

Identificación de bacterias ácido lácticas en cervezas artesanales dispensadas en barril en la Zona Metropolitana de Monterrey

Karen Cecilia Leal-Bustillos, Julio Silva-Mendoza, Ulrico Javier López-Chuken

Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Químicas, Laboratorio de Biotecnología. Ave Universidad S/N, Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza N.L. México C.P. 66455.

Ulrico.lopezchk@uanl.edu.mx

Recibido: 05 de Enero de 2024, **Aceptado:** 01 de Marzo de 2024

Resumen

La cerveza es considerada un producto microbiológicamente estable debido a sus características fisicoquímicas, sin embargo, algunos grupos de bacterias tienen la capacidad de desarrollarse aún en las condiciones que presenta este medio, causando deterioro del producto y a la vez grandes pérdidas económicas. Los sistemas de dispensación de barril son una potencial fuente de contaminación, ya que, al no realizar una apropiada sanitización de los componentes pueden llegar a formarse películas bacterianas provocando que el producto final se contamine y termine por deteriorarse. Para este proyecto se analizaron 42 muestras de diferentes estilos de cervezas artesanales dispensadas de barril de distintos establecimientos dentro de la Zona Metropolitana de Monterrey, de las cuales 31 tuvieron presencia de bacterias ácido lácticas. Los resultados del análisis de correlación entre los parámetros IBU, ABV, SRM y pH de cada cerveza y la presencia de estos microorganismos, indicaron que no se encontró una relación significativa entre estas variables bajo las condiciones de muestreo.

Palabras clave: Deterioro, cerveza artesanal, sistemas de dispensación, bacterias ácido lácticas.

Abstract

Beer is considered a microbiologically stable product because its physicochemical characteristics, however some groups of bacteria have the ability to develop even under the conditions presented by this medium, causing product spoilage and significant economic losses. Draft beer dispensing systems are a potential source of contamination, as improper sanitation of the components can lead to the formation of bacterial biofilms, resulting in contamination and eventual spoilage of the final product. For this project, 42 samples of different styles of craft beers dispensed from kegs in various establishments within the Monterrey Metropolitan Area were analyzed, of which 31 showed the presence of lactic acid bacteria. The results of the correlation analysis between the parameters IBU, ABV, SRM and pH of each beer and the presence of these microorganisms indicated that no significant relationship was found between these variables under the sampling conditions.

Key words: Beer spoilage, craft beer, dispensing system, lactic acid bacteria.

1. Introducción

La cerveza es la tercera bebida más consumida en el mundo. Si bien, se trata de una industria sumamente próspera, existen diversos factores de riesgo para estas empresas, sobre todo para las cerveceras independientes que elaboran cerveza de forma artesanal, ya que la mayoría no cuenta con controles estrictos de pasteurización y/o filtración de sus productos como las cervezas industrializadas [1, 2].

Este producto ha sido reconocido como una bebida microbiológicamente estable, debido a que las sustancias presentes en ella, como el etanol (0.5 - 10%), el dióxido de carbono (0.5%), derivados del lúpulo (10 - 75 ppm) y pH ácido (4.0-4.7) la hacen un medio desfavorable para muchos microorganismos [2]. Las concentraciones de

estos compuestos varían en cada estilo de cerveza, sin embargo, existen distintos parámetros generalmente dados por los fabricantes que proporcionan al consumidor información acerca de las características organolépticas de cada estilo de cerveza [1, 3]. Entre los parámetros comúnmente proporcionados se encuentran el nivel de amargor o IBU (International Bitterness Units) por sus siglas en inglés, el contenido de alcohol o ABV (Alcohol By Volume) y el color, medido por el estándar SRM (Standard Reference Method). IBU es una escala que mide la concentración de iso alfa-ácidos derivados del lúpulo presentes en la cerveza. Además de conferirle el amargor característico a esta bebida, estas moléculas presentan actividad antibacteriana frente a un gran número de microorganismos. La tonalidad que posee una cerveza es medida por el valor SRM, el cual forma parte de una escala estandarizada que le asigna un

valor entre 2 y 40 a una bebida, siendo el 2 la coloración más clara. Este valor aumenta según se intensifica la tonalidad de la cerveza. Por último, el parámetro ABV es una medida estándar que expresa la concentración en porcentaje de etanol presente en la cerveza resultado de la fermentación de los azúcares disponibles por acción de la levadura. [4]

Aún con la presencia de estos compuestos, algunos grupos de bacterias, principalmente bacterias ácido lácticas (BAL). Estas bacterias metabolizan los azúcares fermentables y producen ácidos orgánicos, compuestos volátiles y metabolitos como el diacetilo. Este proceso provoca olores y sabores desagradables, además de aumentar la turbidez y viscosidad del producto terminado, comprometiendo así la calidad y aceptabilidad de la cerveza por los consumidores. [3, 5, 6]. Además, las BAL por su metabolismo fermentativo, producen ácido láctico el cual puede provocar una caída importante en el pH de estas bebidas, modificando las características organolépticas del producto haciéndolo más ácido y resultando en un sabor desagradable para los consumidores [3, 6].

La contaminación del producto por estos microorganismos puede dividirse en dos tipos. La primaria, originada principalmente por el uso de materias primas en crudo y la contaminación secundaria que ocurre una vez que el producto terminado es embotellado, enlatado, embarrilado o una vez que es distribuido, ya sea por mal almacenamiento o durante la dispensación [5, 7]. En investigaciones anteriores los barriles de cerveza han demostrado estar libres de microorganismos contaminantes al ser entregados en los establecimientos, sin embargo, después de estar acoplados al sistema de dispensación, comienzan a mostrar signos de deterioro [6, 7]. Los sistemas de dispensación representan una amenaza para la estabilidad microbiológica del producto, ya que el sistema involucra la introducción de piezas dentro del barril, por lo que la calidad de la cerveza dependerá en gran medida de las condiciones de almacenamiento e higiene del sistema de dispensación ya que, al no realizar una apropiada sanitización de los componentes, pueden llegar a formar películas bacterianas que contaminen y deterioren el producto final [8, 9]. Generalmente, los procedimientos de limpieza realizados rutinariamente no son suficientes para la alta carga microbiana presente en los sistemas de dispensación. Las buenas prácticas de higiene y una limpieza regular y eficiente de las líneas de dispensación son clave para garantizar la calidad del producto y así minimizar las grandes pérdidas económicas que este problema puede llegar a ocasionar [7, 10, 11].

El propósito de esta investigación fue identificar la presencia de bacterias ácido lácticas causantes del deterioro en cervezas artesanales dispensadas en barril producidas en la Zona Metropolitana de Monterrey. Los hallazgos obtenidos tienen como objetivo proporcionar información relevante para el diseño futuro de un plan de sanitización, con el fin de mejorar los procedimientos de

limpieza y sanitización de los sistemas de dispensación y así minimizar los incidentes de contaminación.

2. Parte experimental

Toma de muestra

Se tomaron 42 muestras de cerveza artesanal elaborada en el estado de Nuevo León de diferentes establecimientos que cuentan con sistema de dispensación de barril. El muestreo se dividió en tres rondas, con un intervalo de 3 semanas entre cada una de ellas. Se seleccionaron 7 estilos diferentes de cerveza con parámetros IBU, ABV y SRM distintos para poder realizar un análisis de correlación. Cada estilo de cerveza correspondió a una marca específica y se muestreó en dos establecimientos diferentes (A y B). La Tabla 1 muestra los estilos de cerveza seleccionados al igual que los parámetros de cada cerveza.

Tabla 1. Parámetros de las cervezas artesanales seleccionadas

Marca	Estilo de cerveza	IBU	SRM	ABV
α	Lager light	9	3	3.5
β	Witbier	15	3	4.9
γ	Brown ale	23	23	6
δ	Stout	35	35	4.2
ϵ	IPA	45	7	6.7
ζ	WC IPA	70	8	6.5
η	IPA imperial	103	9	9.1

Las muestras fueron tomadas directamente del vaso donde la cerveza fue servida utilizando jeringas y recipientes estériles. Se tomaron cerca de 80 mL de cada cerveza, 50 mL fueron utilizados para la determinación de presencia de BAL y el resto para la medición de pH. Las muestras se transportaron en una hielera manteniéndose a una temperatura de 4°C hasta el momento de su análisis.

Medición de pH

Se realizó la medición de pH de cada una de las muestras con el objetivo de detectar valores fuera del rango normal para los estilos de cerveza elegidos (entre 4 y 4.7) lo que podía indicar indicios de deterioro del producto. Para hacer la medición se utilizó un potenciómetro marca Termo modelo Orion 250.

Detección de BAL deterioradoras

Para el aislamiento de las cepas de BAL deterioradoras se incubaron 50 mL de la muestra a 30°C por 4 días.



Después se sembró directo en placa con agar MRS (de Man, Rogosa y Shape) el cual fue modificado añadiendo 100 mg/L de cicloheximida para inhibir el crecimiento de la levadura y el pH fue ajustado a 5 utilizando ácido tartárico al 10%. Las muestras se incubaron a 30°C en condiciones anaerobias por 7 días. Las placas que presentaron crecimiento se resembraron a las mismas condiciones hasta obtener cultivos puros. Se realizó tinción Gram a las cepas aisladas y se utilizó un microscopio marca Carl Zeiss KF2 ICS para observar la morfología microscópica. Se observaron las características macroscópicas de las colonias. También se realizó prueba de catalasa utilizando peróxido de hidrógeno al 3%, la presencia de burbujas indicó la presencia de la enzima catalasa y por lo tanto una prueba positiva y pruebas de fermentación de azúcares usando caldo rojo fenol y los azúcares: galactosa, arabinosa, xilosa, manitol, celobiosa, rafinosa, lactosa, sacarosa, manosa y maltosa. El virre a color amarillo indicó una prueba positiva.

Identificación de BAL

Para la identificación de las cepas de BAL se utilizó el software ABIS (Advanced Bacterial Identification Software) disponible en <https://www.tgw1916.net/>. Los resultados de las pruebas bioquímicas junto con las características microscópicas y macroscópicas se ingresaron en el software. El programa hizo una búsqueda en su base de datos y proporcionó información sobre los géneros y especies que coincidieron con los datos proporcionados.

Análisis estadístico

Para determinar la correlación entre la presencia de BAL y los parámetros de cada cerveza se realizó un análisis de correlación biserial puntual utilizando el software IBM SPSS Statistics para Windows, Version 28.0.

3. Resultados y discusiones

42 muestras de cerveza artesanal dispensada de barril fueron recolectadas de distintos establecimientos dentro de la Zona Metropolitana de Monterrey en un periodo de 3 meses. La tabla 2 muestra las mediciones de pH de cada una de las cervezas, las cuales fueron tomadas el mismo día que la muestra fue recolectada.

Tabla 2. Mediciones de pH.

Local	Muestra	Ronda		
		1	2	3
A	Lager light	4.2	4.5	3.8
A	Brown ale	4.4	4.7	4.3
A	Witbier	4.2	4.4	4.2
A	Stout	4.6	4.7	4.4
A	IPA	4.1	4.2	4.2
A	West coast IPA	4.6	4.4	4.2
A	IPA imperial	4.7	5.0	4.5
B	Lager light	4.3	4.4	4.2
B	Brown ale	4.5	4.7	4.5
B	Witbier	3.6	3.8	3.6
B	Stout	4.2	4.2	3.8
B	IPA	4.2	4.4	4.2
B	West coast IPA	4.4	4.6	4.6
B	IPA imperial	4.7	4.9	4.7

*Se muestran los pH de cada muestra recolectada. Los datos se dividieron por establecimiento (A y B) y en cada uno de ellos las mediciones de las tres rondas (1, 2 y 3)

31 de las 42 muestras analizadas tuvieron crecimiento bacteriano en medio MRS, lo cual representa el 73.8% de muestras positivas (Tabla 3). Goodman y Latorre [1, 18] en sus investigaciones encontraron presencia de BAL en el 44 y 69.3% de las muestras de cerveza artesanal que analizaron, por lo que el porcentaje tan alto encontrado en este proyecto puede indicarnos la falta de higiene en los sistemas de dispensación de los establecimientos analizados.

Tabla 3. Resultados de la detección de BAL en las muestras de cervezas analizadas.

Estilo	Primer muestreo		Segundo muestreo		Tercer muestreo	
	A	B	A	B	A	B
Lager light	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Witbier	✓	x	x	x	✓	x
Brown ale	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Stout	✓	✓	✓	✓	✓	✓
IPA	x	✓	✓	✓	x	✓
WC IPA	✓	✓	✓	x	✓	x
IPA imperial	✓	✓	x	x	✓	x

Presencia (✓), ausencia (x).

Macroscópicamente se observaron colonias blancas, redondas y cremosas. Se realizó tinción Gram y microscópicamente se observaron bacilos Gram positivos individuales o en cadenas cortas (Figura 1). Las colonias se sembraron hasta tener cultivos puros. La morfología macroscópica y microscópica coincidió con las características de los cultivos aislados de cervezas en investigaciones realizadas por Goodman et al. y Rodríguez-Saavedra et al. [1, 12].

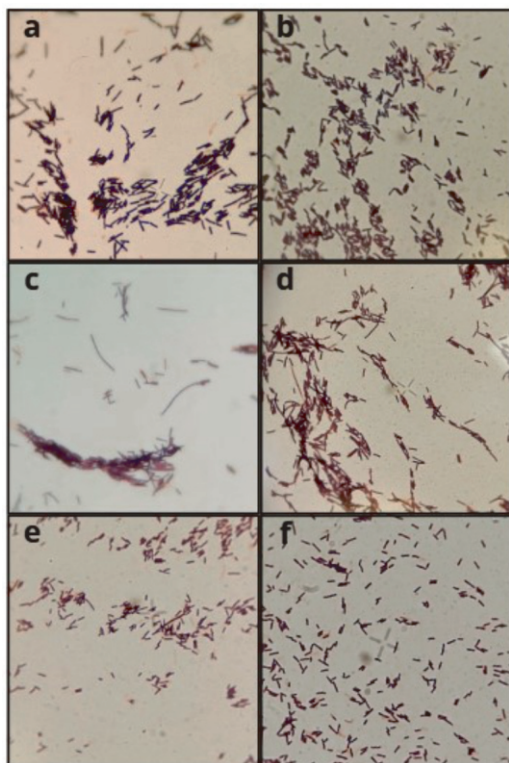


Figura 1. Micrografías de cepas de *Lactobacillus* aisladas. a) *L. brevis*, b) *L. parabrevis*, c) *L. kisonensis*, d) *L. fuyuanensis*, e) *L. fermentum*, f) *L. senioris*. Tinción Gram 100x

Para determinar la relación entre los parámetros de cada cerveza y la presencia de bacterias ácido lácticas se realizó un análisis de correlación biserial puntual. Los valores del coeficiente de correlación para el pH y los parámetros IBU, ABV y SRM fueron: 0.04, -0.10, -0.09 y 0.09 respectivamente. Estos valores indican que no existe una relación entre los valores de los diferentes parámetros y la presencia de bacterias ácido lácticas en las muestras de cerveza. Esto concuerda con las investigaciones realizadas por Goodman et al. [1] donde al aislar bacterias ácido lácticas de cervezas artesanales con diferentes parámetros no encontraron una relación significativa entre la presencia/ausencia de estos microorganismos y los valores IBU, ABV y pH de cada cerveza.

Una vez que las cepas fueron aisladas se realizaron las pruebas de catalasa y fermentación de azúcares. Los

resultados de estas pruebas, así como las características macroscópicas y microscópicas se introdujeron en la base de datos ABIS, encontrando una alta coincidencia con 6 cepas diferentes del género *Lactobacillus*, siendo *L. parabrevis* la más recurrente con presencia en el 64.5% de las muestras. En segundo lugar, se encontró *L. brevis* (19.35%), *L. fermentum* (6.45%) y en menor medida *L. senioris*, *L. fuyuanensis* y *L. kisonensis* (Figura 2). En distintas investigaciones a nivel mundial se han logrado aislar BAL presentes en cervezas artesanales de diferentes estilos y presentaciones (enlatados, embotellados y cerveza de barril) siendo *L. brevis* la especie más común [12, 15, 16, 17]. Además, Koob et al. señala también casos de deterioro ocasionado por *L. parabrevis* y *L. fermentum* [13].

A la fecha no se han encontrado reportes de deterioro causado por *L. senioris*, *L. fuyuanensis* y *L. kisonensis*, sin embargo, diferentes investigaciones mencionan que algunas especies de *Lactobacillus* se adaptan a las características de las cervezas a las que son expuestas, lo que ha llevado a un aumento en el número de BAL capaces de deteriorar producto [13, 14, 18].

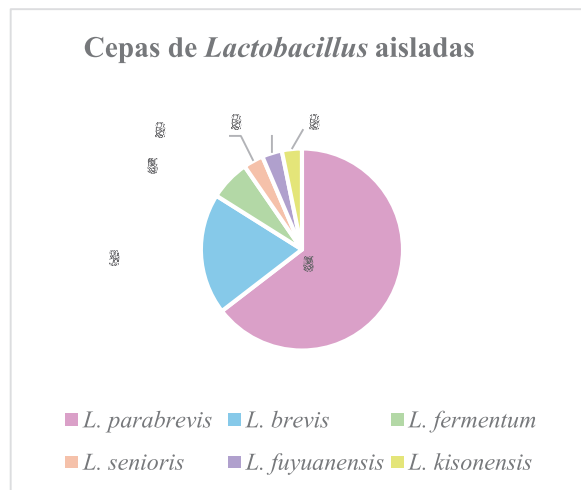


Figura 2. Recurrencia de las BAL aisladas.

4. Conclusiones

Se analizaron 42 muestras de cerveza artesanal dispensadas de barril de las cuales más del 73% mostraron presencia de bacterias ácido lácticas.

Los resultados del análisis estadístico mostraron que bajo las condiciones de muestreo no se presentó una relación significativa entre la presencia de BAL y el pH y los parámetros IBU, ABV y SRM de cada estilo de cerveza.

Después de aislar estas cepas se logró identificar la posible presencia de 6 especies del género *Lactobacillus*: *L. parabrevis*, *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. fuyuanensis*, *L.*

senioris y *L. kisonensis*, siendo *L. parabrevis* y *L. brevis* las más recurrentes, mismas que cuentan con reportes por ser causantes de acidificación, turbidez y cambios en olor y sabor de cervezas a nivel mundial. Por lo tanto, la presencia de BAL en las muestras podría haber sido influenciada principalmente debido a los equipos de dispensación, por lo que es importante mejorar los protocolos de limpieza y sanitización de estos sistemas, así como las condiciones de higiene en los establecimientos donde las cervezas son dispensadas, con el fin de minimizar los incidentes de contaminación y por consiguiente las pérdidas económicas que este problema puede ocasionar.

5. Referencias

1. Goodman, M., Neal, J. A., Corsi, A., & Sirsat, S. A. *J. Sci & Tech.* **2020.** *18*(2), 116–123.
2. Baiano, A. *Fd Sci and Fd Saf.* **2021.** *20*(2), 1829–1856.
3. Schneiderbanger, J., Jacob, F., & Hutzler, M. *Brewing Sci.* **2020.** *73*.
4. Humia, B. V., Santos, K. S., Barbosa, A. M., Sawata, M., Mendonça, M. da C., & Padilha, F. F. *Molecules.* **2019.** *24*(8), 1568.
5. Sakamoto, K., & Konings, W. N. *J. of Fd MB.* **2003.** *89*(2–3), 105–124.
6. Bokulich, N. A., & Bamforth, C. W. *MB and Mol. Biol.* **2013.** *77*(2), 157–172.
7. Storgårds, E. *Tech. Res. Centre of FIN.* **2000**
8. Jevons, A. L., & Quain, D. E. *J. Inst. Brew.* **2021** *127*(2)
9. Quain, D. E. *J. of the Inst. of Brewing.* **2016.** *122*(3), 388–396
10. Mallett, J. R., Stuart, M. S., & Quain, D. E. *J. Inst. Brew.* **2018.** *124*(1), 31–37.
11. Mallett, J. R., & Quain, D. E. *J. Inst. Brew.* **2019.** *125*(2), 261–267.
12. Rodríguez-Saavedra, M., González de Llano, D., & Moreno-Arribas, M. V. *Food Res. Int.* **2020.** *138*, 109762.
13. Koob, J., Jacob, F., Methner, F. and Hutzler, M. *Brew Sci.* **2016.** *pp. 42-49*
14. Zhenbo, X., Yuting, L., Yuzhu, M., Ruixin, P., Jinxuan, C., Thanapop, S., Caiying, B., Ling, C., Yi, L., Jianyu, S., Kan, W., & Junyan, L. *J. of MB and Biotech.* **2020.** 995–961.
15. Ciont, C., Epuran, A., Kerezsi, A. D., Coldea, T. E., Mudura, E., Pasqualone, A., Zhao, H., Suharoschi, R., Vriesekoop, F., & Pop, O. L. *Foods.* **2022.** *11*(17), 2693.
16. Riedl, R., Dünzer, N., Michel, M., Jacob, F., & Hutzler, M. *J. Inst. Brew.* **2019.** *125*(2), 250–260.
17. Devolli, A., Kodra, M., Shahinasi, E., Feta, D., & Dara, F. *J. Hyg. Eng. Des.* **2016.** 5–11.
18. Latorre, M., Bruzone, M. C., de Garcia, V., & Libkind, D. *Rev. Argent. Microbiol.* **2023.** *55*(1), 88–99.