiento térmico que tiene por objeto la estabilización biológica de la cerveza y así evitar el desarrollo de microorganismos. La cerveza se puede pasteurizar después de haber sido envasada (lata o botella) utilizando túneles de pasteurización, o antes del envasado (barril o botella) mediante un pasteurizador-flash.

Durante el proceso de pasteurización en túnel, las botellas o latas deberán pasar por un túnel pasteurizador donde serán sometidas al siguiente tratamiento térmico:

- Pre calentamiento hasta 60 °C.
- Pasteurización a 60 - 62 °C durante 20 min.
- Enfriamiento hasta 20 °C.

En la pasteurización flash, la cerveza, antes de ser envasada, es sometida a una brusca subida de temperatura hasta alcanzar los 75 °C seguida de una bajada brusca hasta los 4 °C (Hijos de Rivera, 2010c). La cerveza se mantiene a 72 – 75 °C durante unos treinta segundos en un tubo de mantenimiento, de modo que el tratamiento total en el pasteurizador lleva sólo unos dos minutos, con lo que las cualidades organolépticas de la cerveza no se ven tan afectadas como en el túnel (Guía de mejores técnicas disponibles en España del sector cervecero, 2005).

Debe tenerse en cuenta que la modificación de los factores de estrés con el fin de suprimir el crecimiento de una clase dada de microorganismos puede crear las condiciones necesarias para permitir el crecimiento de otra clase de microorganismo (Varnam y Sutherland, 1997). Así, mientras se han reducido considerablemente los problemas causados por bacterias ácido acéticas con la instauración de condiciones altamente anaeróbicas en la cerveza almacenada, al mismo tiempo se han creado las condiciones necesarias para el crecimiento de bacterias anaerobias estrictas Gram-negativas, tales como *Pectinatus* (Varnam y Sutherland, 1997).

Los métodos de control de calidad deben ser precisos y fiables para que haya una detección e identificación rápida de aquellos microorganismos que causan el deterioro de la cerveza. Estos métodos son vitales para que las industrias cerveceras supervisen la calidad del lote. Si no se llevan a cabo estas medidas se tendrá que llevar a cabo la retirada de productos contaminados, que no solo provoca una pérdida monetaria sino que resultará perjudicial para la reputación de la empresa (Haakensen *et al.*, 2009).

El control de calidad de la cerveza (Figura 2) se basa en la filtración sobre membrana y cultivo en placa, que se está viendo desplazado por técnicas basadas en PCR (Hijos de Rivera, 2010c). Para el control de calidad, el inconveniente principal es que los microorganismos, que no se ven inhibidos por los factores descritos anteriormente, van a disponer de un cierto tiempo para poder proliferar. Por este motivo, el control requiere un análisis sobre grandes cantidades de producto para detectar pequeñas concentraciones de patógenos (Hijos de Rivera, 2010c).



Figura 2: Control de calidad microbiológica del producto final.

Objetivo

El objetivo del presente trabajo es estudiar la presencia de microorganismos alterantes termorresistentes durante el proceso de la elaboración industrial de distintos tipos de cerveza, realizando una primera caracterización de las cepas aisladas en cuanto a sus parámetros de resistencia térmica.

Material y métodos

Elección de los puntos de muestreo

Para llevar a cabo la recreación y optimización a nivel de laboratorio del proceso de pasteurización industrial, así como el posterior aislamiento e identificación de microorganismos, es necesario que la toma de muestras sea representativa.

Tras unas pruebas iniciales con mosto de cebada al final de la etapa de cocción, se decidió junto con el personal técnico de la empresa tomar muestras cercanas al punto de pasteurización antes del envasado del producto, para poder recrear unas condiciones similares al proceso industrial.

Los puntos de muestreo finalmente elegidos fueron los tanques de pre-llenado (Figura 3) de cerveza especial y sin alcohol (a partir de ahora "0,0"), donde se almacena la cerveza procedente de la sala de filtración a una temperatura de 0 °C. Esta temperatura evita el desprendimiento de dióxido de carbono, además de inhibir el crecimiento bacteriano. El tiempo mínimo de permanencia de la cerveza en la sala de pre-llenado es de 24 horas.

Una vez transcurrido este periodo de 24 horas, la siguiente etapa es el proceso de pasteurización, tratamiento térmico que tiene por objeto la estabilización

biológica de la cerveza y así evitar el desarrollo de microorganismos en el producto final.

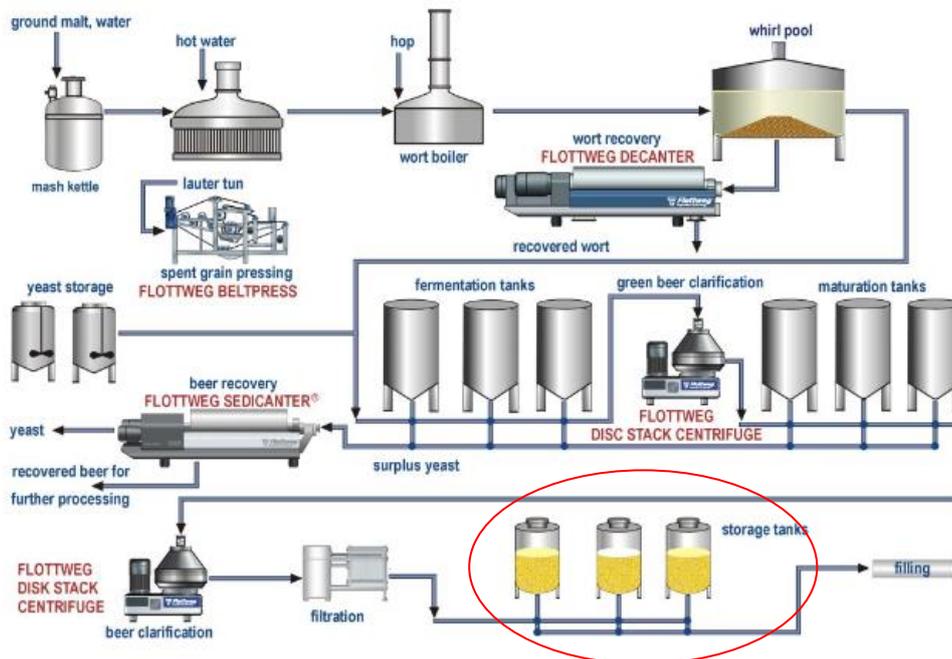


Figura 3: Diagrama de producción cervecera (Hijos de Rivera S.A, 2010a).

Toma de la muestra

La retirada de las muestras de los tanques de pre-llenado es necesario hacerlo en condiciones de asepsia para que estas sean representativas y no se alteren los resultados.

Tanto la muestra de cerveza 0,0 como la correspondiente a la de cerveza especial se recogen en botes estériles, con un toma-muestras esterilizado previamente y con un soplete para evitar cualquier tipo de contaminación externa.

Desde el momento de su recogida y hasta la realización de los distintos ensayos, las muestras se mantienen en condiciones de refrigeración (4 °C).

Medios de cultivo

El medio utilizado para el cultivo de microorganismos es el Agar de Contaje en Placa (PCA; *Plate Count Agar*) (Tabla 2), enriquecido con un suplemento de Agar hasta alcanzar una concentración final de 12 g/L.

Tabla 2: Composición del medio de cultivo PCA.

Medio de cultivo PCA	
Triptona	5,0 g/L
Extracto de levadura	2,5 g/L
Dextrosa	1,0 g/L
Agar	9,0 g/L

Se esteriliza a 121 °C durante 15 min en autoclave y se reparte en placas Petri estériles en una cámara de flujo laminar.

Para llevar a cabo diluciones seriadas o los ensayos de pasteurización, se preparan tubos de ensayo con agua de peptona al 2% (p/v) y se esterilizan en autoclave a 121 °C durante 15 min.

Para realizar cultivos puros en el presente estudio, se ha utilizado el Caldo de Triptona de Soja (TSB; *Tryptic Soya Broth*) (Tabla 3), medio de cultivo líquido que favorece el crecimiento microbiano.

Tabla 3: Composición del medio de cultivo TSB.

Medio de cultivo TSB	
Soja	3,0 g/L
Cloruro de sodio	5,0 g/L
Fosfato de potasio	2,5 g/L
Dextrosa	2,5 g/L

Una vez preparado, se reparte en tubos de ensayo con tapón serológico y se esteriliza a 121 °C durante 15 min en autoclave.

Simulación del proceso de pasteurización

El proceso de pasteurización que se ha simulado es el de pasteurización por flash.

Para la realización del ensayo de tratamiento térmico, se toman alícuotas de las muestras de cerveza especial (ESP) y cerveza sin alcohol ("0,0") en tubos de vidrio finos para que el intercambio de calor entre el baño termostático y la muestra sea lo más rápido posible. El volumen de muestra tratada se eligió de modo que todo el tubo quedase inmerso en el agua del baño termostático. En paralelo con las muestras, se coloca un termómetro en un tubo testigo con igual volumen de agua que se utiliza para monitorizar el proceso de calentamiento. Una réplica no sometida a tratamiento térmico se reserva a 4 °C como control.

Una vez que el termómetro del tubo testigo alcanza los 75 °C, se procede a recoger los tubos y colocarlos en hielo para que se produzca una bajada brusca de temperatura hasta que alcancen los 4 °C.

Recuento de microorganismos viables por siembra en placa

Para estudiar la eficacia del proceso térmico sobre la disminución de la población bacteriana contaminante del producto, se procedió a determinar la población de supervivientes mediante la siembra en superficie en placas Petri con medio PCA, tanto de las muestras sometidas al tratamiento de calor como de las del control sin tratar, siguiendo el esquema representado en la Figura 4.

Cada dilución se siembra por duplicado y se incuba en la estufa a 30 °C durante un periodo de 24 - 48 horas. Las diluciones seriadas son necesarias para que los recuentos en placa sean correctos, ya que para que estos sean

estadísticamente fiables el número de UFC (unidades formadoras de colonias) por placa tiene que estar entre 30 y 300.

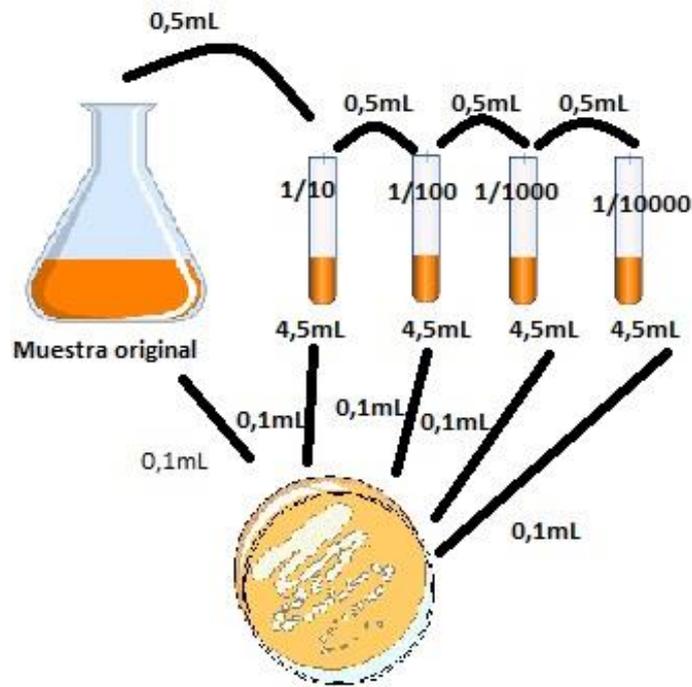


Figura 4: Esquema que muestra el proceso de preparación de diluciones seriadas.

Aislamiento y obtención de cultivos puros

A partir de las colonias obtenidas en las muestras de producto sometidas al tratamiento de pasteurización se procede a realizar cultivos puros de cada una de ellas.

La técnica utilizada para la obtención de cultivos puros fue la de aislamiento por siembra en estría (Figura 5). A partir de las colonias aisladas, se obtiene los cultivos puros en un medio de cultivo líquido.

Ambas técnicas es necesario realizarlas en condiciones de asepsia con el uso de la llama y de alcohol.



Figura 5: Método aislamiento en estría (Brock, 2008).

Determinación de la temperatura de destrucción termal

Una vez obtenidos los cultivos puros de las distintas colonias se realizarán de cada una de ellas 7 réplicas para ser sometidas a un tratamiento térmico con distintas temperaturas; cada una de las réplicas corresponde con una temperatura diferente.

Se toma una alícuota del cultivo puro obtenido y se diluye con agua de peptona estéril, y esta suspensión bacteriana se reparte en alícuotas de 1mL en tubos de ensayo de vidrio fino estériles.

De las 7 réplicas preparadas una se utilizará como control y no se someterá a ningún tratamiento térmico; las 6 restantes serán sometidas a tratamientos térmicos a distintas temperaturas, en un baño a 100 °C, de tal modo que, entre los 75 °C y los 100 °C, a cada intervalo de 5 °C se irá retirando uno de los tubos que se enfría inmediatamente en agua con hielo.

Tras aplicar el tratamiento térmico a todas las muestras se realizarán diluciones seriadas de cada una de las muestras tratadas y se sembrará por duplicado en superficie en placas de Petri con medio TSA, siempre en condiciones asépticas.

Determinación del tipo de pared celular

Para determinar el tipo de pared celular de las cepas aisladas, se utilizó el test del KOH.

Para ello, en un portaobjetos se deposita una gota del KOH al 3%. Con un asa curva previamente esterilizada en la llama se coge un inóculo de la colonia que se quiere comprobar y se mezcla con la solución de KOH.

Si se forma un hilo entre el asa y la solución quiere decir que la colonia es Gram-negativa; si al cabo de unos minutos no aparece ningún hilo, la colonia pertenece a las Gram-positiva.

Tinciones de las cepas

Para la observación de las cepas aisladas, se realizan una tinción negativa y una tinción de esporas.

La tinción negativa se utiliza para observar la forma y tipo de agregación del microorganismo ya que este tipo de tinción no requiere la aplicación de calor, lo que evita la formación de artefactos con respecto a la morfología de las células. (Brock, 2008).

Sin embargo, la tinción de esporas es algo más laboriosa, ya que requiere el uso de dos colorantes distintos, verde de malaquita y safranina, y de calor. Para realizar la tinción de esporas se usarán cultivos en fase estacionaria para que las bacterias produzcan esporas por lo que se utilizaron cultivos tras 24 horas de incubación.

Resultados y discusión

En el proceso de producción de la cerveza, la estabilización microbiológica del producto elaborado tiene por función la eliminación de todos los microorganismos que pudieran producir alteraciones en las cualidades organolépticas de la cerveza y/o suponer una modificación en la calidad del producto (Guía de mejores técnicas disponibles en España del sector cervecero, 2005). Son básicamente dos los sistemas que actualmente se aplican para la estabilización microbiológica de cerveza: estabilización en frío mediante ultrafiltración, y estabilización térmica (pasteurización). En cuanto al momento en el que se realiza la estabilización, podemos encontrarnos estabilización antes del envasado (pasterización flash, ultrafiltración), o estabilización después del envasado (túneles de pasterización).

Tradicionalmente se ha utilizado la pasteurización en túnel con una temperatura cercana a los 60 °C durante 10 - 20 minutos. Estas condiciones ofrecen normalmente una estabilidad biológica segura. Sin embargo, la pasteurización puede afectar adversamente las cualidades sensoriales de la cerveza, comprometiendo negativamente su calidad, siendo mayor este efecto cuando la presencia de oxígeno disuelto es alta (Cerna Castro, 2007).

Tras distintos análisis se pudo concluir que al aumentar la temperatura hasta los 70 – 75 °C y reducir el tiempo no se producían alteraciones en la calidad organoléptica del producto final. Por eso, la cerveza embotellada es tratada actualmente por pasteurización flash, la cual nos permite alcanzar altas temperaturas en muy poco tiempo (Cerna Castro, 2007). Debido a que la cerveza es una bebida delicada, se pueden formar con facilidad sabores desagradables debido a la pasteurización.

Tratamiento de pasteurización y obtención de cultivos puros

La pasteurización flash también se puede aplicar a la cerveza destinada al envasado en barriles y botellas. El pasteurizador de placas está compuesto por tres secciones. En las dos primeras secciones, la cerveza se calienta hasta unos 72 °C con agua caliente o vapor y se mantiene a esta temperatura

durante unos treinta segundos en un tubo de mantenimiento. En la tercera sección, la de enfriamiento, la cerveza se enfría a 0 °C.

El diseño experimental utilizado permitió reproducir adecuadamente el tratamiento térmico de un pasteurizador flash, como se observa en la Figura 6, aunque con un tiempo de residencia de la muestra entre 72 y 75 °C en torno a los 75 segundos.

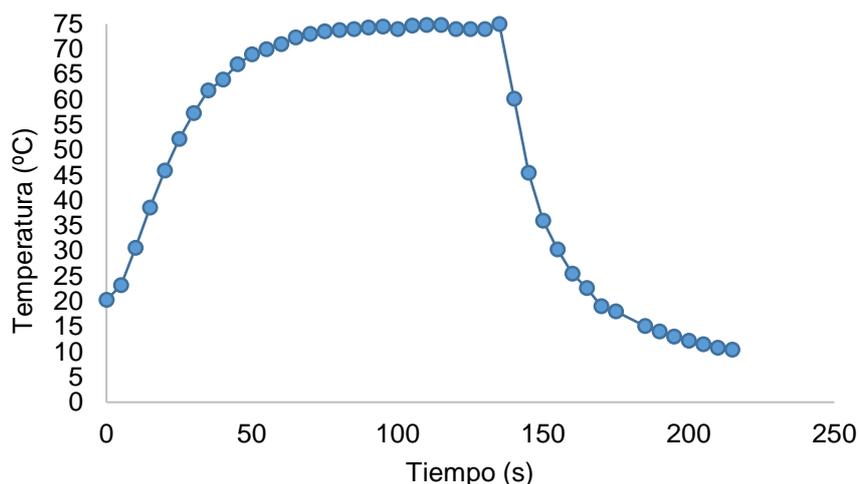


Figura 6: Registro de temperaturas del ensayo de simulación de la pasteurización.

Tras el primer ensayo de un tratamiento térmico simulando un pasteurizador flash, se obtuvieron cuatro colonias capaces de sobrevivir al tratamiento térmico (Tabla 4).

En la muestra de cerveza especial (ESP) se obtuvo una colonia a la que se le asignó el código 1-ESP, mientras que de la muestra de cerveza sin alcohol (0,0) crecieron 3 colonias diferentes, cuyos códigos asignados respectivamente fueron 1-0,0; 2-0,0; 3-0,0.

Tabla 4: Recuento del número de colonias en cada tipo de cerveza tras el proceso de pasteurización a 75°C. (“ESP”: cerveza especial; “0,0”, sin alcohol).

Muestra	Colonias obtenidas	Código asignado
ESP	1	1-ESP
0,0	3	1-0,0; 2-0,0; 3-0,0

Caracterización térmica de los cultivos puros obtenidos

En el presente estudio, se llevó a cabo una pasteurización flash de los cultivos puros obtenidos para determinar la temperatura de destrucción termal siguiendo el diseño descrito en Materiales y Métodos, tomando como referencia los 75 °C como temperatura inicial (Figura 7).

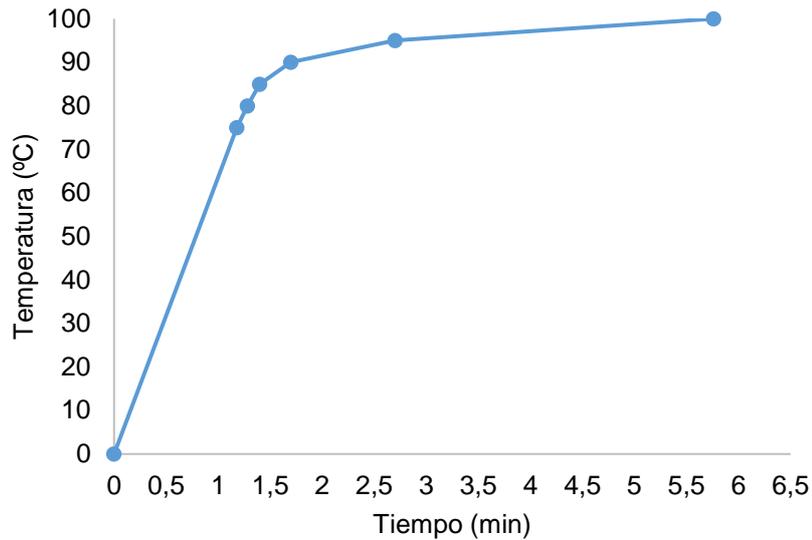


Figura 7: Tratamiento térmico llevado a cabo en los cultivos puros obtenidos en distintos tipos de cerveza sometidas a pasteurización previa a 75 °C.

A continuación se describen los resultados obtenidos para cada uno de los cultivos aislados.

Cerveza sin alcohol (0,0)

Cepa 1-0,0

Las pruebas tintoriales y de Gram realizadas nos indican que esta cepa se trata de un coco Gram (+), que se agrupa principalmente en forma de diplococos (Figura 8).



Figura 8: Tinción negativa de la cepa 1-0,0. (100x)

Con los recuentos obtenidos (Figura 9) a partir de los ensayos realizados con la cepa 1 de la muestra de cerveza 0,0, podemos concluir que hay una notable reducción poblacional (número de UFC/mL) entre el control y la muestra tratada a 75 °C, por lo que parte de la población es muy sensible al estrés térmico. Sin embargo, entre 75 °C y 85 °C de tratamiento no se registraron cambios relevantes en la mortalidad de la cepa. A partir de 90 °C no se observó crecimiento en las muestras tratadas, lo que sugiere que esa temperatura determina el límite de resistencia térmica de la bacteria.

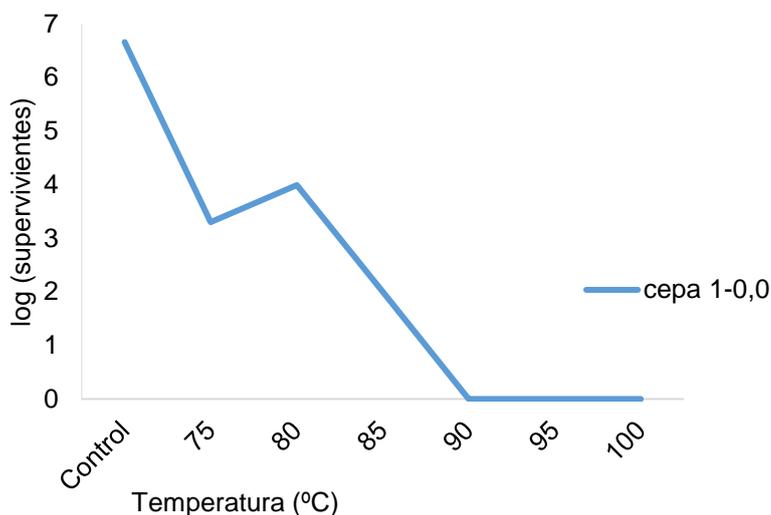


Figura 9: Recuento en placa de la cepa 1-0,0 tras el tratamiento térmico.

Cepa 3-0,0

Tras someter a la cepa 3-0,0 a distintos tratamientos térmicos, se puede observar que no hay una relación inversa entre el aumento de temperatura y la población superviviente (Figura 10). También observamos que hay una clara reducción en el número de UFC/mL entre el control y el tratamiento a 75 °C. Esto indica que a 75 °C se produce la muerte de la célula vegetativa. A partir de esa temperatura los datos no siguen el patrón de supervivencia de las células vegetativas, este hecho sugiere que esta cepa se corresponde a un microorganismo esporulante. En base a esto, a partir de 75 °C la supervivencia registrada se correspondería a esporas de dicha cepa resistentes al tratamiento térmico.

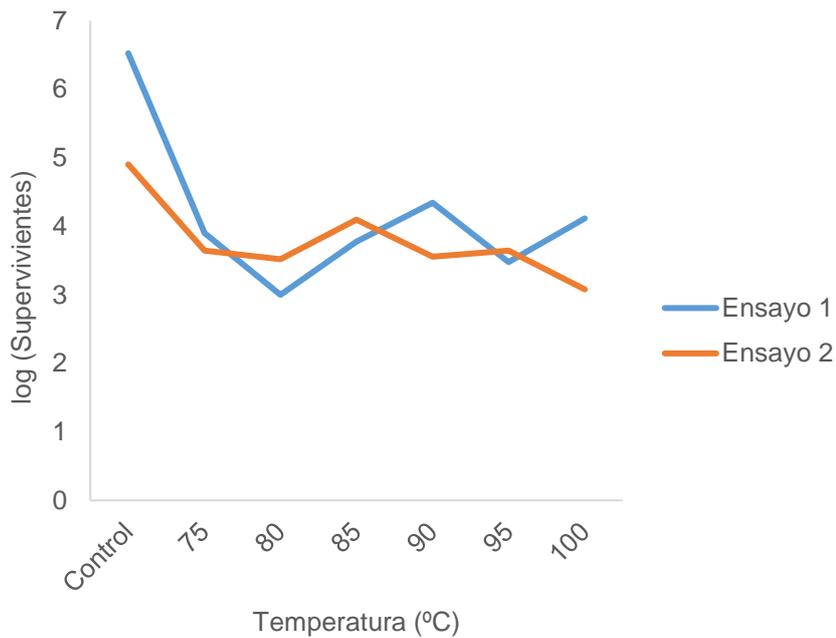


Figura 10: Recuento en placa de la población superviviente de la cepa 3-0,0 (cerveza sin alcohol) tras el tratamiento térmico a distintas temperaturas.

Esta hipótesis se verificó una vez realizadas las distintas tinciones. En la tinción de esporas se observó la presencia de esporas en cultivos en fase estacionaria, mientras que con la tinción negativa (Figura 11) se observó con mayor claridad la forma del organismo, tratándose en este caso de un bacilo.

Por último, en base a la prueba de KOH, esta cepa bacteriana se caracterizó como Gram-positiva.

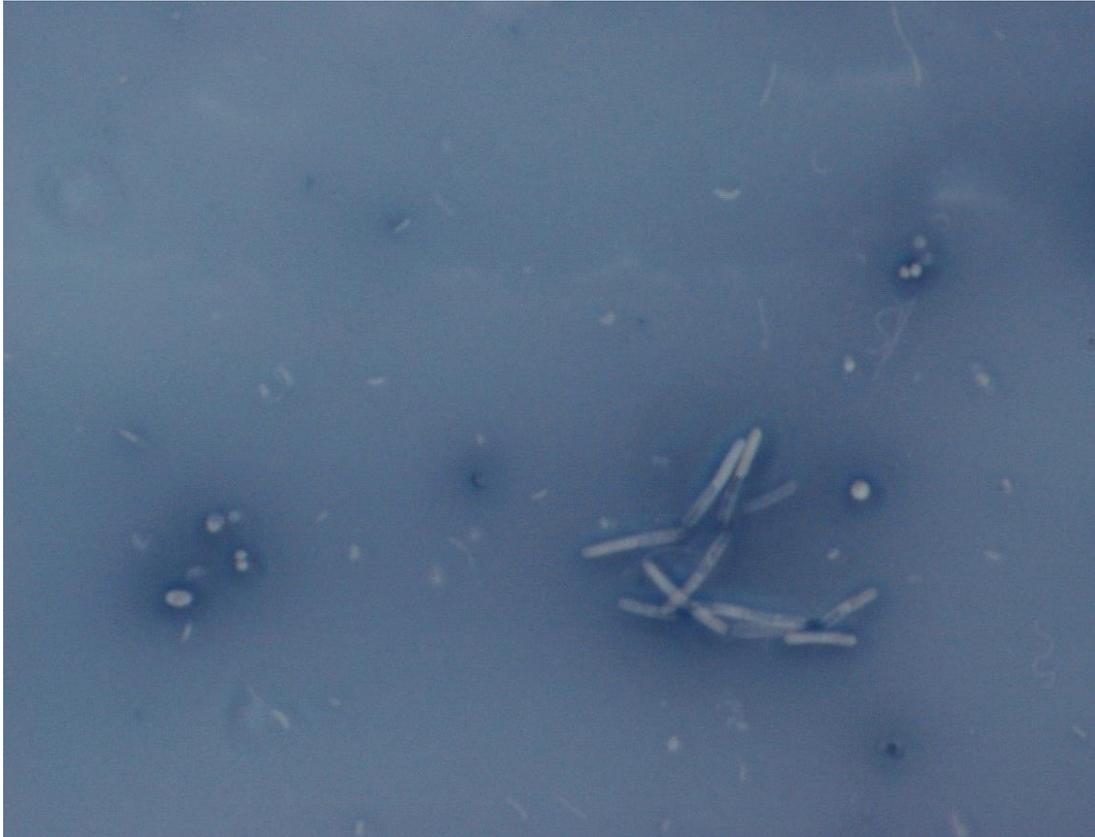


Figura 11: Tinción negativa de la cepa 3, muestra 0,0. (100x)

Cepa 1-ESP (cerveza especial)

Las cepas codificadas como 1-ESP y 2-0,0 mostraron el mismo comportamiento en los ensayos de tratamiento térmico, así como la misma morfología de colonia en la tinción negativa. Por este motivo, aun cuando es necesaria la confirmación de la especie, se presentan los resultados como si de una única especie se tratara.

Tras la observación de los recuentos pertenecientes a la cepa 1 aislada a partir de la muestra de cerveza especial (ESP) (Figura 12) podemos concluir que cuando tiene lugar un aumento de la temperatura se produce un decrecimiento poblacional hasta 90 °C. A partir de este punto, no encontramos crecimiento; esto indicaría que esta especie bacteriana no soporta crecimiento a temperaturas superiores a 85 °C.

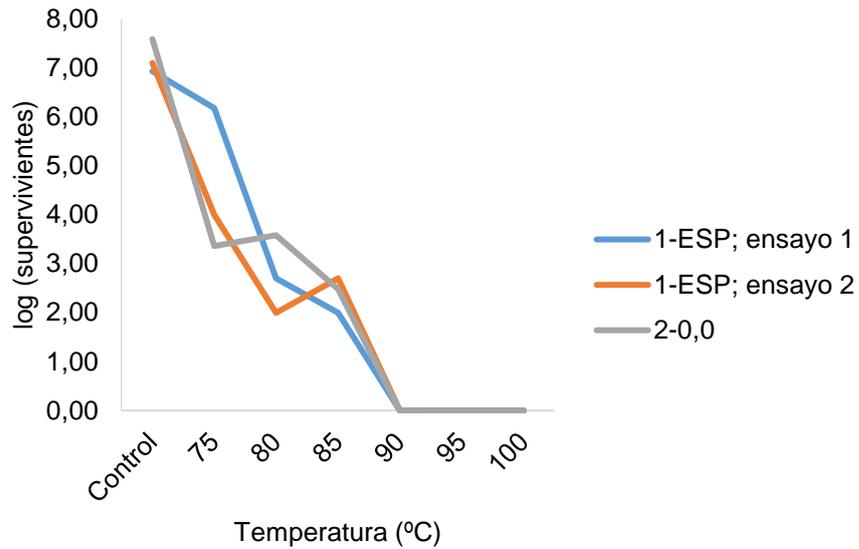


Figura 12: Recuento en placa de la población superviviente de la cepa 1-ESP (cerveza especial) y 2-0,0 (cerveza sin alcohol) tras el tratamiento térmico a distintas temperaturas

Con la tinción negativa (Figura 13) se observó que presentan forma de coco y un elevado porcentaje de agrupaciones formadas por entre 2 y 4 células.

La prueba de KOH realizada a esta cepa caracterizó a la misma como perteneciente al grupo de las bacterias Gram-positivas.

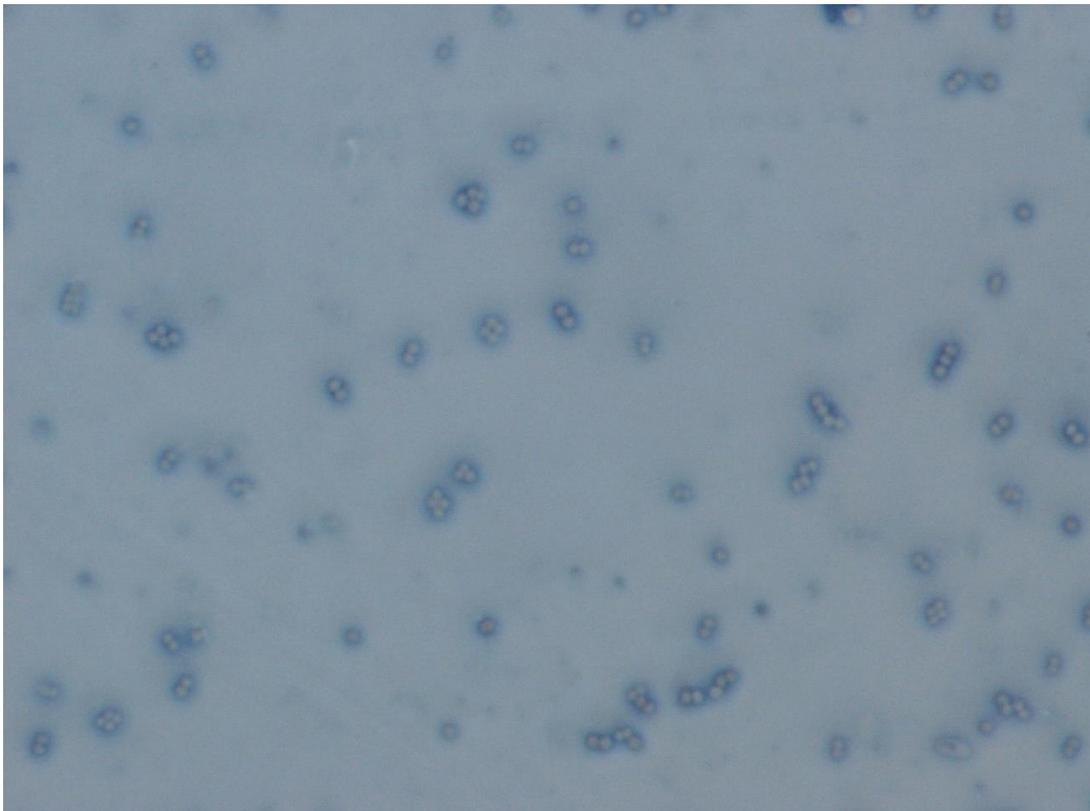


Figura 13: Tinción negativa de la cepa 1, muestra ESP. (100x)

Todas las cepas aisladas en este ensayo pertenecen al grupo de las bacterias Gram-positivas. Dentro de este grupo podemos encontrar diferentes géneros

bacterianos capaces de provocar alteraciones severas en el producto final de cerveza, tanto especial como sin alcohol (0,0).

Con respecto a las bacterias ácido lácticas, sólo *Lactobacillus* y *Pediococcus* han sido descritas como potencialmente contaminantes de la cerveza (Bokulich y Bamforth, 2013). Las especies del género *Lactobacillus* tienen células en forma de bastoncillo, mientras que las del género *Pediococcus* son esféricas. Son numerosas las especies de ambos géneros que se han aislado a partir de muestras de cerveza (Haakensen *et al.*, 2009; Bokulich y Bamforth, 2013). Desde un punto de vista fisiológico, las bacterias ácido lácticas pueden pertenecer a dos grupos: termófilas y mesófilas (Hough, 1990).

La mayoría de las especies de bacterias ácido lácticas muestran altos grados de tolerancia al etanol, lo que desempeña un papel muy importante en su capacidad de deterioro de la cerveza. Otras bacterias ácido lácticas involucradas en otros deterioros de alimentos y bebidas, tales como *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* y *Enterococcus*, no se han aislado de cerveza (Bokulich y Bamforth, 2013).

Las bacterias ácido lácticas estropean la cerveza a través de la acidificación, formación de turbidez y/o producción de diacetilo, lo que da a la cerveza un aroma intenso a mantequilla artificial. Muchas cepas pueden también producir exopolisacáridos (EPS) en la cerveza, dando una consistencia aceitosa o, en casos extremos, la formación del limo. En particular, *Pediococcus* spp. es una especie conocida por la producción de diacetilo y EPS y, debido a que exhiben un fuerte crecimiento a bajas temperaturas, son contaminantes muy comunes (Bokulich y Bamforth, 2013).

A parte de las bacterias ácido lácticas, pocos organismos Gram-positivos han sido encontrados en cerveza. *Kocuria kristinae* (anteriormente *Micrococcus kristinae*) ha sido descrita como un contaminante de cerveza, pero con bajo potencial debido a su sensibilidad al lúpulo, etanol y pH (Bokulich y Bamforth, 2013).

En algunas cervezas se hallan también pequeños números pertenecientes a otros géneros de bacterias Gram-positivas y, entre ellos, esporulados como *Bacillus* y *Clostridium* (Hough, 1990).

Las bacterias pertenecientes a la familia *Bacillaceae* no han sido tradicionalmente consideradas capaces de producir un deterioro severo en la cerveza, debido a la presencia del lúpulo. Sin embargo, se han aislado especies que contienen un gen de resistencia conocido como horA, que evita los daños producidos por este compuesto. Algunas de estas especies (*Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis* y *Paenibacillus humicus*) mostraron crecimiento cuando se volvieron a inocular en un medio en base a cerveza (Bokulich y Bamforth, 2013). Debido a estos estudios previos, se podría pensar que la cepa 3-0,0 podría pertenecer a este género, ya que sus características morfológicas coinciden.

Mediante la optimización del proceso de pasteurización por flash se podría reducir en gran medida la contaminación microbiológica del producto final, ya que sobre todo en épocas de una elevada producción como es la época de verano se pueden llegar a producir grandes pérdidas económicas por el

descarte de lotes con altas densidades poblacionales de contaminantes microbianos.

La mayoría de los microorganismos nombrados anteriormente no producen efectos nocivos en el ser humano tras su consumo. No obstante, recientemente Kim *et al.* (2014) han descrito la supervivencia durante largos períodos de tiempo de ciertos patógenos en la cerveza como es el caso de *Bacillus cereus* o *E. coli* O157:H. En el caso de *B. cereus*, esta supervivencia se debe a su capacidad de formación de esporas entre los 5 °C y los 22 °C (Kim *et al.*, 2014).

Estudios como el presente, ponen de manifiesto la necesidad de estandarizar los controles de calidad microbiológica sobre la supervivencia microbiana en bebidas alcohólicas fermentadas (Kim *et al.*, 2014).

Conclusiones

La simulación de la pasteurización flash a 75 °C de muestras de cerveza especial y sin alcohol, permitió el aislamiento de microorganismos termorresistentes representados únicamente por bacterias Gram-positivas.

Las bacterias Gram-positivas con forma de coco representan la mayoría de la población termorresistente, y se caracterizan todas ellas porque un pequeño porcentaje de la población es capaz de sobrevivir a tratamientos térmicos flash de 80 - 85 °C durante 1,5 min. Ninguna de ellas fue capaz de soportar tratamientos térmicos a 90 °C durante 2 min.

También se aislaron bacterias bacilares Gram-positivas formadoras de esporas. En este caso la forma vegetativa no soporta el tratamiento a 75 °C, pero la espora es viable en tratamientos a 100 °C de temperatura final.

Son necesarios nuevos estudios que nos permitan identificar las especies, caracterizar bien el comportamiento de las bacterias cocoides en los tratamientos entre 75 y 85 °C, así como determinar la capacidad de estas bacterias para crecer en el producto final y provocar alteración microbiológica.

Conclusiões

A simulación da pasteurización flash a 75 °C das mostrás de cervexa especial e cervexa sen alcohol, permitiu o illamento de microorganismos resistentes á calor representados só por bacterias Gram-positivas.

As bacterias Gram-positivas con forma de coco representan a maioría da poboación termorresistente, e caracterízanse todas elas porque un pequeno porcentaxe da poboación é capaz de sobrevivir a tratamentos térmicos flash de 80 – 85 °C durante 1,5 min. Ningún deles foi capaz de resistir a tratamentos de calor a 90 °C durante 2 min.

Tamén illáronse bacterias bacilares Gram-positivas formadoras de esporas. Neste caso a forma vexetativa non soporta o tratamento a 75 °C, pero a espora é viable en quentamentos a 100 °C de temperatura final.

Son necesarios novos estudos que nos permitan identificar as especies, caracterizar ben o comportamento das bacterias cocoides nos tratamentos

entre 75 e 85 °C, así como determinar la capacidad de estas bacterias de crecer en el producto final e de aquí dar lugar a su alteración microbiológica.

Conclusions

The simulation of the flash pasteurization at 75 °C of special and alcohol-free beer samples allowed the isolation of heat-resistant microorganisms, only represented by Gram-positive bacteria.

Gram-positive coccus bacteria represent the foremost heat-resistant population and they are characterized by being able to survive up to 80 - 85 °C/1.5 min heat flash procedures. Nevertheless none of them were capable of withstanding 90 °C / 2 min heat treatment.

Bacillary spore-forming Gram-positive bacteria were also isolated. But in this case, the vegetative state does not survive to the 75 °C treatment, otherwise the spore is feasible in 100 °C process.

Further research is needed to identify species, to characterize the behaviour of coccus bacteria (75 and 85 °C treatments) and to determine the growth of these bacteria in the final product.

Bibliografía

- Bokulich, N.A. y Bamforth, C.W. (2013). The Microbiology of Malting and Brewing. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77 (2), 157–172.
- Boletín Oficial del Estado. (2016). Real Decreto 678/2016, de 16 de diciembre, por el que se aprueba la norma de calidad de la cerveza y de las bebidas de malta. *BOE* núm. 304, de 17/12/2016. Pág. 88520.
- Brock, T. y Madigan, M. (2008). Biology of microorganisms. *Pearson/Benjamin Cummings*. San Francisco, California.
- Buck, J.D. (1982). Non-staining (KOH) Method for Determination of Gram Reactions of Marine Bacteria. *Applied & Environmental Microbiology*, 44 (4), 992-993.
- Calleja Colorado, J. (2003). Diseño de una planta de elaboración de cerveza artesanal para consumo directo. Microcerveceria. *Trabajo de fin de carrera. Ingeniería Química*. Universidad de Cádiz.
- Cerna Castro, R. (2007). Determination of Time Temperature Effect during Pasteurization Process on Color, Aroma and Flavor of Beer Using Sensorial Analysis. *Revista Virtual Pro. Procesos industriales*. 64 (Cerveza), 27-34.
- Guía de mejores técnicas disponibles en España del sector cervecero (2005). *Ministerio de Medioambiente*, Madrid. 155.
- Haakensen, M., Vickers, D. y Ziola, B. (2009). Susceptibility of *Pediococcus* isolates to antimicrobial compounds in relation to hop-resistance and beer-spoilage. *BMC Microbiology*, 9(1),190.
- Hijos de Rivera, S.A (2010a). Elaboración de la cerveza. Manual de laboratorio. A Coruña.
- Hijos de Rivera, S.A (2010b).Contaminantes de la cerveza. Manual de laboratorio. A Coruña.
- Hijos de Rivera, S.A (2010c). Departamento de calidad. Manual de laboratorio. A Coruña.
- Hornsey, I.S. 2002. Elaboración de cerveza. *Microbiología, bioquímica y tecnología*. Ed. Acribia, Zaragoza. 229.

- Hough, J.S. 1990. Bacterias que contaminan el mosto y la cerveza. *Bioteología de la cerveza y de la malta*. Ed. Acribia, Zaragoza. 126-131.
- Jespersen, L. y Jakobsen, M. (1996). Specific spoilage organisms in breweries and laboratory media for their detection. *International Journal of Food Microbiology*, 33(1),139-155.
- Kim, S.A., Kim N.H., Lee S.H., Hwang I.G., Rhee M.S. (2014) Survival of foodborne pathogenic bacteria (*Bacillus cereus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, and *Listeria monocytogenes*) and *Bacillus cereus* spores in fermented alcoholic beverages (beer and refined rice wine). *Journal of Food Protection*, 77(3), 419-426.
- Sakamoto, K. y Konings, W. (2003). Beer spoilage bacteria and hop resistance. *International Journal of Food Microbiology*, 89 (2-3), 105-124.
- Varnam, A. y Sutherland, J. (1997). Bebidas. *Tecnología, Química y Microbiología*. Ed. Acribia, Zaragoza.