

ÍNDICE

CAPÍTULO 1: BASES PARA LA CORRECTA LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN

1.1 LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN	Pág. 19
1.2 LIMPIEZA DE EQUIPOS.....	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	
1.3 DESINFECCIÓN / SANITIZACIÓN	Pág. 21
1.3.1 Agentes desinfectantes	
1.4 PROGRAMA DE LIMPIEZA Y SANITIZACIÓN	Pág. 22
1.4.1 Programas CIP	

CAPÍTULO 2: CONTAMINANTES MICROBIANOS EN CERVEZA

2.1 MICROORGANISMOS	Pág. 27
2.2 FUENTES DE CONTAMINACIÓN	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	
2.3 MICROORGANISMOS CONTAMINANTES	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.	
2.4 SUCESIÓN MICROBIANA	Pág. 34

CAPÍTULO 3: FERMENTACIÓN DE CERVEZAS

3.1 CALIDAD DE LA FERMENTACIÓN	Pág. 39
3.2 BASES PARA UNA BUENA FERMENTACIÓN	Pág. 40
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	
3.3 CURVAS DE CRECIMIENTO DE LEVADURAS	Pág. 46
3.3.1 Fase de latencia	
3.3.2 Fase de crecimiento exponencial	
3.3.3 Fase estacionaria	
3.4 DENSIDAD	Pág. 48
3.5 ATENUACIÓN	Pág. 48
3.6 FLOCULACIÓN Y SEDIMENTACIÓN	Pág. 50
3.7 DESCANSO DE DIACETILO	Pág. 50
3.8 CLARIFICACIÓN EN FRÍO	Pág. 51
3.9 FACTORES DE ESTRÉS EN LEVADURAS	Pág. 52
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

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

CAPÍTULO 5: LABORATORIO MICROBIOLÓGICO EN CERVECERÍAS

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

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

6.9 RECuento 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

8.2 PROBLEMAS RELACIONADOS CON LA ATENUACIÓN	Pág. 135
8.3 PROBLEMAS RELACIONADOS CON LA FLOCULACIÓN	Pág. 136
8.4 PROBLEMAS RELACIONADOS CON SABORES Y AROMAS	Pág. 136
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	
8.5 PROBLEMAS RELACIONADOS CON LEVADURA PARA REUTILIZACIÓN	Pág. 139
8.5.1 Baja viabilidad de la levadura	
8.5.2 Conservación en frío de levadura cosechada	
BIBLIOGRAFÍA	Pág. 141
ANEXOS	Pág. 147

ÍNDICE DE TABLAS

1.1 Principales desinfectantes usados por cerveceros artesanales	Pág. 22
2.1 Relaciones de los microorganismos con el oxígeno	Pág. 27
2.2 Especies de bacterias del ácido láctico	Pág. 31
3.1 Ejemplos de utilización de Zinc en mostos de cerveza	Pág. 43
5.1 Presiones y tiempos recomendados para ciclos de esterilización de material de laboratorio	Pág. 78
6.1 Resultados de la prueba de mosto forzado	Pág. 93
6.2 Resultados positivos de la muestra de mosto forzado en función del tiempo de incubación y recomendaciones	Pág. 93
6.3 Resultado de la prueba de diacetilo	Pág. 95
6.4 Rótulos de las muestras de cerveza de la prueba de deterioro de producto terminado	Pág. 97
7.1 Diluciones recomendadas según tipo de muestra	Pág. 126

ÍNDICE DE FIGURAS

2.1 Esquema de la pared celular de bacterias Gram positivas y Gram Negativas	Pág. 28
3.1 Curva de fermentación típica	Pág. 46
3.2 Modelos de densímetros	Pág. 48
4.1 Esquema de estratificación de la calidad de levaduras en un cono de un fermentador	Pág. 58
4.2 Capacidad potencial de tres reutilizaciones de levaduras	Pág. 59
4.3 Diagrama de reutilizaciones de levaduras	Pág. 43
4.4 Cámara de Neubauer	Pág. 62
5.1 Mechero Bunsen	Pág. 70
5.2 Estufa de incubación	Pág. 70
5.3 Autoclave eléctrico automatizado	Pág. 70
5.4 Flujo laminar	Pág. 70
5.5 Contador de colonias	Pág. 71
5.6 Balanzas	Pág. 71
5.7 Baño termostático	Pág. 71
5.8 Agitador orbital	Pág. 71
5.9 Vortex	Pág. 72
5.10 Oxímetro de membrana	Pág. 72
5.11 Microscopio óptico	Pág. 72
5.12 Jarra de anaerobiosis	Pág. 72
5.13 Ansas de siembra, ansa en anillo	Pág. 72

5.14 Placas de Petri plásticas y estériles	Pág. 73
5.15 Placas de Petri con medio sólido	Pág. 73
5.16 Micropipeta automática con punta de pipeta	Pág. 73
5.17 Espátulas de Digrafsky	Pág. 73
5.18 Vasos de precipitados	Pág. 74
5.19 Cucharas y espátulas de laboratorio	Pág. 74
5.20 Recipientes estériles (tubos falcon, recipientes para muestras de orina)	Pág. 74
5.21 Porta y cubre objetos	Pág. 74
5.22 Pinza de madera	Pág. 75
5.23 Cámara de Neubauer	Pág. 75
5.24 Frascos de tapa azul de diversos volúmenes	Pág. 75
5.25 Clasificación de los métodos de esterilización	Pág. 77
5.26 Ciclo típico de esterilización con autoclave	Pág. 77
5.27 Autoclave modelo Chamberland	Pág. 78
5.28 Cabina de flujo laminar con lámpara de radiación UV	Pág. 80
5.29 Caja de Petri con medio sólido y colonias en la superficie	Pág. 83
5.30 Elevación, borde y forma de colonias	Pág. 84
5.31 Dilución en serie	Pág. 85
5.32 Método de siembra en estría por agotamiento	Pág. 86
6.1 Resultados de la prueba de mosto forzado	Pág. 92
6.2 Hisopos de algodón estériles con Caldo Letheen	Pág. 100
6.3 Tubo con medio Mac Conkey y trampa para gases	Pág. 111
6.4 Posibles resultados de análisis presuntivos	Pág. 111
6.5 Placa del análisis confirmativo con colonias de E. coli	Pág. 111
7.1 Microscopio con detalles vista lado derecho	Pág. 116
7.2 Microscopio con detalles vista lado izquierdo	Pág. 117
7.3 Portaobjetos en un soporte para tinciones sobre un recipiente	Pág. 121
7.4 Tinción de Gram	Pág. 122
7.5 Representación de una Cámara de Neubauer Improved	Pág. 124
7.6 Retícula de Cámara de Neubauer Improved	Pág. 124
7.7 Representación de un área de recuento de una Cámara de Neubauer	Pág. 127



BASES PARA LA CORRECTA LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN

INTRODUCCIÓN

LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN

LIMPIEZA DE EQUIPOS

DESINFECCIÓN / SANITIZACIÓN

PLAN DE LIMPIEZA Y SANITIZACIÓN

CAPÍTULO 1: BASES PARA LA CORRECTA LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN

Gallace, María Eugenia; Dalmaso, Lucas Pablo y Cenizo, Viviana Jorgelina

El sector cervecero artesanal tiene como objetivo principal la obtención de productos de primera calidad. Para ello, es necesario contar no solo con excelentes materias primas, sino además tener personal capacitado y mantener adecuados criterios de higiene.

El sabor y el aroma son las características más importantes en la producción de cerveza, y son también las más afectadas cuando no existe una correcta higiene y desinfección de los equipos e instalaciones. Generalmente, las cervezas elaboradas por cerveceros artesanales no son pasteurizadas, por lo que los microorganismos y levaduras ambientales tienen amplitud de oportunidades para desarrollarse. Es prácticamente imposible eliminar todos estos microbios, por lo cual, es indispensable cuidar la higiene durante todo el proceso de elaboración para disminuir las posibilidades de colonización de los mismos. Además, cuando se pretende realizar la reutilización de levaduras se debe enfatizar más aún la higiene y desinfección para no propiciar la propagación de microorganismos contaminantes en los sucesivos lotes de elaboración.

En todos los casos, cuando se utilizan productos de limpieza y desinfección, se deben respetar las indicaciones del fabricante respecto al modo de empleo, las superficies en que puede ser aplicado, la concentración y el tiempo de contacto, así como el rango de temperatura y las indicaciones de seguridad.

En el mercado existe una gran diversidad de productos de desinfección con diferentes composiciones y modos de uso, por lo que resulta imposible abordar cada uno de manera particular. Este capítulo del manual permite conocer las bases generales para una correcta limpieza y desinfección, de modo tal que los cerveceros artesanales podrán minimizar el riesgo de contaminación y obtener así un producto de calidad.

1.1 LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN

La limpieza y desinfección son procesos fundamentales de un establecimiento elaborador de cerveza, por lo que se deben tener en cuenta en todas las fases de producción para restringir el crecimiento y reproducción de los microorganismos en la zona de trabajo. El Código Alimentario Argentino (CAA), define a limpieza como la eliminación de tierra, restos de alimentos, polvo, u otras materias objetables, mientras que la desinfección es la reducción del número de microorganismos de las superficies mediante agentes químicos o métodos físicos adecuados. Cabe aclarar que sin una exhaustiva limpieza no se logra una correcta desinfección.

Al trabajar con un producto alimenticio, es necesario mantener un elevado nivel de higiene en todos los sectores, no solo en los equipos que están en contacto con la cerveza. El orden general y un buen diseño del establecimiento ayudará a mantener higienizados correctamente los pisos, paredes, equipos, instrumental de medición, utensilios, botellas, barriles, mangueras, bombas, entre otras superficies.

“Sin una exhaustiva limpieza no se logra una correcta desinfección”

1.2 LIMPIEZA DE EQUIPOS

La limpieza de los equipos depende, principalmente, de los materiales que los componen, la accesibilidad de la superficie que contacta con el mosto o cerveza y de su diseño. En

el sector cervecero, se recomienda en uso de acero inoxidable, debido a su naturaleza lisa e impermeable y por la facilidad que puede ser limpiado y desinfectado, además de su resistencia a la corrosión (Cheftel, Cheftel y Besancon, 2000). Los fermentadores plásticos, si bien tienen superficies lisas, son susceptibles a los procesos de abrasión y con el paso del tiempo se pueden formar grietas, estrías y poros que dificultan su limpieza y desinfección; además, se tornan frágiles y tienden a quebrarse.

La limpieza comprende diferentes etapas, en las que se incluyen un pre-enjuague para eliminar los residuos groseros de las superficies y el tratamiento con uno o más agentes limpiadores. Es fundamental leer los prospectos para aplicar los diferentes productos en superficies compatibles. La eficiencia de la acción de estos productos va a depender al menos de los siguientes factores:

- **Químico:** el resultado depende del tipo y concentración del agente de limpieza.
- **Tiempo de limpieza:** cuanto mayor sea el tiempo de contacto, mayor será el éxito de la limpieza.
- **Mecánico:** mayor presión, caudal y velocidad de flujo se relaciona con mayor efectividad de la limpieza.
- **Temperatura:** en algunos casos se requiere elevar la temperatura (limpiadores de base alcalina), en otros casos es suficiente la temperatura ambiente (limpiadores de base ácida).
- **Material de la superficie a desinfectar:** se recomiendan equipos perfectamente lisos, ya que los materiales porosos dificultan la acción de los limpiadores.

1.2.1 Agentes para limpieza de equipos

1.2.1.1 Limpiadores de base alcalina

Los limpiadores alcalinos son aquellos cuyo pH es mayor a siete ($\text{pH} > 7$) y en su composición incluyen, generalmente, hidróxido de sodio, agentes tensioactivos no iónicos y agentes quelantes. El hidróxido de sodio por ejemplo, exhibe una excelente capacidad emulsionante para proteínas por lo que tiene en una amplia variedad de aplicaciones en cervecías.

La función de los limpiadores alcalinos es eliminar residuos orgánicos como, almidones, hidratos de carbono, proteínas, aceites y grasas que quedan luego del proceso de elaboración de cerveza. Sin embargo, no podrán eliminar la acumulación y depósito de sales minerales.

1.2.1.2 Limpiadores de base ácida

Los depósitos de sales, conocidos vulgarmente como piedra de cerveza, están compuestos principalmente por sales minerales insolubles en agua. Los productos comerciales de base ácida incluyen en general, ácido fosfórico o ácido nítrico y otros componentes activos, que transformarán químicamente las sales insolubles en una forma soluble y enjuagable (Loeffler, 2006). El ácido fosfórico supera ampliamente al ácido nítrico en su poder de limpieza (Storgårds, 2000).

Es importante destacar que no todos los ácidos son adecuados, algunos como el ácido sulfúrico y el ácido clorhídrico, son extremadamente corrosivos y su disolución puede resultar peligrosa por el calor que se genera en el proceso.

1.2.1.3 Detergentes neutros

Los detergentes neutros como los de uso doméstico presentan un buen poder de limpieza, son productos adecuados para superficies y utensilios moderadamente sucios o que re-

quieren de aplicación de forma manual con esponja suave. Son seguros para todo tipo de materiales y en su composición pueden tener agentes secuestrantes, emulsionantes y perfumes. En algunos casos, contienen enzimas que actúan sobre las cadenas orgánicas y las convierten en residuos muy pequeños fácilmente eliminables. Existen de dos tipos, los espumantes y los no espumantes, estos últimos diseñados para pisos y paredes de la industria alimentaria.

1.2.2 Métodos de limpieza del equipo

1.2.2.1 Sistemas CIP (*Clean In Place*)

La limpieza en el lugar (CIP) se define como, la limpieza de elementos completos, circuitos o tuberías de plantas, sin desmantelar o abrir el equipo y con poca o ninguna participación manual por parte del operador. El proceso implica la inyección o pulverización de superficies, o la circulación de soluciones de limpieza a través de circuitos y equipos en condiciones de mayor turbulencia y velocidad de flujo (Tamine, 2008).

1.2.2.2 Sistemas COP (*Clean Out Place*)

La limpieza fuera del lugar (COP) es esencialmente lo opuesto de CIP y se refiere a la mayoría de las aplicaciones de limpieza manual, el equipo debe dividirse en partes o se deben realizar modificaciones importantes antes de la limpieza. Algunos equipos que normalmente se limpian mediante CIP deben limpiarse periódicamente en modo COP, por ejemplo los intercambiadores de calor. Por lo tanto, COP no puede ni debe evitarse por completo.

1.3 DESINFECCIÓN / SANITIZACIÓN

La desinfección es la reducción mediante agentes químicos o métodos físicos adecuados, del número de microorganismos en el edificio, instalaciones, maquinarias y utensilios, a un nivel que no dé lugar a contaminación del alimento que se elabora (Ley N° 18.284, 1969). En la industria de los alimentos se utiliza también el término “saneamiento” al proceso para reducir la población de microorganismos de una superficie limpia a niveles insignificantes. Sanitización proviene del idioma inglés *sanitization* y no está registrada en el diccionario de la Real Academia Española. Sin embargo, debido a que es un término de uso corriente en el sector cervecero, en este manual se utilizan como sinónimos y de manera indistinta.

Una desinfección exitosa, requiere previamente de un programa de limpieza efectivo que indique claramente al operador las tareas a realizar (Loeffler, 2006). Los agentes desinfectantes, tanto físicos como químicos, tienen la función que el equipo de producción esté libre de microorganismos después del uso y posterior limpieza. El factor físico más utilizado en cervecerías implica un tratamiento térmico a través del uso de vapor de agua.

1.3.1 Agentes desinfectantes

Existen diferentes productos desinfectantes, los más usuales en cervecerías son los mencionados en la tabla 1.1. Comercialmente existen sanitizantes que utilizan uno o más de estos agentes, y también combinados con otras sustancias. Es indispensable leer bien los prospectos de los productos desinfectantes para que sean aplicados en superficies de materiales compatibles, y respetar las concentraciones de uso y tiempo de contacto.

Tabla 1.1: Principales desinfectantes usados por cerveceros artesanales en Argentina.

PRINCIPIO ACTIVO	OBSERVACIONES	USOS
Alcohol 70%	Una concentración mayor al 70% de etanol reduce su capacidad sanitizante. Es compatible con cualquier superficie.	Fermentadores <i>homebrew</i> y elementos de aluminio. Se lo utiliza en tapas corona para botellas, ya que no es corrosivo. Debido a su estabilidad en el tiempo, se utiliza en el sector de fermentación para desinfectar válvulas y tomamuestras.
Ácido peracético	Agente desinfectante ácido con efecto oxidante (destruye la membrana celular); alta efectividad. A la concentración de uso no es estable en el tiempo.	Limpieza CIP, superficies y equipos en general. Desinfección de botellas.
Peróxido de hidrógeno	Agente desinfectante neutro con efecto oxidante; se descompone en contacto con material orgánico en agua y oxígeno; muy amplia gama de efectividad.	Limpieza CIP. Desinfección por pulverización.

La formulación basada en ácido peracético y peróxido de hidrógeno se usa con frecuencia para la sanitización posterior a la limpieza. El ácido peracético penetra en la célula y oxida las enzimas y otras proteínas de manera irreversible.

“Es indispensable leer bien los prospectos de los productos desinfectantes para que sean aplicados en superficies de materiales compatibles, y respetar las concentraciones de uso y tiempo de contacto.”

En general, los agentes desinfectantes pierden rápidamente su acción en un entorno alcalino, por lo que es esencial un enjuague abundante después de la limpieza alcalina (Storgårds, 2000). Los desinfectantes a base de ácido peracético y peróxido de hidrógeno también funcionan en presencia de materia orgánica, pero son notablemente menos efectivos cuando la temperatura disminuye de 20 °C a 4 °C (Storgårds, 2000).

1.4 PROGRAMA DE LIMPIEZA Y SANITIZACIÓN

Para poder mantener las instalaciones, los equipos, utensilios y otros equipamientos en un buen estado y minimizar el riesgo de contaminación de la cerveza, hay que establecer un procedimiento que asegure una buena limpieza y desinfección. Es importante tener presente que estos procesos se tienen que adecuar y efectivizar con la frecuencia necesaria, de acuerdo

a cada una de las zonas y equipos. Además, se deben tomar las precauciones necesarias ya que un programa de limpieza mal diseñado o ejecutado puede generar un foco de contaminación (en este caso química) por un mal enjuague o exceso de limpiadores y sanitizantes que pueden dejar residuos en equipos y por ende en las cervezas terminadas (Generalitat de Catalunya, 2019).

1.4.1 Programas de limpieza y desinfección CIP

Un programa de limpieza y desinfección CIP es un documento de procedimientos de una correcta limpieza y sanitización (Ver anexo 1), en el que se deben explicitar y detallar los siguientes ítems:

- Equipo a limpiar y desinfectar
- Momento de la limpieza y desinfección
- Nombre del responsable de llevar adelante la tarea
- Productos a utilizar
- Procedimiento de limpieza: indicando etapas, función de cada etapa, temperatura, producto, dosificación y frecuencia
- Equipos de protección personal
- Protocolo de actuación en caso de accidente
- Documentos adjuntos: fichas de seguridad de los productos de limpieza y sanitización

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 (O₂) 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 O₂ 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 O₂ 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 O₂, 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 ₂
	Microaerófilos	Necesitan O ₂ , pero a concentración menor que la atmosférica

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

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”.

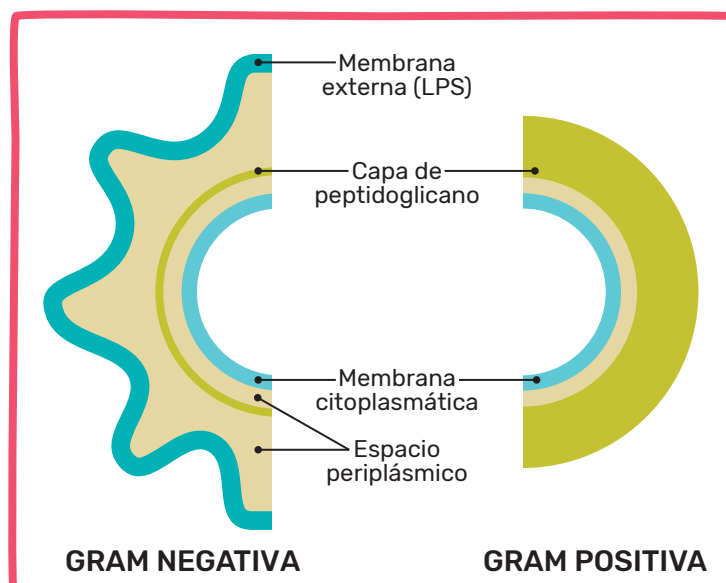


Figura 2.1: Esquema de la pared celular de bacterias Gram positivas y Gram Negativas.

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 (CO₂) y forman pequeñas “capsulas” donde el CO₂ 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 CO₂ 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* ¹ 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* ² 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.

*¹ Además del ácido láctico producen más de un compuesto, principalmente etanol y CO₂.

*² 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 acetoina que le proporciona sabor a manteca (Importante: no confundir acetoina con acetona, son compuestos diferentes). El impacto del DMS y la acetoina 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 acetoina.

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 ± 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.

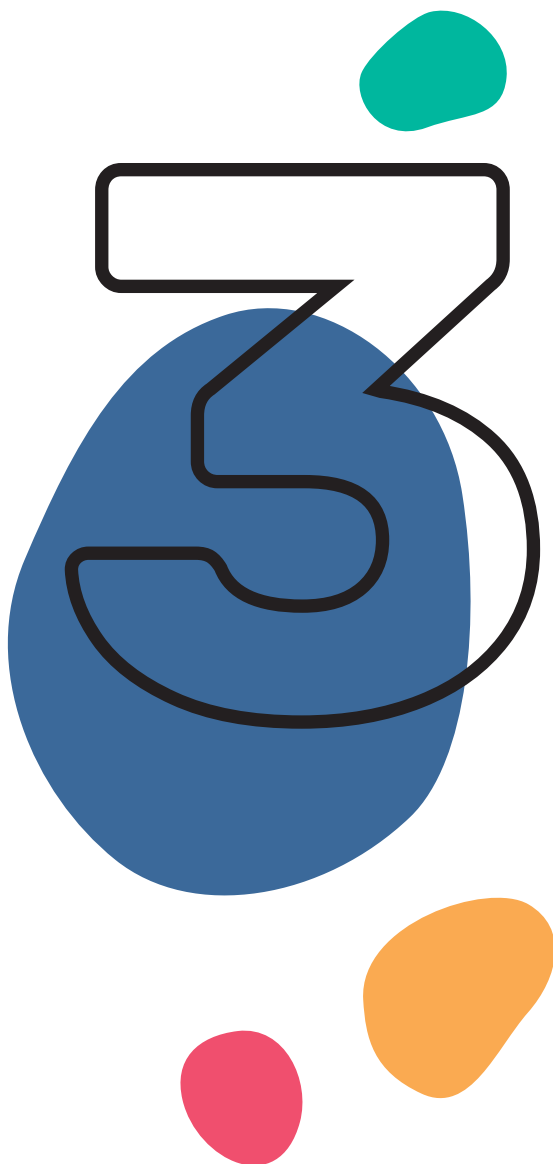
La cerveza Lambic se produce por fermentación espontánea y en ella se encuentran diversos microorganismos. Van Oevelen et al. (2014) y Verachtert (1995) lograron identificar más de dos mil bacterias y levaduras e identifican cuatro fases en este tipo especial de elaboración de cerveza:

- **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).



FERMENTACIÓN DE CERVEZAS

CALIDAD DE LA FERMENTACIÓN
BASES PARA UNA BUENA FERMENTACIÓN
CURVAS DE CRECIMIENTO DE LEVADURAS
DENSIDAD
ATENUACIÓN
FLOCULACIÓN Y SEDIMENTACIÓN
DESCANSO DE DIACETILO
CLARIFICACIÓN EN FRÍO
FACTORES DE ESTRÉS EN LEVADURAS

CAPÍTULO 3: FERMENTACIÓN DE CERVEZAS

Dalmasso, Lucas Pablo

La fermentación del mosto es un proceso esencial en la elaboración de cerveza, además de la importancia de la producción de etanol y dióxido de carbono, este proceso genera cientos de otros compuestos en pequeñas cantidades, que dan origen a los sabores, aromas y texturas típicos de la cerveza. Existen más de 500 compuestos diferentes, alcoholes superiores, ésteres, compuestos fenólicos, acetaldehído, precursores de diacetilo y compuestos sulfurosos entre otros; algunos producen características deseadas y otros afectan negativamente el aroma y sabor (Loviso y Libkind, 2018). El sabor, aspecto y aroma del mosto antes y después de la fermentación son marcadamente diferentes. Si bien cada cepa de levadura imparte su carácter, el cervecero es quien controla la fermentación y en consecuencia definirá el resultado final. Esta sección del manual presenta las herramientas teóricas y prácticas para lograr una correcta fermentación que permita obtener levaduras de excelente calidad para poder reutilizarlas.

3.1 CALIDAD DE LA FERMENTACIÓN

En el proceso de fermentación la función de las levaduras es clave, por esto la detección de problemas o inconvenientes con ellas es fundamental. En una primera instancia, es necesario investigar las características de la cepa de levadura utilizada en cuanto a la producción de ésteres, producción de alcoholes superiores totales, azúcares residuales, floculación, sedimentación, temperatura óptima de fermentación, tolerancia a etanol y porcentaje de atenuación.

Es importante la trazabilidad del producto dentro de la cervecería, en la etapa de fermentación se deben considerar la tasa de inoculación, obtener curvas de fermentación (densidad en función del tiempo), curvas de temperaturas de la fermentación (temperatura en función del tiempo), floculación y sedimentación. Cada productor debe dedicar tiempo y esfuerzo en conocer los parámetros y registrar cada uno con el mayor detalle posible. Para ello deberá obtener muestras del mosto en fermentación, medir densidad, observar, detectar aromas y la mejor parte degustar la producción para detectar sabores extraños. Estos parámetros permitirán realizar una caracterización de la fermentación (que va a ser diferente según la receta y la cepa de levadura), y estar atentos a cambios en la floculación, en las diferencias en la atenuación y la dinámica de la fermentación (fermentaciones lentas, estancadas o fermentaciones violentas).

La calidad de la fermentación puede ser el factor más importante que determina la calidad de una cerveza. En una buena fermentación las levaduras colonizan el medio y producen cambios que inhiben el crecimiento de microorganismos indeseados. Aun así, es primordial mantener todo limpio, ordenado y los materiales en contacto con el mosto y la cerveza desinfectados. El control de la fermentación, es decir entender el comportamiento de cada cepa de levadura, inocular a una tasa óptima y realizar una curva de temperatura ideal, permitirá tener altas probabilidades de una cerveza exitosa.

“En una buena fermentación las levaduras colonizan el medio y producen cambios que inhiben el crecimiento de microorganismos indeseados. Aun así, es primordial mantener todo limpio, ordenado y los materiales en contacto con el mosto y la cerveza desinfectados.”

3.2 BASES PARA UNA BUENA FERMENTACIÓN

El proceso de fermentación requiere relativamente pocos elementos, levaduras y un líquido azucarado. Sin embargo, para obtener una buena fermentación, y de esta manera una buena cerveza, el mosto debe tener suficiente levadura saludable, adecuada proporción nutrientes (carbohidratos, nitrógeno, vitaminas, fósforo y cantidades trazas de metales), control de la temperatura, un fermentador apropiado y la capacidad de realizar un monitoreo de la fermentación.

3.2.1 Levadura

Las levaduras obtienen energía para mantener su metabolismo y multiplicarse a través de la fermentación, como consecuencia producen etanol, dióxido de carbono y otros compuestos que influyen en características como el sabor de la cerveza. Todas las cepas poseen particularidades que las diferencian unas de otras, elegir la adecuada para el estilo o tipo de cerveza que se va a elaborar es un factor que definirá el producto final. Las fichas técnicas de los fabricantes de levaduras ayudarán a una mejor elección de la cepa, además el intercambio de información con colegas de otras cervecerías y la obtención de datos propios mediante pruebas de fermentación, exponiendo un mismo tipo de mosto con cepas diferentes, dará otras herramientas para definir la elección de la cepa de levadura. Es importante asegurarse de inocular mostos con levaduras saludables de elevada pureza (ausencia de contaminantes) y alto porcentaje de viabilidad (más del 90% de células vivas de levaduras).

3.2.2 Nutrientes

Las levaduras necesitan nutrientes para desarrollarse: como carbohidratos, nitrógeno, oxígeno, vitaminas, fósforo y trazas de algunos metales. A excepción de oxígeno y zinc, un mosto de malta contiene suficientes nutrientes para que la levadura lleve adelante la fermentación. Es necesaria la adición de nutrientes que se encuentren en deficiencia, especialmente si se utiliza la técnica de reutilización de levadura. Si bien todos los nutrientes son necesarios para la levadura, a continuación se abordarán algunos en particular, ya que de una u otra manera pueden ser controlados por las personas responsables de una cervecería.

3.2.2.1 Carbohidratos

La composición de hidratos de carbono del mosto afecta la fermentabilidad, esta combinación proviene de azúcares del macerado de granos (malteados o no), de extractos de maltas o de adjuntos. Como regla general, los azúcares de cadena corta (Monosacáridos: glucosa y fructosa, Disacáridos: sacarosa y maltosa, y Trisacárido: maltotriosa) son más fermentables que aquellos de cadena larga como las dextrinas. Cabe aclarar que sólo algunas especies y variedades de levaduras poseen la capacidad de fermentar dextrinas, como *Brettanomyces bruxellensis* y *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus*. A diferencia de la mayoría de las *S. cerevisiae* domesticadas para cerveza, *S. cerevisiae* var. *diastaticus* tiene la capacidad de hidrolizar las dextrinas del mosto en azúcares fermentables, esto causa un alto grado de atenuación (> 90%) en comparación con la mayoría de las levaduras (65 - 85%). Esta capacidad de hidrolizar se debe a que poseen genes STA que permiten que la levadura produzca glucoamilasa, una enzima con capacidad hidrolítica (Meier-Dörnberg, 2018). Por otra parte, las levaduras fermentan los azúcares de cadena corta en un orden determinado comienza por la glucosa, después fructosa y luego sacarosa. La sacarosa (azúcar común) no es asimilable directamente por la levadura, ésta debe producir la enzima invertasa para poder dividirla y generar una molécula de glucosa y otra de fructosa para poder procesarla. Una vez que no hay presencia

en el medio de esos azúcares, la levadura utiliza maltosa que es el azúcar más abundante en el mosto cervecero (representa aproximadamente el 60 - 70% del total de los carbohidratos del mosto). Por último, la maltotriosa cuya aptitud para ser fermentada depende de la cepa de levadura, por lo tanto afecta la atenuación (las cepas de levadura que fermentan maltotriosa dan cervezas más atenuadas).

Los carbohidratos presentes en el mosto afectan el sabor de la cerveza, mostos ricos en glucosa generan cervezas con una concentración de ésteres más alta de lo normal, principalmente el acetato de etilo (descriptor: adhesivo, solvente) y acetato de isoamilo (descriptor: banana). Este efecto se acentúa a medida que aumenta la densidad inicial del mosto (White & Zainasheff, 2010). Por el contrario, mostos ricos en maltosa producen cervezas con menor concentración de estos ésteres.

3.2.2.2 Nitrógeno

El nitrógeno es un elemento esencial en los seres vivos que forma parte de la composición de aminoácidos y proteínas. Las proteínas pueden ser estructurales (elementos constitutivos de la célula y sus orgánulos) o funcionales (enzimas que intervienen en las reacciones metabólicas).

Las levaduras no asimilan el nitrógeno en todas sus formas, éste debe estar biodisponible, por ello es necesario describir el concepto FAN (free amino nitrogen) es decir “aminonitrógeno libre” constituido por nitrógeno amoniacal y ciertos aminoácidos. La determinación de FAN considera únicamente los aminoácidos asimilables (Granès, 2006) y tiene varios efectos importantes y dependientes unos de otros:

- **Multiplificación celular:** una parte del nitrógeno asimilable es incorporado en las proteínas de estructura que son necesarias para la construcción de nuevas células.
- **Mejora la cinética de la fermentación:** el nitrógeno actúa sobre la fermentación alcohólica al permitir la síntesis de proteínas que van a asegurar el transporte de los azúcares hacia el interior de la célula donde serán fermentados produciendo etanol.
- **Producción de compuestos aromáticos:** especialmente los ésteres dependen fuertemente del nivel de nitrógeno asimilable por la levadura.

Existe una sinergia entre el nitrógeno y el oxígeno, es decir que la acción conjunta de estos elementos se ve potenciada. En condiciones de laboratorio, en una fermentación alcohólica bajo anaerobiosis estricta (sin aporte de O₂) la permeabilidad celular se deteriora rápidamente haciendo que la absorción de nitrógeno sea muy difícil. Los azúcares siguen ingresando dentro de la célula y se produce un desfase de casi dos días entre el inicio de la carencia de nitrógeno y la detención de la fermentación (Granès, 2006).

“El FAN es considerado un buen indicador para la predicción del crecimiento sano de la levadura, la viabilidad, la vitalidad y la eficiencia de la fermentación, que dan lugar a la estabilidad y calidad de la cerveza. Se recomienda una concentración en el mosto de entre 150 - 200 mg/L.”

Si bien, la determinación de FAN no está al alcance de todas las microcervecías ya que se necesita un espectrofotómetro, se sabe que un mosto 100% malta posee suficiente nitrógeno por lo que no representa un problema mayor. El nivel de nitrógeno disponible en la malta se reduce con el paso del tiempo y puede que no cubra la necesidad de nutrientes cuando se elabore el mosto. Algo similar ocurre cuando se utiliza un porcentaje elevado de adjuntos

como maíz, arroz, cebada no malteada, azúcar común y miel, en los que los bajos niveles de FAN indican que será necesario agregar nutrientes. En general, las deficiencias de nitrógeno se correlacionan con deficiencias de vitaminas, para suplir estas carencias se deberá agregar un producto formulado para la nutrición de la levadura (por ejemplo *SpringFerm™* BR-2 de la empresa *Fermentis* u otros formulados utilizados en la industria vitivinícola como *Fermaid E™* de *Lallemand*).

Los mostos con bajos niveles de FAN (menos de 150 mg/L) pueden indicar una fermentación lenta o incompleta y además resultan cervezas con altos niveles de diacetilo, ya que la levadura intentará fabricar sus propios aminoácidos (HACH, 2016). Altos niveles de FAN (mayores a 200 mg/L), pueden ocasionar inconvenientes tanto en el sabor como en la estabilidad microbiológica de la cerveza. En caso de que existan nutrientes en exceso, la cerveza podría tener más posibilidades de ser infectada por microbios, y afectar directamente la producción con el consecuente costo económico.

Los nutrientes nitrogenados se deben adicionar sólo cuando se detecte una carencia de estos elementos, ya que un excesivo nivel de aminoácidos se relaciona directamente con la producción de alcoholes superiores. En mostos con exceso de FAN, la levadura fermenta el excedente de aminoácidos y lo convierte en alcoholes de cadena larga (propanol, isobutanol) que afectan las características organolépticas (HACH, 2016).

3.2.2.3 Oxígeno

Las levaduras no son organismos anaerobios estrictos, requieren oxígeno para la síntesis de ácidos grasos y ergosterol necesarios para el crecimiento. Estos compuestos son fundamentales para la constitución de membranas celulares. El ergosterol, mantiene las paredes celulares flexibles y regula la permeabilidad, por lo tanto, es beneficioso para la salud de la levadura.

La falta de oxígeno disuelto puede causar muchos problemas como, detención de la fermentación, largos tiempos de fermentación, cervezas subatenuadas, sabores extraños y baja viabilidad con cada reutilización. Es recomendable que las levaduras que se inoculan en el mosto se dupliquen de 2 a 4 veces (2 a 4 divisiones) para obtener una fermentación eficiente y rápida, con aromas y sabores deseados y ausencia de *off-flavors* (sustancias que según su concentración generan deméritos en cervezas).

La cantidad adecuada de oxígeno disuelto en el mosto pre-fermentación es de 8 a 10 partes por millón (Takacs et al., 2007). Este valor depende de la tasa de inoculación, por lo tanto cervezas Lager y cervezas de alta densidad, que tienen tasas de inoculación mayores, pueden requerir más oxígeno disuelto. Otros autores sugieren como óptimo entre 12 y 20 ppm de oxígeno disuelto. Además, para evitar la oxidación del mosto se recomienda realizar la oxigenación a una temperatura igual o inferior a 20 °C.

“La cantidad adecuada de oxígeno disuelto en el mosto pre-fermentación es de 8 a 10 partes por millón (Takacs, et al., 2007). Otros autores, sugieren como óptimo entre 12 y 20 ppm de oxígeno disuelto.”

Una deficiencia de la cantidad de células de levadura no puede ser compensada por una adición de oxígeno por sobre los valores recomendados. El exceso de oxígeno puede producir mayor crecimiento celular, con la consecuente sobreabundancia de subproductos de fermentación que resultarían en un carácter menos ideal en la cerveza. Sin embargo, en casos muy

particulares, algunos cerveceros fijan una tasa de inoculación menor y una oxigenación mayor para estimular el crecimiento y aumentar los niveles de ésteres y fenoles, y lograr el sabor de típico algunas cervezas de trigo alemanas. Sin embargo, Loviso y Libkind (2018) mencionan sólo como factores que afectan la producción de ésteres los azúcares del mosto, la fuente de nitrógeno, la temperatura de fermentación, la oxigenación y ácidos grasos insaturados, presión y dióxido de carbono disuelto y el tipo (especies y cepas) como principal factor en el perfil aromático de las cervezas.

En cervezas de densidad inicial muy alta (superiores a 1083 kg/m^3) el agregado de una segunda dosis de oxígeno entre 12 y 18 horas después de la inoculación, puede ayudar a aumentar la velocidad de fermentación y la atenuación (O'Conner-Cox & Ingledew, 1990).

La buena salud de la levadura en todas las fermentaciones es importante, pero más aún, cuando se quiere realizar la práctica de reutilización. Una de las posibilidades es la de medir el nivel de oxígeno disuelto en mosto previo a la inoculación con levaduras recolectadas (técnica de reutilización). Existen equipos ópticos y de membrana, para medir oxígeno disuelto. Los primeros son más robustos y poseen mayor sensibilidad, pero son costosos. Los equipos de membrana son más frágiles y requieren calibración, pero son relativamente económicos y accesibles a las microcervecías.

El oxímetro óptico obtiene información precisa de los niveles de oxígeno antes y después de casi cualquier etapa del proceso (trasvase a madurador, llenado de barriles, embotellado). Se debe tener siempre presente que los niveles de oxígeno disuelto en cervezas terminadas deber ser mínimos -menos de 150 ppb- (Kunze, 2006) y muchos oxímetros de membrana, si bien son accesibles, no poseen suficiente sensibilidad para este tipo de determinaciones.

3.2.2.4 Zinc

El zinc es un micronutriente, se requiere en muy bajas concentraciones, pero es fundamental para la división celular ya que actúa como cofactor de enzimas responsables de la producción de etanol y contribuye a mejorar la floculación y sedimentación (De Nicola & Walker, 2011). En un mosto pura malta el zinc es particularmente escaso, existen en el mercado productos específicos para adicionar este micronutriente en el mosto (por ejemplo *Servomyces* o *SpringFerm™* BR-2 de las empresas *Lallemand* o *Fermentis* respectivamente). También se puede agregar en forma de cloruro de zinc (ZnCl_2) o sulfato de zinc heptahidratado ($\text{SO}_4\text{Zn} \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) a razón de 0,2 - 0,3 ppm de zinc en el mosto en los últimos cinco minutos de la ebullición.

Para una mayor precisión, hay que tener en cuenta la pureza de los productos y ajustar la cantidad necesaria. En caso de utilizar sulfato de zinc heptahidratado ($\text{SO}_4\text{Zn} \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$), sólo el 22,74% de esa sustancia es realmente zinc. Por el contrario, si se utiliza cloruro de zinc (ZnCl_2) el 47,97% de esa sustancia es zinc propiamente dicho (Tabla 3.1).

Tabla 3.1: Ejemplos de utilización de zinc en mostos de cerveza.

Sustancia	Pureza del producto comercial (%)	ppm de Zinc deseados	Volumen de mosto (L)	Zinc necesario (g)	Cantidad de sustancia necesaria (g)	Cantidad de producto comercial a utilizar (g)
$\text{SO}_4\text{Zn} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	98	0,25	500	0,125	0,54969	0,56
ZnCl_2	98	0,25	500	0,125	0,26057	0,27

Los productos específicos para la nutrición de levaduras, contienen zinc y extracto de levadura o células inactivas de levadura y otros componentes. Estos productos pueden lograr mejores resultados ya que poseen un valor nutritivo más alto debido al aporte de aminoácidos y vitaminas de los componentes. En consecuencia, el efecto de añadir un producto específico es mayor que solo agregar la misma cantidad de sales de nutrientes (McLaren et al., 2001).

Sea cual fuere el caso, tanto para formulados para compensar deficiencias de zinc como de nitrógeno y vitaminas, siempre se debe respetar la dosis recomendada de los productos formulados para la nutrición de levadura, ya que cantidades excesivas de nutrientes pueden causar toxicidad en levaduras.

3.2.3 Control de temperatura

El control de temperatura es uno de los factores que más influye en la calidad de la cerveza y en su uniformidad en los diferentes lotes. Ante un eventual problema, la primera opción del productor es que haya existido algún tipo de contaminación y la segunda opción, sin duda, es la temperatura de la cerveza en todas las fases de fermentación. Las altas o bajas temperaturas en los diferentes momentos de fermentación afectan la producción *off-flavors* y la capacidad de la levadura para reducir muchos compuestos al final de la fermentación como por ejemplo diacetilo y acetaldehído. En el capítulo 8 se abordarán los casos particulares de esta temática.

La fermentación de la levadura produce calor a partir de la energía del metabolismo, elevando así la temperatura del mosto que debe ser contenida para que la levadura no produzca sabores extraños o muera por calor extremo. Los cambios de temperatura no controlados producen resultados indeseados, especialmente cuando los tamaños de los lotes son pequeños, dado que rápidamente se ven afectados por cambios en la temperatura ambiente.

La temperatura óptima de fermentación depende del tipo de levadura, de la cepa, y del tipo de cerveza y los sabores que busca el cervecero. Tradicionalmente, los cerveceros fermentan las cervezas Ale alrededor de 20 °C y Lager entre unos 10 – 12 °C aproximadamente. Sin embargo, estas no son las temperaturas óptimas de ese tipo de levaduras, las cepas de Ale crecen más rápido a 32 °C y cepas Lager a 27 °C. Probablemente se pregunten ¿por qué se utilizan habitualmente temperaturas de fermentación tan bajas? A mayores temperaturas, la levadura fermenta demasiado rápido provocando una mayor tasa de crecimiento que puede estimular la producción de alcoholes superiores (fusel), y como consecuencia sabores indeseados. A lo largo de la historia de la elaboración de cerveza, se fue asentando un rango de temperatura que no es demasiado bajo para la levadura, pero lo suficientemente bajo como para moderar la tasa de crecimiento celular y mejorar el sabor de la cerveza.

Desde una perspectiva de sabor, es importante mantener la fermentación a la temperatura correcta, generalmente alrededor de 20 °C en cervezas Ale, ya que una variación de 2 °C en organismos unicelulares como las levaduras es sumamente significativa. Las células cambian de metabolismo, y producen diferentes tipos de proteínas para proteger su membrana celular tanto a altas como bajas temperaturas. Desafortunadamente, la producción de proteínas de protección a la temperatura impide la capacidad de la célula para producir otras proteínas necesarias para la división celular, la fermentación u otras funciones celulares. Desde el punto de vista productivo, cuanto más baja es la temperatura de fermentación, más pausada es la actividad de la levadura y da como resultado un proceso muy lento y posiblemente fermentaciones estancadas. Las temperaturas más altas aumentan la actividad de la levadura (hasta cierto punto) e incrementan metabolitos secundarios que afectan el sabor como por ejemplo ésteres. Temperaturas excesivamente altas, por encima de 35 °C para levaduras Ale, detendrán la fermentación (a excepción de levaduras de origen noruego tipo Kveik).

En términos generales, cuando se utiliza la tasa de inoculación adecuada de levadura saludable, la temperatura óptima inicial para la mayoría de las fermentaciones es solo un par de grados por debajo de la temperatura de fermentación deseada. La secuencia correcta recomendable es: **1)** Colocar la levadura en el mosto (inocular). **2)** Permitir que la temperatura aumente gradualmente hasta llegar a la deseada en el transcurso de 18 a 36 horas. **3)** Una vez alcanzada la temperatura de fermentación, mantenerla estable hasta al menos el último tercio o cuarto de la fermentación. En este punto subir la temperatura dos a cinco grados Celsius durante uno o dos días. Para ese entonces, la levadura ya debió producir la mayoría de los compuestos de sabor, por lo que hay poco riesgo de aumento de sabores indeseados. La temperatura más alta cerca del final de la fermentación beneficia la actividad de la levadura y por consiguiente reduce los tiempos de producción. La levadura es más propensa a atenuar y reducir completamente los compuestos intermedios que produjo previamente. El aumento de la actividad también ayuda a eliminar algunos compuestos volátiles, como el azufre. Importante: en las cervezas extremas de estilos belgas, la temperatura de fermentación ya es bastante alta y no será necesario este último aumento en la temperatura.

3.2.4 Fermentador adecuado

En todo sistema de producción es importante controlar la mayor cantidad de variables. En cervezas convencionales es importante asegurar que la fermentación sea llevada a cabo por una sola cepa de levadura y no se contamine. Para minimizar esta posibilidad se utilizan habitualmente fermentadores cilíndricos cerrados, de esta manera se evita la colonización del mosto por microorganismos ambientales. Los fermentadores cilíndricos presentan varias ventajas, generalmente tienen un excelente control de temperatura, además de la posibilidad de limpieza CIP y una canilla inferior que facilita la cosecha de levaduras para ser reutilizadas. En fermentadores cilíndricos extremadamente altos pueden causar más estrés a la levadura a causa de la presión ejercida por la columna de líquido, sin embargo, no es el caso de los fermentadores utilizados en microcervecías de La Pampa y la región.

El material recomendado para los fermentadores es el acero inoxidable por su durabilidad, control de temperatura mediante camisas en los laterales, facilidad de limpieza (superficie interna pulida) y resistencia a la acción de limpiadores alcalinos y ácidos. Por otra parte, los fermentadores plásticos son menos resistentes a la acción de ciertos limpiadores alcalinos (principalmente si se los utiliza a altas temperaturas) y podrían presentar algunos problemas de limpieza, especialmente aquellos fermentadores con salidas roscadas. Éstos junto con la susceptibilidad a rayones y la mayor dificultad de eliminar la “piedra de cerveza”, determinan la menor durabilidad de los fermentadores plásticos.

Respecto a la calidad comparativa no existen diferencias apreciables entre cervezas producidas en un fermentador plástico, en buen estado y con un acorde control de temperatura, y un fermentador de acero inoxidable, siempre y cuando se tenga especial cuidado en el estado de conservación de los fermentadores y en la limpieza y sanitización de los mismos.

Los cerveceros caseros tienen ciertas ventajas como la libertad y el tiempo de poder experimentar con todos los sistemas de fermentación (sistemas abiertos, cerrados, fermentadores con fondo plano y fermentadores cilíndricos a pequeña escala), es por esto que muchas microcervecías conservan sus equipos de cocción hogareños para experimentar con diferentes técnicas y recetas.

3.2.5 Monitoreo de Fermentación

Es importante monitorear la fermentación y registrar el progreso de la temperatura, la densidad y el pH. Junto con esta información deberá registrarse también el número de lote,

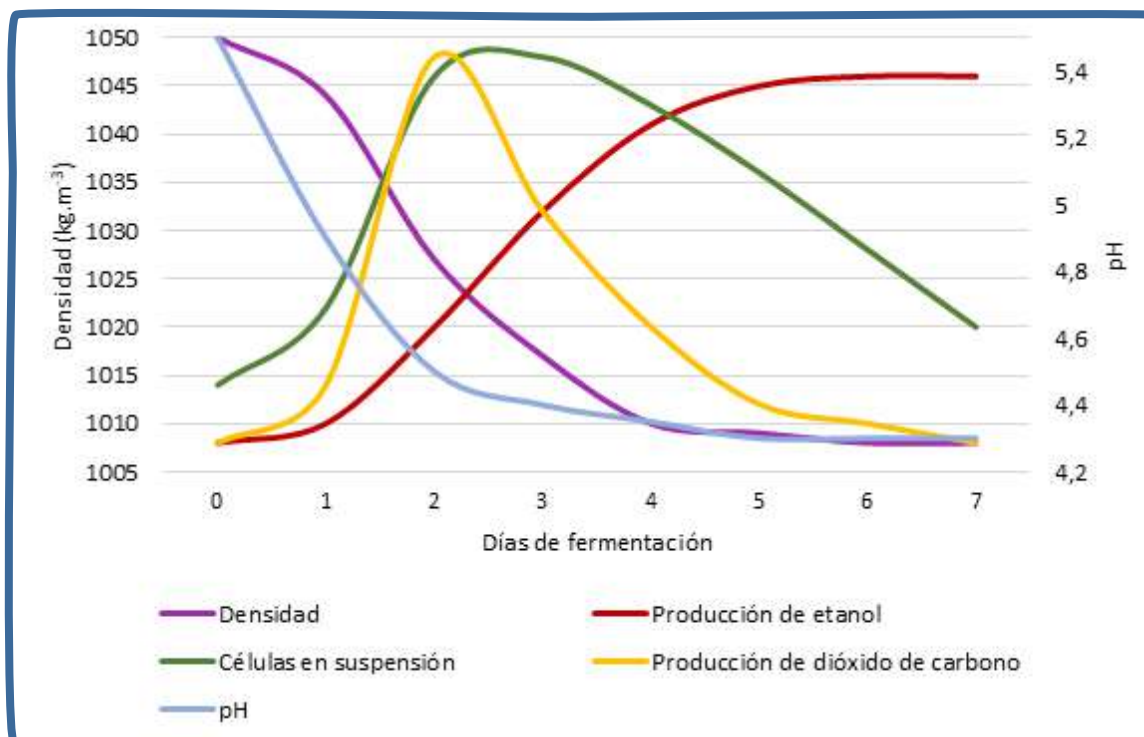
estilo de cerveza, densidad inicial, volumen de mosto, cepa de levadura y origen (si es levadura reutilizada, lote de procedencia), cantidad y viabilidad de la misma. Además, detallar observaciones como floculación, sedimentación, actividad, sabores y aromas.

Existen en el mercado equipos y métodos de monitoreo de la fermentación en tiempo real que registran valores de temperatura, equipos más sofisticados pueden registrar además, densidad actual, turbidez, concentración de oxígeno y dióxido de carbono, y pueden enviar los resultados a dispositivos de telefonía móvil a través de internet permitiendo a los cerveceros mantener el control incluso cuando no están en las cervecerías. Estos dispositivos también pueden calcular la velocidad de fermentación y la producción de alcohol. Sin embargo, si el cervecero no puede acceder a este tipo de herramientas electrónicas, puede hacerlo con elementos simples como un termómetro, un densímetro y un medidor de pH. Lo importante es mantener rigurosa atención a la fermentación para detectar problemas de manera anticipada y evitar pérdidas de tiempo y económicas.

3.3 CURVAS DE CRECIMIENTO DE LEVADURAS

En microbiología, la palabra crecimiento se define como el incremento en el número de células, en este caso de células de levadura. A través de recuentos directos en microscopio, por períodos de tiempo fijos, se puede construir una curva de crecimiento de levaduras. Además, si a esta curva se le añaden otros datos como pH, densidad, producción de CO_2 y síntesis de etanol, se puede construir una “curva de fermentación” (Figura 3.1). Algunos autores diferencian en una curva de fermentación cuatro o cinco fases, pero en términos prácticos y de simplicidad abordaremos las siguientes: **1)** Fase de latencia (de cero a 15 hs), **2)** Fase de crecimiento exponencial (de dos a cuatro días) y **3)** Fase estacionaria (de tres a 10 días).

Figura 3.1: Curva de fermentación típica [adaptada de Parker (2008), Kunze (2006) y Palmer (2006)].



3.3.1 Fase de latencia

Esta fase inicia en el momento de inoculación de la levadura en el mosto, en las primeras horas no se observa ninguna actividad, es una fase de aclimatación de la levadura donde prácticamente no hay crecimiento celular al inicio y es muy bajo al final de la misma. Las células comienzan a absorber oxígeno, minerales y aminoácidos e inician la síntesis de enzimas necesarias para el crecimiento.

Una técnica común cuando se trabaja con una tasa de inoculación ligeramente inferior a la ideal, es llevar a cabo la fase de latencia uno o dos grados por arriba de la temperatura de fermentación objetivo, ya que la temperatura afecta directamente el crecimiento de la levadura. Si bien no crea sabores extraños directamente, puede aumentar algunos precursores, como el alfa-acetolactato precursor de diacetilo. Además de este precursor, la levadura produce mínimos compuestos de sabor durante la fase de latencia y muy poco etanol, por lo que la formación de ésteres no es una preocupación.

Cuando se dispone de suficiente cantidad de levadura saludable para inocular, y se tiene la capacidad de enfriar el mosto a temperaturas de fermentación dentro de un tiempo razonable, la mejor opción para la calidad de la cerveza es a menudo iniciar a temperatura de fermentación o ligeramente inferior. Permitir que la temperatura de fermentación aumente durante las primeras 18 a 36 horas hasta que alcance la temperatura deseada, promueve el crecimiento controlado y a menudo resulta en una mejor salud general de la levadura, menos fugas a través de la membrana de la célula, y por lo tanto un perfil de cerveza más limpia. No será visible ninguna actividad durante la fase de latencia (de ahí su nombre), pero es un paso muy importante para la formación de nuevas células sanas para la fermentación.

La tasa de inoculación juega un papel importante en la calidad de la fase de latencia. La sobreinoculación (colocar mayor cantidad de levadura que la óptima) puede disminuir la fase de latencia, pero cada célula individual no será tan saludable al final de la fermentación ya que habrá menos propagación de levadura y la biomasa resultante será de células envejecidas. Aunque al cervecero le resulte tranquilizador ver actividad de fermentación dentro de la primera hora, no es la condición óptima para la levadura. De igual manera cuando se quiere “ahorrar” en cantidad de levadura y se trata de compensar con un mayor crecimiento a mayor temperatura y agregado de nutrientes. El excesivo crecimiento celular puede provocar sabores indeseados y a menudo deja a las células menos saludables para esa fermentación y para futuras fermentaciones.

3.3.2 Fase de crecimiento exponencial

Durante esta fase, el conteo de células aumenta rápidamente, la levadura consume azúcares en solución, produce etanol, CO₂ y compuestos de sabor. La gran producción de CO₂ crea una capa de espuma en la superficie de la cerveza. En esta fase, la velocidad de crecimiento es máxima de acuerdo a las condiciones de fermentación. La inoculación con levaduras que están en su velocidad de crecimiento máxima, acorta la fase de latencia y aumenta la población en la fase exponencial (Arevalo Chávez, 1998).

En la fase de crecimiento exponencial es primordial un correcto control de temperatura que modere la producción de compuestos de sabor. Luego, en la siguiente fase no es determinante mantener una baja temperatura porque la mayoría de los compuestos ya han sido producidos.

“En la fase de crecimiento exponencial es primordial un correcto control de temperatura que modere la producción de compuestos de sabor.”

3.3.3 Fase estacionaria

A medida que los nutrientes del medio se agotan y se acumulan los subproductos, la velocidad de crecimiento se reduce, esto determina el inicio de la fase estacionaria. En este punto, las levaduras ya han producido la mayor parte de los compuestos de sabor y aroma, que incluyen alcoholes superiores, ésteres y compuestos de azufre, generalmente a esta cerveza se la denomina “cerveza verde” puesto que todavía hay muchos compuestos presentes que asociamos con una cerveza joven que no ha alcanzado aún el equilibrio adecuado de sabores. La cerveza madura en esta fase, por lo que también es conocida como fase de acondicionamiento. La levadura reabsorbe gran parte del diacetilo y acetaldehído producido durante fermentación, y el sulfuro de hidrógeno continúa liberándose como gas. La capa superior de espuma precipita y los flóculos de levadura comienzan a asentarse. A partir de este punto, muchas cervecerías enfrían el contenido del fermentador gradualmente hasta llegar a un rango de temperatura entre 0 y 4 °C, lo que obliga a la mayor parte de la levadura a sedimentar. A pesar de que esta es una herramienta válida, hay que tener precaución de no forzar la levadura a que entre en latencia antes de que haya tenido todas las oportunidades para metabolizar subproductos de la fermentación. White y Zainasheff mencionan en su libro “Yeast” que conocían una cervecería comercial que tenía un alto nivel de diacetilo en sus cervezas porque el proceso estaba apresurado, sin embargo una vez que la cervecería proporcionó un poco más de temperatura y tiempo, la cerveza pasó de mantecosa a fantástica.

Es importante que se puedan reconocer estas fases, ya que permitirá identificar más fácilmente las posibles áreas problemáticas. La recomendación más importante es, esperar a que la levadura termine su actividad y limpie los subproductos de la fermentación tanto como sea posible.

3.4 DENSIDAD

La densidad se define como el cociente entre la masa de un cuerpo y el volumen que ocupa. En el Sistema Internacional la unidad de masa es kilogramos (kg) y la unidad de volumen es metros cúbicos (m³), entonces la densidad se medirá con instrumentos llamados densímetros (Figura 3.2) y sus unidades serán kilogramos por metro cúbico (kg/m³).

Se puede aprender mucho sobre el avance y calidad de fermentación mediante los controles diarios de la densidad, siempre y cuando se pueda garantizar que el muestreo no contamine la cerveza. Es verdaderamente importante registrar la densidad original (DO) y la densidad final (DF), así como cualquier otra medida de densidad junto con la fecha en que se realizó. Entonces la pregunta sería ¿Cuándo se establece la densidad final? La respuesta es cuando la densidad permanezca igual durante dos días seguidos, esto indica que la fermentación terminó.



Figura 3.2: Modelos de densímetros.

3.5 ATENUACIÓN

La atenuación es la cantidad porcentual de azúcares del mosto que fue fermentado por la levadura. Para calcular este parámetro se utiliza el dato de densidad previa a inocular la le-

vadura (DO = densidad original) y la densidad luego de la fermentación (DF= densidad final). La densidad de la solución será mayor cuantos más azúcares estén disueltos en el mosto, a medida que la levadura utiliza los azúcares para su metabolismo, la densidad de la solución disminuye.

Se puede calcular la atenuación aparente mediante la siguiente fórmula:

$\text{Atenuación aparente (\%)} = \frac{(DO - DF)}{(DO - 1000)} * 100$	<p>donde:</p> <p>DO es densidad original o inicial</p> <p>DF es densidad final</p>
---	--

Por ejemplo: si la densidad original es de 1055 kg/m³ y la densidad final es de 1010 kg/m³, entonces la atenuación aparente es 81,81%. Se llama atenuación aparente porque el alcohol es menos denso que el agua y esta presencia de alcohol afecta la lectura de la densidad final sobreestimándola. Por esto, algunas fábricas industriales calculan la atenuación real quitando el alcohol y reemplazándolo por agua. De todos modos, los cerveceros artesanales utilizan el término atenuación en referencia a la atenuación aparente.

“El rango de atenuación para las cepas de levadura de cerveza es típicamente del 70 al 85% aproximadamente.”

Algunas fermentaciones es posible que alcancen el 100% o más de atenuación aparente, sin embargo es raro que una fermentación de cerveza consuma todos los azúcares presentes y se alcance el 100% de atenuación real, ya que el mosto de cerveza contiene una mezcla compleja de carbohidratos y muchos de ellos no son fermentables. El mosto contiene cinco azúcares fermentables (glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa y maltotriosa), siendo la maltosa la que se encuentra en mayor porcentaje, seguida de maltotriosa y glucosa. Salvo casos excepcionales, las cepas de levadura utilizadas habitualmente no pueden fermentar dextrinas pero difieren en la capacidad para fermentar la maltotriosa y como consecuencia en su capacidad de atenuación. El rango de atenuación para las cepas de levadura de cerveza es típicamente del 70 al 85%.

Una cerveza correctamente fermentada con muchos carbohidratos complejos va a tener una mayor densidad final (DF), una sensación en boca plena, con más cuerpo, pero no necesariamente un sabor dulce. En una cerveza completamente atenuada si hay un sabor dulce es a menudo el resultado de otros factores, como la presencia de diversos alcoholes u otros compuestos de sabor como diacetilo o muy baja presencia de lúpulo.

El rango de atenuación de cada cepa de levadura se puede encontrar en los catálogos. Sin embargo, las características del mosto y las condiciones de fermentación hacen que la atenuación pueda ser diferente. A pesar de esto, comprobar el nivel actual de atenuación con el rango de catálogo es una forma de saber si la levadura ha completado, o está cerca de completar la fermentación. Si bien hallar valores que se encuadren dentro del rango de catálogo no es garantía de que la fermentación este completa, aquellos valores por fuera de este rango indican algún tipo de problema. Como regla general se puede decir que, cuanto mayor sea la densidad inicial de un mosto, mayor será la densidad final de la cerveza. Sin embargo, dos mostos de diferente composición pueden alcanzar diferentes niveles de atenuación, incluso con la misma levadura y la misma densidad original (DO). Una atenuación completa es clave para generar cerveza de alta calidad.

3.6 FLOCULACIÓN Y SEDIMENTACIÓN

La floculación y la sedimentación de la levadura son dos fenómenos diferentes. La floculación es un proceso complejo donde dos o más células de levadura se adhieren entre sí formando un grumo de levaduras (flóculo). Por otra parte, la sedimentación es el proceso mediante el cual las partículas (células de levadura u otras sustancias no disueltas) se depositan en la parte inferior de un recipiente.

El fenómeno de la sedimentación puede ser explicado por la **Ley de Stokes**:

$u = \frac{2}{9} * \frac{r^2 * g (\delta p - \delta f)}{\eta}$	<p>donde:</p> <ul style="list-style-type: none"> u Es la velocidad de caída de las partículas r Es el radio equivalente las partículas g Es la aceleración de la gravedad δp Es la densidad de las partículas δf Es la densidad del fluido η Es la viscosidad del fluido
--	---

La velocidad a la que se asientan las partículas en suspensión está determinada por varios parámetros que incluyen, el tamaño y densidad de la partícula, y la viscosidad y densidad del líquido. Esta ley establece que cuando se duplica el radio de una partícula (aumento de tamaño), la velocidad de sedimentación es cuatro veces más rápida. Por esto las cepas de levadura con fuertes características de floculación tienden a adherirse entre si (aumentar el tamaño de partícula) y sedimentan mucho más rápidamente obteniéndose cervezas más claras.

Las distintas cepas de levaduras tienen determinadas características de floculación, algunas más floculantes que otras. Esta propiedad está influenciada por factores físicos y químicos, y depende principalmente de la presencia de iones de calcio (Ca^{2+}). Los problemas de fluctuación se pueden evitar asegurando un mínimo de 50 ppm de Ca^{2+} en el agua de preparación.

La edad y tamaño de las células de levadura son otros de los factores claves, las de mayor edad poseen más cicatrices, mayor tamaño y por lo tanto, son más floculantes. Las características de la pared celular son de enorme importancia para que la floculación tenga lugar.

Algunas cepas altamente floculentas pueden sedimentar prematuramente, causando problemas para terminar la fermentación. A la hora de elegir una cepa, el cervecero antepone el sabor que desea lograr y no la floculación de las cepas por eso debe aprender a manejarlas. En general, las condiciones más frías favorecen la floculación, mientras que niveles más altos de azúcar, presencia de oxígeno y mala salud de la levadura inhiben la floculación. Por eso conocer el comportamiento de floculación de una cepa de levadura y la dinámica de sedimentación de los sólidos en la cerveza, permitirá brindar una herramienta más a la hora de planificar la recolección de crema de levaduras para la práctica de reutilización que se tratará en el capítulo 4.

3.7 DESCANSO DE DIACETILO

Este término proviene de la bibliografía, donde en general se hace referencia a la producción de cervezas Lager. En mayor medida, este tipo de cervezas producidas de manera industrial impulsaron el desarrollo y la investigación científica. Probablemente, es por esto, que en el ambiente *Craft Beer* se denomine “Descanso de Diacetilo” en lugar de “Maduración en Caliente” que podría ser la denominación adecuada para la maduración de cerveza Ale.

La levadura cervecera, durante la fermentación del mosto, produce innumerables subproductos, el diacetilo es uno de ellos y se puede considerar uno de los descriptores más popular en la elaboración de cerveza reconocido por su aroma similar a la manteca, pochoclo, o al *toffee*. Los mecanismos bioquímicos de la formación de diacetilo exceden los objetivos de este manual, pero el manejo postfermentación es importante para controlar los niveles de esta sustancia y sus precursores.

El control de la temperatura afecta de manera directamente proporcional a los niveles de producción de diacetilo, a medida que aumenta la temperatura también lo hace la producción de este compuesto. Sin embargo, el aumento de la temperatura también acrecienta la tasa de reabsorción de diacetilo por la levadura que continúa metabolizándolo.

La clave está en proporcionar el tiempo de maduración y temperatura correcta para la reducción de diacetilo en cada cerveza, así garantizar la salud de la levadura y una fermentación vigorosa. El enfriamiento de la cerveza demasiado temprano puede dejar una cantidad considerable de precursor y diacetilo en la cerveza. En principio, es posible que la cerveza no tenga sabor a diacetilo, pero puede contener un alto nivel de precursor imperceptible, por lo que cualquier incorporación de oxígeno durante los trasvases o el envasado probablemente oxidarán el precursor transformándose en diacetilo. Antes de enfriar una cerveza para clarificarla, es conveniente realizar una “Prueba de fuerza de diacetilo” (ver capítulo 6).

La maduración de caliente de cervezas o descanso de diacetilo, se realiza generalmente liberando el control de temperatura (en cervezas Ale se limita la temperatura hasta 24 o 25 °C) para que la cerveza aumente algunos grados centígrados por un período de dos días cerca del final de la fermentación. Una vez alcanzada la densidad final, se debe evitar disminuir drásticamente la temperatura del fermentador ya que la cerveza puede contener elevados niveles de diacetilo o su precursor. Es importante que quede claro que el aumento de la temperatura en esta etapa acelera el proceso, sin embargo si la temperatura permanece constante, la reabsorción del diacetilo ocurrirá pero de manera un poco más lenta. Por esta razón, el descanso de diacetilo no implica necesariamente un aumento de la temperatura, sino más bien es una etapa de reabsorción de compuestos, o sea de maduración.

“Si la temperatura permanece constante, la reabsorción del diacetilo ocurrirá pero de manera un poco más lenta. Por esta razón, el descanso de diacetilo no implica necesariamente un aumento de la temperatura, sino más bien es una etapa de reabsorción de compuestos, o sea de maduración.”

3.8 CLARIFICACIÓN EN FRÍO

Una vez que se completa la fermentación y concluidas todas las etapas, es recomendable bajar la temperatura de la cerveza para mejorar su calidad. El tiempo y la temperatura de la clarificación en frío o maduración pueden variar con el estilo de cerveza y la cepa utilizada. En el caso de las cervezas Ale el tiempo de acondicionamiento en frío es menor que para las cervezas Lager y puede tener solo el objetivo de clarificar la cerveza. En las Lager, se busca una lenta actividad de la levadura para producir cambios en las concentraciones de los subproductos de la fermentación, por lo que el tiempo de acondicionamiento es mayor. Este tipo de cervezas generalmente fermentan en un rango de temperaturas de entre 10 – 13 °C, la fermentación es más lenta y se producen menos ésteres y alcoholes superiores. Sin embargo, al ser menos intensa, mantiene más azufre en la solución y se reduce la reabsorción de diacetilo.

En cervezas Ale, el objetivo principal de un período en frío es la clarificación de la cerveza, además de ayudar a perfeccionar los sabores y mejorar notablemente la calidad. Las cervezas de estilos muy lupulados y las de bajo contenido de alcohol, es conveniente que sean consu-

midas tempranamente, evitando un prolongado período de clarificación en frío. En cambio, cervezas con complejidad de maltas y alto contenido de alcohol, mejoran con un período más largo de tiempo. Las cervecerías artesanales enfrían las cervezas casi al punto de congelación, entre 0 y 4 °C, para favorecer la floculación de las levaduras que todavía no sedimentaron.

Un cuestionamiento habitual entre las personas que elaboran cerveza es, si el descenso rápido de la temperatura de la cerveza provoca algún tipo de *shock térmico*. En las cervezas Ale no existe ese riesgo ya que luego de un adecuado descanso de diacetilo la levadura puede entrar en fase de latencia y no afectar las características de la cerveza. Sin embargo, un descenso muy rápido de la temperatura (reducción de 20 °C en menos de 6 horas) al final de la fermentación puede hacer que la levadura produzca algo más de ésteres. Por otro lado, una disminución prematura de la temperatura puede desencadenar en las levaduras la producción de proteínas para proteger su membrana celular, como se describió en el ítem 3.2.3 de este capítulo.

En el caso particular de las cervezas Lager, Kunze (2006) explica que luego de las fermentaciones Lager la cerveza verde es enfriada lentamente, el descenso de temperatura no debe ser mayor que un grado Celsius por día y debe ocurrir uniformemente. Esto permite que mientras la fermentación disminuye, la levadura comience a flocular y se produzca un enfriamiento lento que evita que la levadura entre en latencia. Después de pocos días la cerveza ha alcanzado una temperatura cercana a 4 °C y subsisten aún algunos azúcares fermentables, alrededor de 4 a 8 puntos de densidad por descender. En este punto, se transfiere la cerveza a los tanques de almacenamiento y maduración. Los tanques están cerrados y la cerveza genera presión de CO₂ que es controlada por una válvula de purga para evitar dañar las células de levadura. Esta técnica depende de un control preciso de la temperatura para que la fermentación sea lenta y continua durante todo el período, la levadura necesita permanecer activa durante mucho tiempo para reducir cualquier subproducto de la fermentación en la etapa de acondicionamiento/maduración. Entonces en cervezas Lager, un descenso brusco de la temperatura, *shock térmico* por frío, puede afectar los tiempos de producción y la calidad de la cerveza.

3.9 FACTORES DE ESTRÉS EN LEVADURAS

En la bibliografía existen antecedentes en cuanto a los factores que generan estrés en las levaduras y afectan las fermentaciones (Anness et al., 1982; D'Amore et al., 1991; Verstrepen et al., 2003; Zhao y Bai, 2009; Bleoanca y Bahrim, 2013). En microbiología se entiende por estrés a las situaciones desfavorables del ambiente que perjudican las funciones vitales y el crecimiento de las levaduras, lo que conduce a cambios fisiológicos para contrarrestar estas condiciones adversas y puede comprometer la salud de la levadura y la calidad de las cervezas. Algunas de los factores más relevantes son la temperatura, el etanol, la presión osmótica, escases de nutrientes, la oxidación y el envejecimiento de la célula de levadura. Conocer los factores que generan estrés en las levaduras, permite lograr fermentaciones activas y homogéneas lote a lote.

Al final de una fermentación, los niveles de azúcares y demás nutrientes en el mosto disminuyen y comienzan a escasear, las levaduras censan estos cambios y sintetizan azúcares de reserva para sobrellevar un período de latencia. En una primera etapa sintetizan glucógeno y luego trehalosa, esta última desempeña un rol fundamental en la mejora de la supervivencia de las levaduras bajo condiciones ambientales extremas. Las cepas de levadura con mayor capacidad de sintetizar trehalosa son más tolerantes al estrés osmótico y resisten mayor tiempo de conservación en frío. Sin embargo, la oxigenación promueve el consumo de trehalosa por parte de la levadura, por esto que cuando se conserva biomasa de levaduras para su reutilización, se debe evitar la incorporación de oxígeno para no inhibir la capacidad de tolerar el estrés.

3.9.1 Estrés térmico

La temperatura es uno de los factores más influyentes en el metabolismo, puede actuar como activadora o inhibidora del desarrollo de microorganismos. En general, en las cervecerías no se producen cambios drásticos de temperatura cuando se fermentan mostos, de todos modos hay que asegurarse de enfriar la cerveza luego de concluidas todas las etapas de la fermentación, ya que temperaturas elevadas (20 °C) en condiciones de escasez de nutrientes atentan contra las reservas de carbohidratos de las levaduras.

En las clarificaciones en frío se recomienda mantener temperaturas entre 0 y 4 °C, por debajo de ese rango pueden provocar congelamiento y la cristalización del agua daña la estructura de la membrana celular; por encima de ese rango las levaduras pueden activar su metabolismo y las reservas de glucógeno y trehalosa disminuyen rápidamente. El manejo del estrés térmico es especialmente importante para la reutilización de levaduras, ya que una disminución en las reservas energéticas se relaciona directamente con bajos niveles de viabilidad y vitalidad.

3.9.2 Estrés por etanol

El etanol es el producto principal de la fermentación de la cerveza, no obstante es un factor de estrés que inhibe el crecimiento celular y determina los cambios metabólicos que conducen a la reducción del rendimiento de fermentación de las levaduras. La resistencia de la levadura al estrés por etanol aumenta cuando los ácidos grasos de la membrana son cadenas de carbono largas (Boulton y Quain, 2006). Además de las altas temperaturas, la escasez de nutrientes, el pH reducido y un alto potencial osmótico, amplifican los efectos negativos del etanol (Lentini et al., 2003).

En un mosto oxigenado, la levadura es capaz de adaptar la fluidez de su membrana sintetizando ergosterol, absorbe mejor los nutrientes y elimina el alcohol del interior de la célula, proceso que la vuelve más tolerante al etanol.

3.9.3 Estrés osmótico

La presión osmótica hace referencia a la presión hidrostática necesaria para detener el agua que pasa a través de una membrana que separa dos soluciones de diferentes concentraciones. Cuando la concentración de una solución aumenta (mostos de alta densidad) se produce estrés osmótico, donde el agua contenida en la célula de levadura tiende a salir al medio, y la célula se deshidrata (plasmólisis celular). La respuesta de las levaduras a la deshidratación es la incorporación de distintas sustancias desde el mosto hacia el interior, hasta que la presión osmótica del interior se iguale con la del exterior. La síntesis de trehalosa es otro mecanismo de protección al estrés osmótico ya que aumenta la concentración de solutos en el interior de la célula. Las respuestas de tolerancia del estrés osmótico son variables y propias de cada cepa de levadura (Smart, 2003), algunas como las tipo Ale toleran la presión osmótica en mayor medida de las Lager (Nicolau y Turtoi, 2006).

3.9.4 Estrés nutricional

En este capítulo, se realizó una revisión completa de las necesidades nutricionales de las levaduras, cuando estas no están cubiertas las células sufren estrés nutricional y corre peligro la supervivencia celular. El mosto es un sustrato complejo que la levadura puede usar casi por completo para la fermentación. Después de un período de aclimatación, necesario para la inducción de enzimas específicas (fase de latencia), la levadura puede fermentar malta, el principal carbohidrato del mosto. Por lo tanto, la fermentación no suele considerarse

un paso tecnológico estresante, sin embargo, es imprescindible considerar la disponibilidad de nutrientes. Levaduras expuestas a condiciones limitadas de nitrógeno, forman a través del catabolismo de aminoácidos, alcoholes superiores como el isoamílico, reconocido como *off-flavor* en la mayoría de las cervezas (Fisher y Scott, 2000). Como se indicó anteriormente en este capítulo, si la concentración de nitrógeno de mosto asimilable es menor de 150 mg/L, la fermentación se interrumpe prematuramente (Boulton y Quain, 2006). Además, niveles bajos de aminoácidos determinan la formación excesiva de alcoholes superiores afectando la calidad de la cerveza (Gibson et al., 2007), mientras que la deficiencia de zinc en el mosto conduce a una fermentación lenta (Zhao y Bai, 2012).

Un caso particular de deficiencia de nutrientes ocurre cuando se agrega una cantidad de levaduras mayor a las necesarias, los nutrientes pueden ser insuficientes para la reproducción y una gran proporción de levaduras estresadas son cosechadas para su reutilización. Estas levaduras mostrarán vitalidad reducida y pérdida de viabilidad, afectando los lotes posteriores en los que utilice la levadura cosechada (Smart, 2003). Es importante no recolectar levaduras para su reutilización de un lote donde la fermentación fue deficiente o inadecuada.

3.9.5 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo es la respuesta de las levaduras al daño que le producen algunas especies de oxígeno como el anión superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Smart, 2003). Estas sustancias pueden provenir de dos fuentes diferentes, una fuente interna (metabolitos que las propias levaduras generan cuando se propagan aeróbicamente) o de una fuente externa (cuando quedan restos de desinfectantes oxidantes en los equipos cerveceros). Estas sustancias dañan lípidos, proteínas y ADN e influyen en las características fisiológicas, como consecuencia afectan el desempeño, la capacidad de reproducción y viabilidad de levaduras durante fermentaciones posteriores y la calidad de la cerveza producida.

La sobreoxigenación del mosto previo a la fermentación o restos de ácido peracético (desinfectante) en el fermentador o cañerías, enfriador de placas o mangueras, aumentan el estrés oxidativo. Se recomienda purgar con CO_2 los recipientes para coleccionar levadura y minimizar la incorporación de oxígeno a la biomasa de levaduras para su reutilización.

3.9.6 Estrés por envejecimiento

El proceso de replicación de levaduras en la que una célula madre produce una célula hija no es indefinido, existe un número límite donde una célula no puede seguir replicándose. Las células envejecidas no son capaces de responder a condiciones de estrés y mueren, este proceso no depende del tiempo sino de la cantidad de veces que se ha replicado. La determinación del envejecimiento se puede realizar mediante la observación microscópica, ya que cada división celular deja en la pared de cada levadura una cicatriz (Ver ítem 7.4.3). Las levaduras envejecidas presentan cuatro o más cicatrices, mayor tamaño, arrugas superficiales, gránulos en su citoplasma e incluso retención de células hijas (Priest y Stewart, 2006). Esta observación microscópica junto con la viabilidad de la levadura ayudan al cervecero a decidir continuar o no con la reutilización de ese lote de levaduras.

REUTILIZACIÓN DE LEVADURAS

REUTILIZACIÓN DE LEVADURAS

COSECHA DE LEVADURA

VIABILIDAD DE LEVADURAS

TASAS DE INOCULACIÓN



CAPÍTULO 4: REUTILIZACIÓN DE LEVADURAS

Dalmasso, Lucas Pablo

Si llegó hasta aquí y no leyó el capítulo 3, es recomendable que lo haga, ¡allí están las bases para una buena fermentación, indispensable para una correcta reutilización de levaduras!

Este capítulo del manual describe la técnica de reutilización de levaduras y las recomendaciones necesarias para que la misma sea eficiente. Para este procedimiento es imprescindible validar primero el protocolo de limpieza y desinfección para asegurarse que no existirán problemas con contaminantes, ya que mínimas contaminaciones de un lote de cerveza puede propiciar la propagación de microorganismos no deseados. La técnica de reutilización de levaduras permite mejorar la calidad de las cervezas y reducir los costos directos de producción, sin embargo es necesario considerar que se deberá contar con suficiente biomasa de levadura sin contaminantes, viable y con alta vitalidad.

“Para este procedimiento es imprescindible validar primero el protocolo de limpieza y desinfección para asegurarse que no existirán problemas con contaminantes.”

4.1 REUTILIZACIÓN DE LEVADURAS

La técnica de reutilización permite cosechar biomasa de levadura del fondo de un fermentador e inocular un mosto contenido en otro fermentador. El cervecero podrá obtener, de cada cultivo inicial, al menos entre cinco a diez reutilizaciones de levadura Ale de alta calidad, y de tres a cuatro reutilizaciones para cepas Lager. En este punto se deben considerar múltiples factores como, el momento de cosecha, el tipo de cepa, el tipo de fermentador, la densidad inicial del mosto, el color de la cerveza, el recuento de células de levadura y su viabilidad. Para llevar a cabo la reutilización se deberá validar el protocolo de limpieza y sanitización a través de técnicas que se detallan en los capítulos 6 y 7.

4.2 COSECHA DE LEVADURAS

Se denomina cosecha de levaduras a la recolección de la biomasa (crema de levaduras) generada en una fermentación. En términos generales existen dos momentos óptimos para realizar este proceso, denominados cosecha en caliente y cosecha en frío. En la **cosecha en caliente** la recolección de levadura sedimentada se realiza a temperatura de fermentación. El momento de la cosecha es entre el tercer y cuarto día de fermentación donde finaliza la fase de crecimiento exponencial e inicia la fase estacionaria. Es recomendable cosechar las levaduras en caliente cuando se alcanza un 85% de la atenuación, el momento exacto de la cosecha depende del comportamiento fermentativo de cada cepa y del estilo de cerveza que se elabore. Por ejemplo, una cerveza de densidad original de 1045 kg/m³ y una densidad final estimada de 1008 kg/m³, el momento óptimo de cosecha es cuando se alcanza una densidad entre 1013 - 1014 kg/m³.

“Es recomendable cosechar las levaduras en caliente cuando se alcanza un 85% de la atenuación”

No se recomienda la cosecha al inicio de la fase de crecimiento exponencial ya que los niveles de reservas energéticas (glucógeno y trehalosa) son bajos; tampoco se recomienda la

cosecha durante la fase estacionaria avanzada, ya que las reservas energéticas y la viabilidad en esa etapa también son bajas.

Otro momento óptimo para la cosecha de levaduras denominado **cosecha en frío**, se realiza después de la fermentación cuando la cerveza es enfriada. Se realiza justo antes de alcanzar 10–12 °C si el destino de la levadura es para uso inmediato, ya que la disminución de la temperatura no es tal para que las células entren en latencia, pero ayuda a la sedimentación y así se logra suficiente cantidad de biomasa en cepas de baja floculación y sedimentación. Por otra parte, si es para almacenarse por algún tiempo, se recomienda cosechar durante el primer o segundo día de la clarificación en frío para obtener una masa más compacta con mayor número de células por unidad de volumen.

Tanto para la cosecha en caliente como en frío, existe una relación de compromiso entre la viabilidad de las levaduras y el porcentaje de cerveza en la crema, se debe tener la mayor viabilidad posible y la menor proporción de cerveza en la crema. Las levaduras cosechadas se pueden almacenar en frío entre 2– 4 °C hasta 7 días. En el capítulo 8 se abordará la conservación en frío de levaduras cosechada y los factores que influyen en el almacenamiento de crema de levadura.

Una vez determinado el momento en el que se realizará la recolección de las levaduras, se debe proceder de manera correcta. La levadura dentro del fermentador posee una distribución por estratos con diferente calidad como se muestra en la Figura 4.1. El sedimento del tercio inferior del cono del fermentador (C) posee restos de proteínas y lúpulo mezclados con células de levadura con alta floculación y baja capacidad de atenuación, incluso muchas inactivas o con baja actividad metabólica. En contraposición, el sedimento en el tercio superior (A) posee levaduras que flocularon tardíamente y su cosecha se dificulta al mezclarse con la cerveza. En el tercio central del cono (B) se depositan aquellas levaduras que poseen la floculación y atenuación característica de la cepa en cuestión y mayor viabilidad de las células. Es recomendable descartar la parte inferior de la biomasa del cono (entre dos y tres litros de crema de levadura en un fermentador con 2000 litros de cerveza) y cosechar el estrato medio de levaduras. La levadura recolectada, deberá tener aroma agradable, de no ser así, es probable que exista algún problema de contaminación.

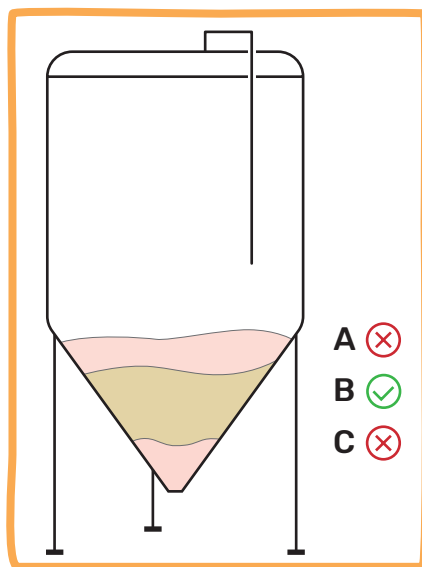


Figura 4.1: Esquema de estratificación de la calidad de levaduras en un cono de un fermentador. (A) Levaduras con baja floculación y lenta sedimentación. (B) Levaduras con floculación, sedimentación y atenuación de acuerdo a la cepa. (C) Sedimentación rápida, baja atenuación, baja viabilidad de las células y presencia de proteínas y restos de lúpulo.

La limpieza y sanitización son imprescindibles en todo el proceso de producción, antes de realizar la cosecha se debe procurar que las llaves de paso, mangueras y recipientes estén perfectamente limpios y sanitizados, además de evitar la circulación de corrientes de aire en el lugar.

Los recipientes que se utilizan para la recolección pueden variar en función de la escala de producción y la posibilidad de invertir en equipamiento específico. Generalmente, las opciones van desde un simple Erlenmeyer de un litro, un botellón de cinco litros, un “corni” de 10 litros, colectores de levadura de material plástico, hasta un barril de 50 litros modificado con válvulas mariposa, manómetro, salida de gases, toma muestras, homogeneizador, ruedas para facilitar el transporte y una amplia abertura con cierre clamp para una limpieza exhaustiva. Lo importante es que posea una superficie perfectamente lisa para facilitar la limpieza y una trampa de gases (air lock) que permita la expulsión de los mismos. Evitar los recipientes con hendidias, roscas y conectores que dificultan la limpieza y sanitización.

La biomasa de levadura recolectada, en general, es suficiente para inocular dos o tres fermentadores del mismo volumen que el original. La técnica de reutilización además de mejorar la calidad de las cervezas, genera una reducción muy importante en el costo de producción.

Esta técnica, tiene gran potencial y es más evidente en aquellas cervecerías que cuentan con suficientes fermentadores y capacidad de trabajo. A partir de una fermentación con un inóculo inicial (reutilización cero, levadura seca) y a través de tres reutilizaciones se pueden inocular potencialmente 14 fermentadores (Figura 4.2). En la práctica es un proceso más complejo, ya que en general, las cervecerías elaboran múltiples estilos con diferentes cepas, por lo que, se debe crear un diagrama de cocciones que permita realizar de manera eficiente el aprovechamiento de las levaduras.

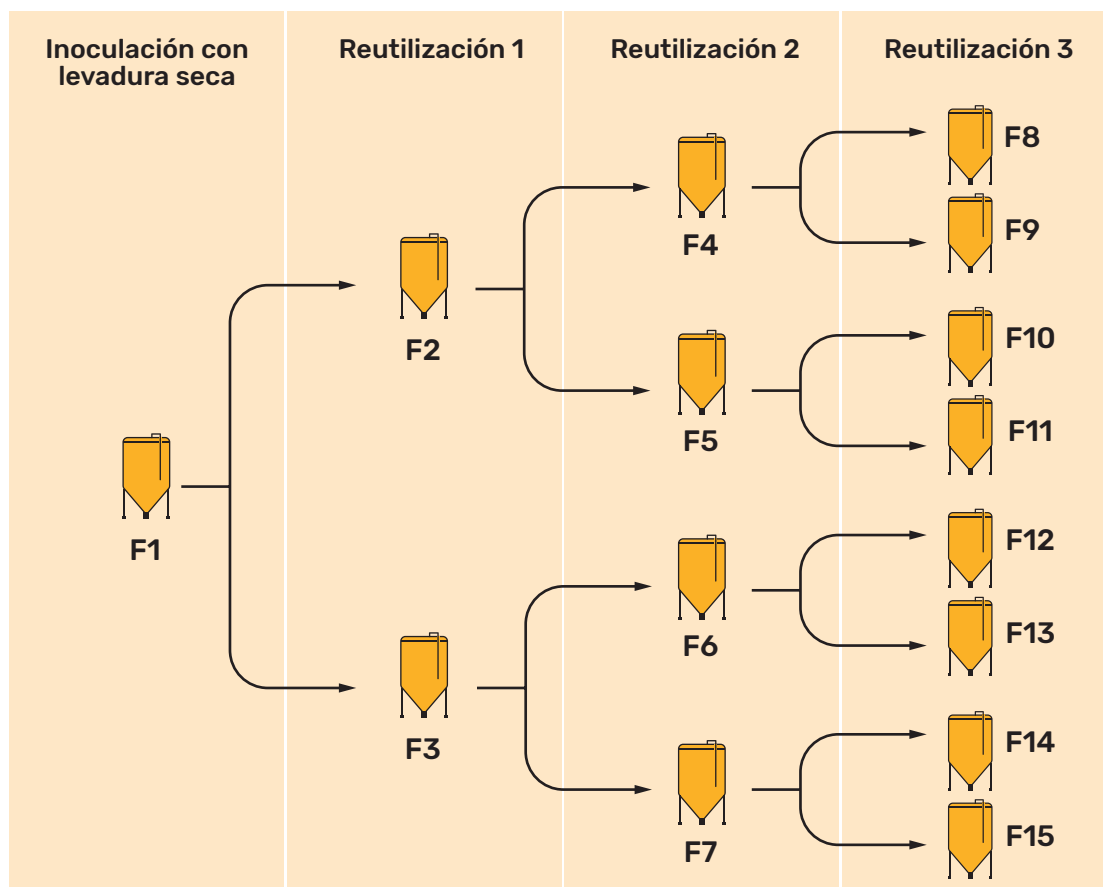


Figura 4.2: Capacidad potencial de tres reutilizaciones de levaduras (F =Número de fermentador).

Realizar un buen diagrama de cocciones permite organizar la elaboración de los diferentes estilos y aprovechar al máximo el potencial de reutilización de levaduras. En principio, hay que agrupar los estilos que utilicen la misma cepa de levadura. Como norma general se debe ir de menor a mayor en cuanto a color de la cerveza, amargor y porcentaje de alcohol. Además, en aquellos estilos de cerveza donde se realiza agregado de lúpulo en fermentación o posterior a ella (*dry hopping*), se debe cosechar la levadura antes de realizar esa técnica. No se recomienda cosechar levadura de un fermentador al que se le agregó lúpulo.

A modo de ejemplo, si una cervecería elabora con la misma cepa de origen americano cuatro estilos diferentes: Dorada Pampeana, American Pale Ale, American IPA y Black IPA, se pueden diagramar las reutilizaciones en función de la capacidad de la microcervecería como se muestra en la Figura 4.3. Si bien este ejemplo propone reutilizar sólo tres veces la biomasa de levadura, esta técnica puede extenderse más aún, siempre y cuando la cervecería tenga un estricto control sobre la limpieza y sanitización de equipos (con exámenes de laboratorio para su validación) y realice un manejo adecuado de levaduras. Existen indicadores que permiten visualizar hasta donde se puede reutilizar la levadura de un lote, para lo cual es imprescindible prestar atención a la disminución en el porcentaje de viabilidad, modificación en las curvas de fermentación y cualquier indicio de contaminación.

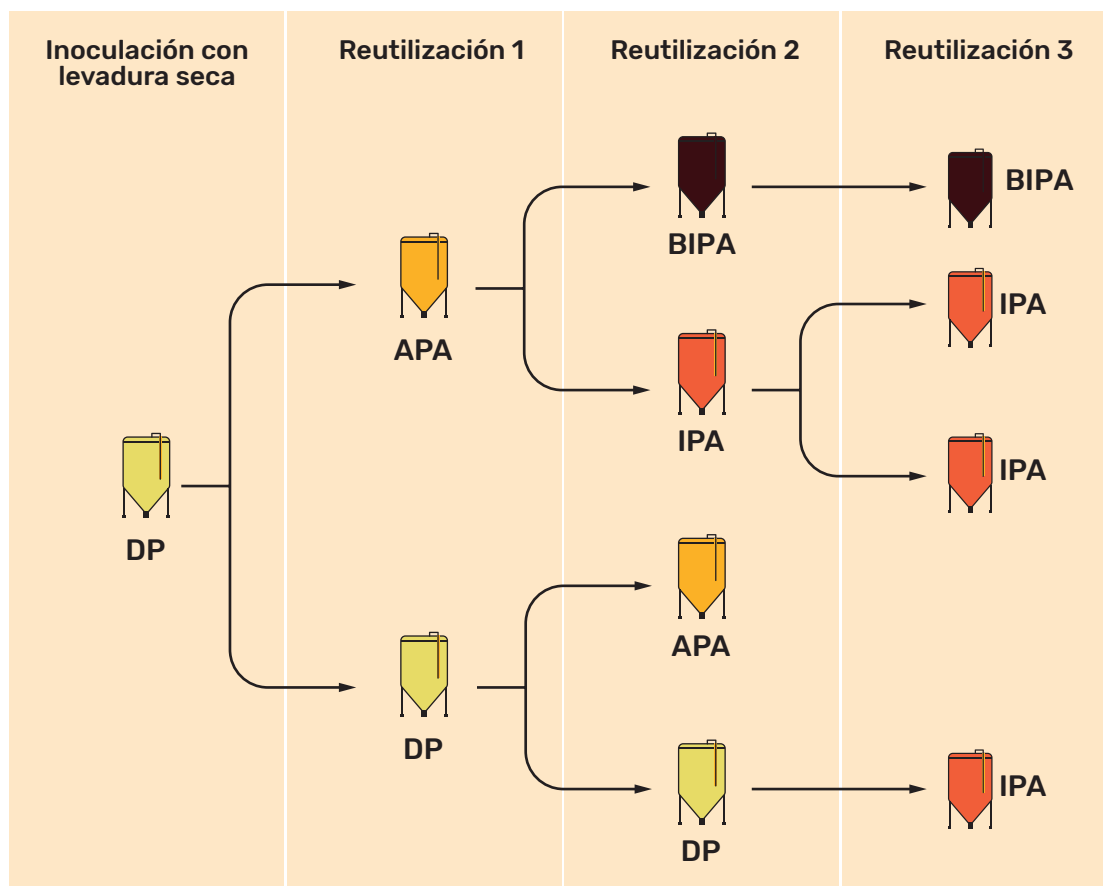


Figura 4.3: Diagrama de reutilizaciones de levaduras. Referencias: (DP) Dorada pampeana, (APA) American Pale Ale, (IPA) American IPA, (BIPA) Black IPA y (R) número de reutilizaciones de levadura.

4.3 VIABILIDAD DE LEVADURAS

Se utiliza el término de viabilidad para indicar si la levadura está viva o muerta y se expresa en porcentaje, a modo de ejemplo si una crema de levadura posee una viabilidad del 85% indica que, de un total de 100 células de levaduras 85 están vivas.

Este término es muy importante en la reutilización de levaduras, ya que no todas las células contabilizadas en muestra microscópica van a ser potencialmente capaces de fermentar (Ver ítem 7.4.5). Es importante aclarar que la viabilidad brinda información parcial, ya que no da cuenta del estado de la levadura de una población y tampoco la salud de la misma, para conocer la condición fisiológica de la levadura se debe referir a otro término, la vitalidad entendida como la cuantificación de la actividad metabólica de la levadura. Un cultivo de levadura posee alta vitalidad cuando es sano, con altos niveles de reservas energéticas, metabólicamente activo y listo para empezar la fermentación. Si las células están envejecidas y poseen pocas reservas energéticas, no serán capaces de lograr una buena fermentación, es decir, tendrán baja vitalidad. En función del estado de salud de la levadura, es posible que tenga que aumentar la cantidad de levadura a utilizar. Las pruebas para determinar vitalidad son muy costosas, difíciles de usar y pueden proporcionar datos controvertidos, por eso generalmente solo se utiliza el dato de viabilidad.

El método más aceptado a nivel mundial para la evaluación de viabilidad de levaduras es la tinción con azul de metileno, es un método simple y bastante preciso. El colorante azul de metileno ingresa a las células y es metabolizado volviéndose incoloro, entonces las células vivas se observan incoloras o azul pálido mientras que las células que no pudieron metabolizarlo se tiñen de azul intenso determinándose como muertas. En células que sufrieron muchas divisiones (envejecidas) el colorante no penetra adecuadamente por lo que la técnica no es precisa para muestras de levadura conservadas por más de una o dos semanas. Se recomienda no reutilizar levaduras con valores de viabilidad menores al 90%. Si bien algunos cerveceros compensan una menor viabilidad utilizando mayor cantidad de crema de levadura, esto puede conducir a problemas de fermentación si la salud de la levadura es baja, la fermentación no puede producir el rango esperado de los compuestos de sabor y aroma; y es posible que no atenúe lo suficiente por más levadura que se agregue.

4.4 TASAS DE INOCULACIÓN

La tasa de inoculación de levadura es la cantidad de células de levadura que se agregará al mosto. En caso de utilizar levadura seca, es conveniente seguir las instrucciones del fabricante ya que no es fácil determinar la cantidad de levadura en un paquete porque depende de las condiciones de elaboración, la conservación y manipulación, entre otros factores. En general, los fabricantes de levaduras comerciales indican un sobre de 11 gramos de levadura seca por cada 20 litros de mosto, unos 0,55 gramos por litro. Sin embargo, generalmente se utiliza una mayor proporción entre 0,8 y 1 gramo de levadura seca para mostos de densidades normales (1040 - 1060 kg/m³). La recomendación de los fabricantes es inocular una menor proporción de levaduras, estos no consideran el control de temperaturas por parte de los cerveceros caseros. Una tasa de inoculación de 1 g/L a temperaturas más altas de las recomendadas, puede provocar una fermentación explosiva de sólo un par de días. Este tipo de fermentaciones, trae aparejado además de tener que limpiar varias veces el *airlock* y el exterior del fermentador, una excesiva producción de ésteres y otros compuestos que afectan negativamente la calidad de la cerveza. Entonces, si bien no es lo ideal, los fabricantes de levadura proponen contrarrestar los efectos de las altas temperaturas con una menor tasa de inoculación.

Uno de los principales parámetros para determinar la calidad de la cerveza es la consistencia, o sea, que lote a lote se obtenga la misma cerveza sin desviaciones en las características organolépticas. La tasa de inoculación es uno de los factores que puede ser determinante, ya que si la tasa de inoculación varía entre lotes el sabor puede cambiar significativamente.

El agregado de menor o mayor cantidad de levadura que la óptima, subinoculación y sobreinoculación respectivamente, pueden afectar las características de la cerveza, fermentacio-

nes con altos niveles de diacetilo, acetaldehído y baja atenuación. La subinoculación provoca una menor velocidad de fermentación por lo tanto una fase de latencia más larga y como consecuencia mayor riesgo de contaminación, ya que las bacterias y levaduras ambientales tendrían más tiempo y oportunidad para desarrollarse y en consecuencia el sabor de la cerveza puede verse afectado. La sobreinoculación produce niveles bajos de ésteres y afecta la salud de la levadura a lo largo de las reutilizaciones, la propagación es menor y por lo tanto, disminuye la proporción de células jóvenes. Si bien ambos casos son perjudiciales, la sobreinoculación afecta en menor medida el sabor y tiene menos riesgos asociados a la contaminación. No obstante los lotes sobreinoculados tendrán células menos saludables y con menor viabilidad, lo que dificultará la reutilización de levaduras. Este efecto se acentúa a través de sucesivas reutilizaciones con sobreinoculación ya que se produce un espiral descendente de la viabilidad.

El control de calidad de las levaduras, mediante microscopio óptico y Cámara de Neubauer (Figura 4.4), permite conocer la cantidad de levadura en un cultivo líquido o del fondo del cono del fermentador e incluso determinar su viabilidad. De esta manera el proceso de reutilización de levaduras, usual en microcervecerías, se realizará de manera eficiente y permitirá mantener la calidad del producto a lo largo del tiempo y de manera homogénea.



Figura 4.4: Cámara de Neubauer.

Algunos autores como White y Zainasheff (2010) sugieren que la tasa de inoculación es de 1.000.000 de células por mililitro de mosto por grado plato (°P):

$$\text{Número de células a inocular} = (1 \text{ millón}) * (\text{mL de mosto}) * (\text{grados plato del mosto})$$

Este valor no es una regla, sino más bien una pauta a modo de referencia rápida y simple. En general se utilizan tasas más bajas para las cervezas Ale (750.000 células por mililitro de mosto por grado plato) y tasas más altas para las Lager (1.500.000 células por mililitro de mosto por grado plato) (Ver anexo 2 y 3). Las tasas sugeridas son para reutilizaciones de levadura cosechada, si se utiliza levadura fresca desde un laboratorio especializado en condiciones ideales de aireación y buena nutrición, la tasa de inoculación puede ser 50% menor. Sin embargo, la experiencia del cervecero determinará la tasa ideal de inoculación para cada cepa de levadura y estilo de cerveza.

Las cervezas de trigo alemanas son un ejemplo de tasas de inoculación no convencionales. Estos estilos de cervezas requieren una mayor producción de ésteres y fenoles, donde la tasa ideal es un poco más baja, alrededor de 0,5 a 0,7 millones de células de levadura por mililitro de mosto y grado plato.

“En general se utilizan tasas de inoculación más bajas para cervezas Ale (750.000 células por mililitro de mosto por grado plato) y tasas más altas para Lager (1.500.000 células por mililitro de mosto por grado plato)”

A continuación, se describirá un ejemplo que permitirá comprender mejor como lograr la tasa de inoculación: si se desea obtener la tasa de inoculación para unos 100 litros de mosto de cerveza Ale de 11 °P de densidad (1045 kg/m³). Se utilizará el valor correspondiente al tipo de cerveza Ale (tasa de inoculación de 0,75 millones de células de levadura por mililitro de mosto por grado plato).

Entonces, considerando que 100 L son 100 000 mL:

$$\text{Número de células de levadura a inocular} = 0,75 \cdot 10^6 \text{ células} \cdot 100\,000 \text{ mL} \cdot 11^\circ\text{P}$$

$$\text{Número de células de levadura a inocular} = 825\,000\,000\,000 = 8,25 \cdot 10^{11}$$

El siguiente paso es determinar la concentración de células de levadura (cantidad de células por mililitro de crema de levaduras) mediante la tinción de azul de metileno y observación microscópica (Ver ítem 7.4.6). La crema de levaduras puede contener entre 1 a 4 mil millones de células de levadura por mililitro, estos valores son muy variables ya que dependen de cómo fue recolectado, el momento de cosecha y el tipo de levadura. Por ejemplo: si el recuento de **levaduras viables** de la biomasa recolectada del fondo de un cono del fermentador es de unas 2 mil millones de células por mililitro, sólo resta calcular la cantidad de levadura apropiada para inocular:

entonces:

$$2 \text{ mil millones de células} = 2\,000\,000\,000 \text{ células} = 2 \cdot 10^9 \text{ células por mL de crema}$$

por lo tanto:

$$\text{mL de crema a inocular} = \frac{(\text{N}^\circ \text{ de células totales a inocular})}{(\text{N}^\circ \text{ de células por mL de crema})}$$

$$\text{mL de crema a inocular} = \frac{8,25 \cdot 10^{11} \text{ de células a inocular}}{2 \cdot 10^9 \text{ células por mL de crema}}$$

$$\text{mL de crema a inocular} = 412,5 \text{ mL}$$

En este ejemplo, se aprecia que es muy poca la cantidad de biomasa de levadura (crema) necesaria para inocular 100 litros de mosto de 1044 kg/m³, en este caso en particular se trata de levadura con alta viabilidad y la crema cosechada posee una gran cantidad de células. Se

recomienda a aquellos cerveceros caseros sin acceso a un microscopio, inocular entre 0,8 a 1 kilo de crema en 100 litros de mosto de una densidad normal. Seguramente, en la mayoría de las ocasiones se estará sobreinoculando y en otras subinoculando. Si bien es una referencia y en algunos casos puede ser útil, hay que ser muy cautos en la reutilización de levadura “a ciegas”.

En cervecerías que poseen fermentadores grandes, donde se requieren varias cocciones para su llenado, existe una regla general en cuanto a la cantidad de levadura a inocular:

1) Si el llenado del tanque ocurre en un mismo día, se debe agregar la cantidad de levadura necesaria para el tanque lleno luego de la primera cocción. En este caso se recomienda contar con un enfriador de mosto adecuado para que no se eleve la temperatura con el agregado de mosto de la segunda cocción, y la levadura no sufra estrés térmico.

2) Cuando el llenado se extiende durante dos días, se debe determinar la cantidad de levadura en función de los litros de mosto agregado durante el primer día de elaboración. El mosto y el oxígeno que se agregan durante el primer día permiten que la levadura se propague y duplique su cantidad en sólo 24 horas. Es importante considerar que el ingreso de mosto del segundo día, retrasará aproximadamente en un día la etapa de fermentación. Se deberá prolongar un día el tiempo que se mantiene la temperatura inicial de fermentación, por ejemplo para un fermentador que es llenado totalmente el primer día, la curva de temperatura de fermentación podría ser: primer día 18° C, segundo día 19° C, y el tercer día se libera la temperatura a un máximo de 24 °C hasta terminar el “descanso de diacetilo”. En el caso de un fermentador que es llenado en dos días consecutivos la curva de temperatura podría ser: el primer día 18 °C, el segundo día 18 °C, el tercer día 19 °C, cuarto día se libera la temperatura hasta un máximo de 24 °C hasta terminar el “descanso de diacetilo”.

“Se recomienda a aquellos cerveceros caseros sin acceso a un microscopio, inocular entre 0,8 a 1 kilo de crema en 100 litros de mosto de una densidad normal.”



LABORATORIO MICROBIOLÓGICO EN CERVECERÍAS

LABORATORIO PARA CERVECERÍAS

NORMAS DE TRABAJO EN LABORATORIOS

ELEMENTOS Y MATERIALES MÁS FRECUENTES
DE UN LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

MANEJO DE MICROORGANISMOS EN EL
LABORATORIO

ESTERILIZACIÓN

MEDIOS DE CULTIVO

DESCRIPCIÓN DE COLONIAS EN CAJA

TÉCNICAS BÁSICAS DE MICROBIOLOGÍA

CAPÍTULO 5: LABORATORIO MICROBIOLÓGICO EN CERVECERÍAS

Gallace, María Eugenia y Dalmasso, Lucas Pablo

La microbiología cervecera es la rama de la microbiología de los alimentos, que se encarga del análisis de la composición microbiana de cervezas y mostos, mediante técnicas que permiten la detección de diferentes agentes microbianos, e incluye las técnicas de recuento y viabilidad de levaduras para su posterior reutilización.

Esta disciplina asume el análisis de aspectos positivos que tienen los microorganismos sobre las cervezas, como la producción de aromas y sabores, particularmente de las levaduras y en casos excepcionales algunos géneros de bacterias. También analiza los aspectos negativos que tienen los microbios sobre las cervezas, como la alteración de sus características sensoriales.

Los microorganismos se encuentran en todos los hábitats, en el cuerpo humano, los alimentos, el suelo, las plantas, el aire y en toda superficie a nuestro alrededor, es decir las cervezas no son estériles. Aquellos microorganismos que poseen los alimentos de manera natural, se los conoce como flora normal. La flora de un alimento se puede clasificar de acuerdo al tipo de microorganismo que contenga, en algunos casos pueden ser beneficiosos, como la flora microbiana de la cerveza que en su composición normal son levaduras. En otros casos perjudiciales, como podría ser la flora alterada de cervezas descompuestas por bacterias productoras de ácido acético.

En este capítulo del manual se abordan las funciones de un laboratorio en las cervecerías, las normas de seguridad y los principios básicos del manejo de microorganismos en el laboratorio.

5.1 LABORATORIO PARA CERVECERÍAS

Una microcervecería debe contar, indefectiblemente, con un laboratorio para lograr estabilidad en la calidad de los productos elaborados. La inversión en equipamiento de laboratorio dependerá en gran medida del volumen de producción de la cervecería; sin embargo, no es necesario un gran espacio físico, puede ser desde un lugar pequeño en el cual se realizan determinaciones sencillas, hasta un laboratorio totalmente equipado para determinaciones más complejas.

Un laboratorio de microbiología cervecera es un lugar convenientemente adecuado donde se pueden manejar y examinar microorganismos, que puede constar de un lugar seguro para almacenar medios y reactivos, una mesada de trabajo con mechero de bunsen y bacha para la limpieza de material, un área de esterilización, una zona de incubación y una mesa para apoyar el microscopio y realizar las observaciones. Es recomendable contar con al menos dos ambientes, y reservar uno para la manipulación de microorganismos exclusivamente.

La importancia de tener un laboratorio propio en un microcervecería radica en tres funciones principales: **1)** permite determinar la calidad microbiológica en crema de levaduras, cervezas en producción y terminadas, para establecer las posibles fuentes de contaminación; **2)** hace posible la reutilización de levaduras a través de los análisis microscópicos y la determinación de la concentración de células de levadura y su viabilidad; y **3)** establece la calidad físico-química mediante análisis de materias primas, productos en proceso y terminados. Para este último punto, es necesario contar con equipamiento de laboratorio costoso que solo son accesibles a centros de investigación, malterías, cervecerías industriales y algunas cervecerías artesanales con alto volumen de producción. Algunas de las técnicas de calidad físico-químicas son extracto potencial de maltas, concentración de alfa y beta ácidos en lúpulos, color, amargor y concentración de etanol en cervezas, que no serán abordadas ya que exceden los objetivos de este manual.

Cada empresa debe esforzarse por realizar al menos algunas determinaciones básicas *in situ* que les permitan obtener información rápida y tomar decisiones críticas sobre la calidad de la cerveza. Algunos análisis son económicos y fáciles de realizar y proporcionan información importante, tanto de la elaboración del mosto como de la calidad de la fermentación.

La capacitación del personal es fundamental tanto en técnicas de laboratorio como en el análisis sensorial de las cervezas. Algunos autores proponen un programa de degustación regular que consiste en probar todos los fermentadores con cerveza, a la misma hora (todos los días laborables) y registrar la evolución de la fermentación o detalles del proceso como así también la determinación de pH y densidad, de esta manera se pueden tomar medidas correctivas y anticiparse a los problemas (White y Zainasheff, 2010).

Es fundamental brindar al mercado un producto de calidad, estable y seguro para los consumidores, en esta instancia los controles bromatológicos, tanto municipales como provinciales y nacionales, no son suficientes. El control de calidad de cada lote es una forma de evitar que cervezas en mal estado lleguen al mercado y evitar así que los consumidores tengan una mala experiencia y en consecuencia una imagen negativa de la cervecería. Esto no solo afectaría a la cervecería, sino al sector cervecero en general. Garantizar productos de buena calidad es responsabilidad de cada uno de los actores que intervienen en la cadena productiva (proveedores de insumos, productores, distribuidores, dueños de bares, centros de recarga, otros puntos de venta y el estado) y será la única manera que el sector cervecero artesanal se mantenga y desarrolle.

“Garantizar productos de buena calidad es responsabilidad de cada uno de los actores que intervienen en la cadena productiva (proveedores de insumos, productores, distribuidores, dueños de bares, centros de recarga, otros puntos de venta y el estado) para lograr el crecimiento del sector cervecero artesanal.”

5.2 NORMAS DE TRABAJO EN LABORATORIOS

Los laboratorios en general exigen tener en cuenta una serie de detalles minuciosos ya que, las técnicas son delicadas y deben cumplirse a la perfección. Es imprescindible trabajar en un espacio ordenado, respetar las normas de higiene y ser precisos, ya que frecuentemente el trabajo requiere el uso de llamas abiertas y manipulación de productos químicos que pueden ser peligrosos.

Una estricta atención a la seguridad resultará en menores riesgos de accidentes y posibles lesiones. A continuación se detallan una serie de recomendaciones a considerar antes de comenzar a trabajar:

- Utilice únicamente productos químicos correctamente etiquetados y lea atentamente los rótulos o fichas de seguridad (FDS, en inglés MSDS) donde se detallan las características de los diferentes productos que se utilizan en laboratorio, su manejo, almacenamiento, medidas ante accidentes y sus efectos sobre la salud (Ver anexo 4).
- Mantenga copias de las FDS para todos los productos químicos que utilice e indique al personal donde encontrarlas en caso de accidente.
- Almacene soluciones o mezclas en recipientes adecuados de acuerdo al tipo de producto y asegúrese de etiquetar apropiadamente ese recipiente para evitar confusiones, además permite la segregación de materiales incompatibles. De igual manera si transfiere algún producto a un contenedor secundario.

- Siga las recomendaciones del fabricante para la dilución o mezcla productos químicos compatibles.
- Asegúrese de tener extintores de incendios apropiados de acuerdo a los productos que utiliza, e instruya al personal en el uso del mismo.
- Trabaje en una superficie sellada y resistente al fuego, sin armarios bajos u otros materiales inflamables en la parte superior. Los armarios de metal son recomendables para almacenar la mayoría de los líquidos inflamables, ya que pueden ser conectados a tierra para evitar chispas estáticas durante la transferencia de líquidos, y no son tan susceptibles a los efectos del fuego.
- Se debe minimizar la presencia de materiales inflamables como cortinas, manteles, mesas de madera, almohadillas absorbentes, toallas, contenedores de residuos, entre otros.

Es importante utilizar los elementos de protección personal y seguir protocolos para prevenir cualquier posible accidente:

- Antes de ingresar al laboratorio vístase con un guardapolvo para su protección y tenga a disposición guantes de nitrilo, son la mejor opción para trabajar con líquidos a base de agua y desinfectantes oxidantes.
- Cada trabajador deberá mantener las manos limpias y el cabello de recogido o recogido.
- No comer, no beber, ni fumar durante la realización del trabajo.
- Conozca previamente las tareas a realizar en el laboratorio. Tómese un tiempo para organizar los materiales y revisar las técnicas.
- Todo material descartable debe arrojararse en envases dispuestos para tal fin.
- Registrar las observaciones y actividades que realice con el mayor detalle posible.
- Todo material en estudio debe identificarse debidamente para que pueda ser fácilmente reconocido.
- A pesar que no se trabaje con patógenos, todo el material biológico se debe considerar como peligroso y manipulado con cuidado.
- Trabajar de manera segura permitirá reconocer y anticipar peligros, y tener un plan de acción en caso de que las cosas se salgan de control.
- Ante la ocurrencia de un accidente personal con los materiales de trabajo (cortaduras, quemaduras o derramamiento de cultivos), así como exposición a sustancias químicas deberá informar de inmediato a la persona responsable del lugar y consultar a un médico.
- Antes de retirarse del laboratorio, controle que los mecheros, autoclaves, estufas de esterilización estén apagados. También las lámparas de luz artificial y las canillas de agua para evitar accidentes y contratiempos.
- Aquellos materiales de plástico descartable y el vidrio que haya estado en contacto con material biológico deben ser tratados con solución desinfectante de hipoclorito de sodio (lavandina) antes de ser arrojados, o disponerlos para su lavado y esterilización.

5.3 ELEMENTOS Y MATERIALES MÁS FRECUENTES DE UN LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA



Figura 5.1: Mechero Bunsen.



Figura 5.2: Estufa de incubación. Es una cámara de temperatura controlada para cultivo de microorganismos. Se utiliza para facilitar el desarrollo de los microorganismos a su temperatura óptima de crecimiento.



Figura 5.3: Autoclave eléctrico automatizado.



Figura 5.4: Cabina de flujo laminar.



Figura 5.5: Contador de colonias. Es un aparato que mediante la iluminación de la placa de Petri y una lupa, nos permite observar con mayor nitidez las colonias y por tanto facilita su recuento.



Figura 5.6: Balanza.



Figura 5.7: Baño termostático, contiene agua y un sistema de regulación de la temperatura. Se utilizan para atemperar medios de cultivo o incluso para incubar cultivos de microorganismos.



Figura 5.8: Agitador orbital.



Figura 5.9: Vortex, sirve para agitar pequeños tubos o frascos de líquido.



Figura 5.10: Oxímetro de membrana, mide concentración de oxígeno en medios líquidos.



Figura 5.11: Microscopio óptico.



Figura 5.12: Jarra de anaerobiosis, se usa para conseguir una atmósfera libre de oxígeno para el cultivo de microorganismos anaerobios.

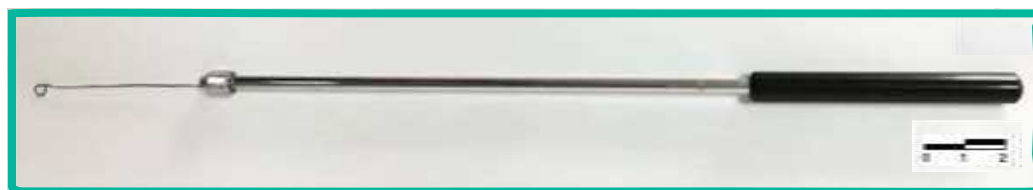


Figura 5.13: Ansa en anillo o de siembra.



Figura 5.14: Placas de Petri plásticas y estériles.



Figura 5.15: Placa de Petri con medio sólido.



Figura 5.16: Micropipeta automática con punta autoclavable, se utiliza para fraccionar pequeñas cantidades de líquidos. Las puntas (tips) son descartables y de distinto tamaño y color según el modelo de micropipeta.



Figura 5.17: Asa acodada o espátula de Digralsky, se utiliza para la extensión de microorganismos sobre la superficie de un medio de cultivo sólido en placa Petri.



Figura 5.18: Vasos de precipitados.



Figura 5.19: Cucharas y espátulas de laboratorio, se utilizan para fraccionar muestras o medios de cultivo.

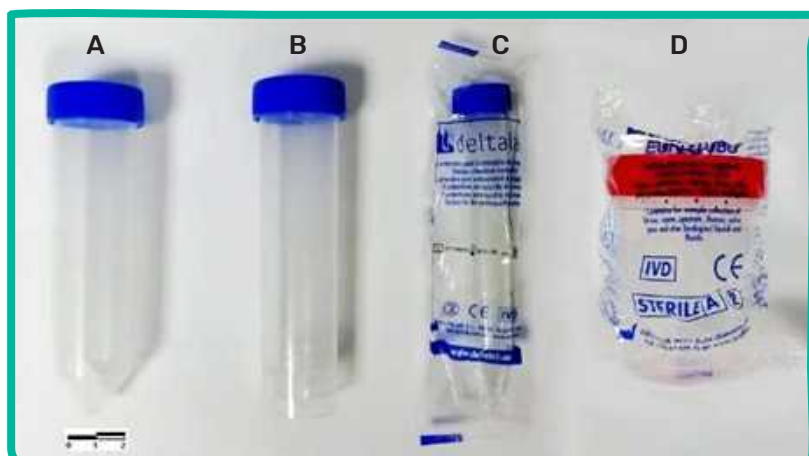


Figura 5.20: Recipientes estériles. A) Tubo cónico tipo Falcon™ de 50 mL de capacidad. B) Tubo cónico tipo Falcon™ de 50 mL de capacidad con faldón. C) Tubo cónico tipo Falcon™ estéril de 15 mL de capacidad. D) Recipiente estéril de 125 mL de capacidad.



Figura 5.21: Porta y cubre objetos, para observaciones al microscopio.



Figura 5.22: Pinza de madera, permite sostener portaobjetos para secar y fijar muestras con un mechero Bunsen.



Figura 5.23: Cámara de Neubauer para recuento de células.



Figura 5.24: Frascos de tapa azul de diversos volúmenes. Se utilizan para esterilización de soluciones y medios de cultivos al resistir el proceso de esterilización en autoclave.

5.4 MANEJO DE MICROORGANISMOS EN EL LABORATORIO

La destreza para una adecuada manipulación de microorganismos se denomina “técnica estéril o aséptica” y requiere atender ciertos recaudos para minimizar la posibilidad de obtener errores, falsos positivos y contaminación. Las siguientes reglas generales de trabajo son ejemplos de técnica estéril:

- Desinfectar el área de trabajo con alcohol al 70% antes y después de trabajar.
- Lavarse las manos con agua y jabón y desinfectar con alcohol 70% de manera recurrente.
- Esterilizar todos los medios de cultivo y materiales que estén en contacto con muestras o cultivos microbianos.
- Disponer el instrumental a utilizar a la mano para reducir los tiempos que un recipiente o elemento estéril esté expuesto al ambiente.
- Trabajar cerca de la llama del mechero en forma constante, la corriente ascendente de la llama crea a su alrededor una atmósfera estéril y esto reduce la posibilidad de contaminación de microorganismos del ambiente.
- Mantener en posición inclinada los recipientes que estén abiertos. Esto reducirá el área expuesta a la caída de partículas.
- Para abrir un recipiente las tapas o tapones deberán ser sostenidos por el técnico de laboratorio durante toda la manipulación, no apoyarlos sobre la mesada.
- Para realizar transferencias, trasvases o estrías, se deben destapar Erlenmeyers y tubos de ensayo y flamear las bocas de estos recipientes de vidrio, luego realizar la tarea y flamear nuevamente antes de volver a taparlos.
- Esterilizar en llama abierta el anillo (debe tomar color rojo vivo) antes y después de realizar un repique, estriado o siembra. Después de utilizarla, y antes de apoyar el anillo en la mesada, debe estar estéril, en caso de duda reiterar la esterilización por fuego directo.
- Esterilizar la espátula de Digrasky, antes y después de sembrar una placa de Petri, según el siguiente método: sumergir el extremo de la espátula en alcohol, escurrir y encender con la llama del mechero Bunsen. Retirar inmediatamente la espátula del fuego directo del mechero y esperar hasta que se apague y enfríe. Procurar apoyar en la mesada de trabajo espátulas de Digrasky siempre esterilizadas. Mantener el recipiente alejado de la llama del mechero.
- **IMPORTANTE:** En caso que se encienda el recipiente con alcohol, mantener la calma, tapar el mismo para que se consuma todo el oxígeno y el fuego se apague.

5.5 ESTERILIZACIÓN

La esterilización es el proceso a través del cual se eliminan todos los microorganismos incluidas las esporas microbianas de cualquier objeto, superficie o medio, por remoción o muerte de estos. Se puede realizar mediante la exposición del material a diferentes agentes letales, físicos, químicos o a través de separación mecánica por filtración de los organismos. La elección adecuada del método de esterilización depende, fundamentalmente, de la naturaleza de los materiales a esterilizar y de la conveniencia (Figura 5.25). En cambio, para la desinfección se emplean distintos agentes químicos que solo disminuyen el riesgo de contaminación, sin garantizar la esterilidad, pero eliminan microorganismos patógenos.

En resumen, la elección del procedimiento y del agente apropiado está determinada por la situación específica, es decir si la eliminación es total o es necesario destruir sólo ciertas especies. En un laboratorio de microbiología cervecera es indispensable la eliminación com-

pleta de todos los organismos presentes sobre cualquier material o en su interior, como así también los medios de cultivo y el material de vidrio para el cultivo de microorganismos.

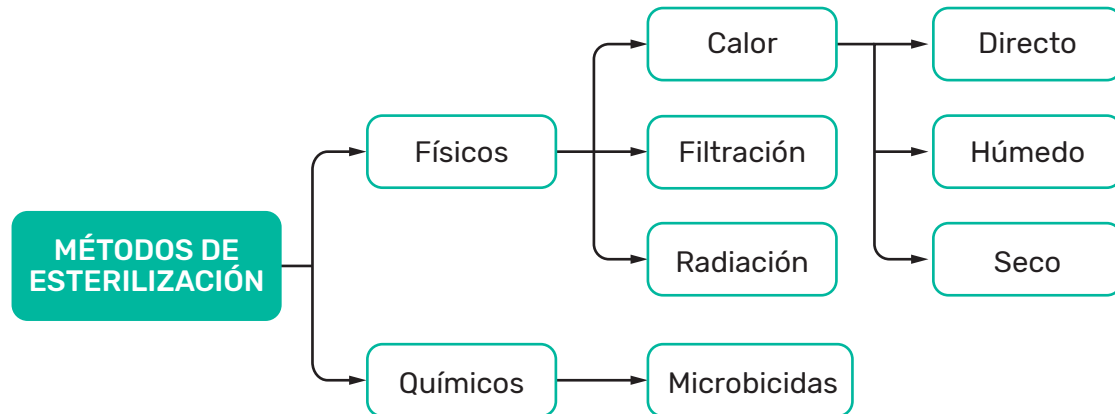


Figura 5.25: Clasificación de los métodos de esterilización.

5.5.1 Métodos físicos

5.5.1.1 Calor Directo (Flameado)

Este método es usado para esterilizar de manera superficial cualquier material de laboratorio, agujas, ansas, espátulas, varillas de vidrio, exterior de las pipetas de vidrio, cuello de los balones y tubos de ensayos. Consiste en someter a la acción directa de la llama de un mechero Bunsen los utensilios a esterilizar, sólo en el caso del material metálico se lleva al rojo vivo.

5.5.1.2 Calor Húmedo

Existen dos métodos de esterilización por calor húmedo, la esterilización por vapor saturado a presión (autoclave) y la tindalización. Si bien el agente de esterilización es el mismo, tiene variaciones en cuanto a los procedimientos.

El vapor saturado a presión es el método más utilizado en Microbiología, es rápido y seguro para esterilizar medios de cultivo, agua, soluciones, frascos, tubos de ensayo y cultivos de bacterias y levaduras que se desechan. El vapor de agua se difunde por ósmosis a través de las membranas de las formas vegetativas y esporuladas, coagulando su protoplasma, fenómeno que se acentúa si este vapor es saturado y a presión.

El dispositivo requerido es el autoclave, aparato que permite sobreelevar la presión, lo que equivale a una temperatura de ebullición del agua por encima de los 100 °C. En la Figura 5.26 se expone un ciclo típico de esterilización con autoclave automático.

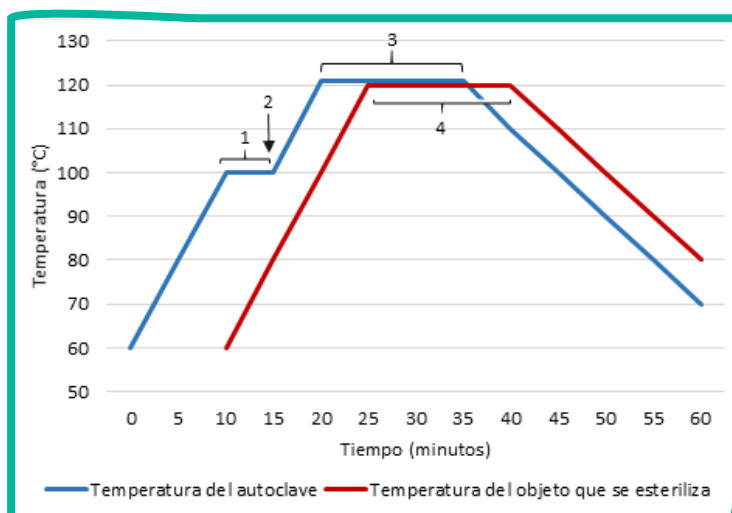


Figura 5.26: Ciclo típico de esterilización con autoclave. Línea negra: temperatura del autoclave. Línea roja: temperatura del objeto que se esteriliza. 1: Inicio de la generación de vapor. 2: Cierre de válvula de salida de vapor (espita) e inicio del aumento de la presión de vapor. 3: Tiempo de esterilización programado en el autoclave. 4: Tiempo de esterilización del objeto.

El tiempo de esterilización depende de la presión alcanzada y de la temperatura. En la tabla 5.1 se exponen presiones y tiempos recomendados, a mayor presión (mayor temperatura) se requiere menor tiempo de esterilización.

Tabla 5.1: Presiones y tiempos recomendados para ciclos de esterilización de material de laboratorio.

Relación entre presión, temperatura y tiempo			
Presión (ATM)	Presión (Kg/cm ²)	Temperatura (°C)	Tiempo (min.)
1	1	120	15
$\frac{3}{4}$	0,7	114	20

El modelo de autoclave Chamberland se encuentra entre los más usados (Figura 5.27), está constituido por un recipiente de cobre con una fuente calórica externa en la parte inferior. En el interior posee una rejilla sobre la cual se coloca el material a esterilizar. En la parte superior tiene una tapa de bronce con un manómetro, una válvula de seguridad y una llave de purga. La tapa se cierra herméticamente debido a una junta especial y a un mecanismo de ajuste de tornillos con tuercas mariposa.

Las capacidades y fuentes de calor de los autoclaves son variables, desde un pequeño autoclave eléctrico de pocos litros de capacidad a grandes autoclaves con mecheros a gas de 200 litros o más de capacidad. En las cervecerías, se podría reemplazar este dispositivo por una olla a presión hogareña. Si bien, las ollas tienen poca capacidad y no regulan estrictamente la presión y la temperatura, se podrían obtener resultados similares al de un autoclave.



Figura 5.27: Autoclave modelo Chamberland.

El funcionamiento del autoclave “Chamberland” es el siguiente: se introduce agua hasta llegar casi a la rejilla inferior, se coloca el material a esterilizar convenientemente acondicionado cerrándose la tapa y ajustándose los tornillos en cruz (debe estar abierta la llave de purga). Se calienta hasta salida continua de vapor. Esto indica que todo el aire interior ha sido eliminado (se ha purgado). Para tener mayor seguridad se puede hacer burbujear en agua la salida de vapor, constatándose por la ausencia de burbujas la inexistencia de aire en el interior. Este detalle tiene mucha importancia puesto que las indicaciones manométricas son ciertas y expresan la temperatura interna solamente si se ha excluido el aire (en el interior sólo hay vapor saturado). Luego se cierra llave de purga y se continúa calentando hasta que el manómetro indique la presión adecuada, momento en el cual se empieza a contabilizar el tiempo de esterilización, regulando la llama del mechero para que la presión se mantenga constante. Cumplido el tiempo se corta el calentamiento y se deja descender la presión hasta que el manómetro marque cero, luego se abre la llave de purga muy lentamente dejando

entrar el aire (esto sucede porque el interior se encuentra a presión negativa respecto a la atmosférica). Se abre el autoclave, se retira con precaución el material húmedo, y se lo coloca a temperatura ambiente para secarlo.

El proceso de tindalización también se efectúa con autoclave, pero con la llave de purga abierta (sin sobrepresión). Se utiliza para medios de cultivo que pueden alterarse por exposición a temperaturas más elevadas (medios con carbohidratos fácilmente hidrolizables o gelatina). Estos medios se calientan a 100 °C por 30 minutos al día durante tres días consecutivos. En el primer hervor se eliminan las células vegetativas, cualquier espora que sobreviva germinará en los intervalos dando formas vegetativas que serán destruidas durante los calentamientos posteriores. Este método también puede efectuarse colocando el material a esterilizar en una olla con tapa y algo de agua en la base de la misma.

5.5.1.3 Calor Seco

El empleo de calor seco como medio de esterilización es de gran difusión por su sencillez. Como el calor seco se transfiere más lentamente que el calor húmedo, los tiempos y temperaturas de esterilización son mayores (160-170 °C durante 60 minutos). El horno de esterilización tiene una doble pared dentro de la cual circula el aire caliente lo que asegura un calentamiento uniforme, además posee una regulación del flujo de aire y un termómetro que indica la temperatura interior. Este procedimiento se utiliza para esterilizar material de vidrio o metálico previamente acondicionado envuelto en papel o cajas metálicas (cajas de Petri de vidrio, pipetas de vidrio, pinzas metálicas). **IMPORTANTE:** este método no es apto para líquidos ni medios de cultivo.

5.5.1.4 Filtración

Los filtros pueden ser de porcelana, yeso, vidrio incrustado, siendo los más comunes los de membrana. Los filtros se ubican en un portafiltros y la filtración se realiza por succión y succión más presión. Las bacterias son eliminadas de las soluciones debido al “efecto colador” por el tamaño de los poros. Se emplea para aquellas sustancias que son alteradas por el calor en sus estructuras y características físico-químicas, sueros, soluciones de enzimas o toxinas bacterianas.

Las cabinas de flujo laminar utilizan un ventilador para forzar el paso de aire a través de un filtro especial para brindar aire estéril a una mesada de trabajo. Estos filtros de aire se denominan HEPA (High Efficiency Particulate Air) y están compuestos por pliegues de acetato de celulosa que retienen las partículas (incluidos los microorganismos) que contiene el aire que sale de la campana del flujo laminar. Este equipo brinda láminas de aire estéril sobre la mesada de trabajo para poder manipular microorganismos y reducir así el riesgo de contaminación (Figura 5.4).

5.5.1.5 Radiación

En el espectro de luz, la región ultravioleta (UV) entre 2400 a 3000 Å, es la que tiene mayor acción antimicrobiana. El material genético (ADN) tiene un pico de absorción a los 2650 Å e interfiere en la correcta replicación y función del ADN, como consecuencia la célula bacteriana pierde la capacidad de reproducirse.

Este método es empleado para desinfección de aire o superficies debido a que las radiaciones UV no tienen poder de penetración. Para emplear este método se utilizan lámparas germicidas (Figura 5.28). **IMPORTANTE:** la exposición a la radiación UV también es peligrosa para los humanos, por eso se deben tomar medidas de seguridad.



Figura 5.28: Cabina de flujo laminar con lámpara de radiación UV.

Las radiaciones ionizantes incluyen rayos de longitud de onda corta (rayos X, rayos cósmicos y rayos gamma). En contraste con la radiación UV, las radiaciones ionizantes penetran fácilmente a través del vidrio y otros materiales, pero por ser más peligrosas y menos accesibles tienen un uso restringido como agente esterilizante.

5.5.2 Métodos químicos

El término compuesto antimicrobiano es usado para designar a cualquier sustancia capaz de destruir o inhibir el desarrollo de microorganismos. Las sustancias antimicrobianas pueden clasificarse en:

- **Germicidas:** sustancias que provocan la destrucción de las células vegetativas y esporas de los microorganismos. Los germicidas específicos para bacterias u hongos se los designa bactericidas o fungicidas respectivamente. El hipoclorito de sodio (lavandina) y el ácido peracético son germicidas muy potentes, sin embargo en superficies en contacto con alimentos se usa ácido peracético ya que no es tóxico y no impregna olores desagradables. El alcohol al 70% también es germicida pero no elimina esporas.
- **Germistáticos:** son sustancias que impiden el desarrollo de microorganismos, si bien muchos mueren, algunos quedan en estado latente con la capacidad de multiplicarse nuevamente cuando la acción del agente disminuye. Los productos germistáticos específicos para bacterias u hongos se los llama bacteriostáticos y fungistáticos respectivamente. Los germicidas pueden actuar como germistáticos cuando no se utilizan a la concentración adecuada y el tiempo de contacto es insuficiente.
- **Antibióticos:** son sustancias de acción germicida o germistática producida por ciertos microorganismos, o bien sintetizados en laboratorios especializados (cicloheximida, cloranfenicol, penicilinas).

5.5.2.1 Mecanismos de acción de las sustancias antimicrobianas

Las células microbianas pueden ser inactivadas o desorganizadas de maneras muy diferentes. Por un lado, los mecanismos de acción antimicrobiana pueden destruir o alterar de estructuras celulares, como la pared celular, alterar la permeabilidad selectiva de la membrana celular, precipitar proteínas y alterar ácidos nucleicos. Además pueden inactivar reacciones enzimáticas, por ejemplo aquellas que inhiben la síntesis de la pared celular, ADN y ARN.

Factores que influyen sobre la acción de compuestos antimicrobianos:

- **Tiempo:** una sustancia antimicrobiana debe estar en contacto con el material a desinfectar por un período de tiempo adecuado. La muerte de los microorganismos es un fenómeno gradual, la mayoría muere rápidamente y otros tienen mayor resistencia.
- **Concentración:** los agentes químicos no tienen efecto mientras su concentración no llega a un determinado valor. Aumentándola gradualmente se observa primero un efecto germistático y luego germicida.
- **Temperatura:** la eficiencia en general aumenta con la temperatura.
- **Humedad:** la presencia de agua facilita la penetración del antimicrobiano a la célula.
- **Naturaleza del medio:** la presencia de materia orgánica en el medio disminuye la acción de los antimicrobianos porque actúa protegiendo al microorganismo.
- **Naturaleza del microorganismo:** los microorganismos que tienen alguna forma de resistencia (bacterias que tienen cápsulas) son menos afectados por los antimicrobianos.

Los compuestos antimicrobianos empleados regularmente en laboratorios de microbiología son alcoholes y sustancias oxidantes. El alcohol más utilizado es el etanol, que diluido al 70% aumenta su poder de penetración a la célula y por consiguiente, aumenta su eficacia.

Las sustancias oxidantes como el ácido peroxiacético (ácido peracético) se emplea para desinfecciones de superficies en general (fermentadores, barriles, líneas de llenado). El ácido peracético se considera inestable, particularmente diluido, ya que las diluciones se hidrolizan con el tiempo y pierden actividad; los productos de su degradación son ácido acético, oxígeno y agua. Además, su acción disminuye drásticamente en presencia de materia orgánica.

5.6 MEDIOS DE CULTIVO

Un medio de cultivo es un conjunto de sustancias (nutrientes) que permite el crecimiento y desarrollo de los microorganismos, estos pueden presentarse en estado líquido o sólido. El tipo de microorganismo que desarrolla depende del medio de cultivo y de las condiciones de incubación a la cual se exponen (temperatura, aireación e iluminación). Existen diferentes medios de cultivo que son utilizados en laboratorios según los objetivos de trabajo que plante el investigador.

Los componentes de los medios de cultivo están desarrollados para satisfacer las necesidades nutricionales de los microorganismos y contienen:

- **Agua:** todos los medios de cultivo son de base acuosa.
- **Energía química:** a través del Carbono (C) que aporta a los microorganismos esqueletos carbonados que por catabolismo obtienen energía para su crecimiento y multiplicación. Las fuentes de carbono pueden ser orgánicas, como los hidratos de carbono (lactosa, sacarosa, maltosa, dextrosa, xilosa, manitol, almidón, etc.), aminoácidos (aa), ácidos orgánicos entre otras.
- **Nitrógeno (N):** en la naturaleza puede encontrarse en forma orgánica (aminoácidos, peptonas) e inorgánica (N_2 , NH_4^+ , NO_3^-).
- **Sales minerales:** son fuente de cationes y de aniones. Los microorganismos necesitan captar una serie de elementos químicos que según las cantidades requeridas se pueden clasificar en macroelementos (K, Na, S, P, Ca, Fe) y microelementos (Mn, Zn, Co, Cu, Ni).
- **Factores de crecimiento:** son aquellos elementos esenciales que algunos microorganismos requieren para su desarrollo, y que deben incorporar ya que estos no pueden sintetizarlos a partir de compuestos más simples. Por ejemplo: vitaminas (biotina, tiamina, niacina), coenzimas, aminoácidos (arginina, asparagina, cisteína).

Las sustancias orgánicas pueden ser de manera simultánea fuente de distintos nutrientes. Ejemplo 1: una peptona provee a los microorganismos energía, carbono y nitrógeno. Ejemplo 2: la glucosa que le proporciona energía y carbono.

Algunos medios de cultivo pueden contener indicadores de pH que permiten visualizar fácilmente si hay crecimiento o si lo acidifica o alcaliniza, como el indicador verde de bromocresol en el medio de cultivo WLN.

La solidificación de cualquier medio líquido se logra al adicionar agar-agar o gelatina, sin embargo es más eficiente el agar-agar ya que no pierde las propiedades (solidificación) a temperatura de incubación.

5.6.1 Clasificación de los medios de cultivo

Los medios de cultivo se pueden clasificar según su composición química en, Medios de Cultivo Definidos son aquellos compuestos por sustancias puras, lo que permite que sean reproductibles, y Medios de Cultivo Indefinidos o Complejos, aquellos que en su constitución intervienen sustancias de origen natural de composición química variable (extractos de carne, de levadura, entre otros).

Otra clasificación que se utiliza habitualmente es según su uso:

- **Generales (no selectivos):** por sus características desarrollan numerosos microorganismos, por ejemplo agar mosto.
- **Selectivos:** desarrolla determinado tipo de microorganismos, aun cuando estén presentes otros en el inóculo; por ejemplo el medio ABD para recuento de bacterias ácido lácticas.
- **Diferenciales:** aquellos que según el desarrollo (si existe o no crecimiento) el tipo de desarrollo (diferencias en la coloración o forma de las colonias) permite reconocer grupos o de microorganismos; por ejemplo el medio de cultivo WLN permite diferenciar colonias de levadura ambiental de colonias de levadura domesticadas.

5.6.2 Preparación de medios de cultivo

Existen medios de cultivo comerciales que contienen, todos los componentes de la fórmula en un solo envase, para lo cual solo se deben seguir las instrucciones de la etiqueta. En general no es necesario ajustar el pH, y en caso de ser un medio sólido tampoco se debe de agregar agar-agar. Otra opción es preparar los medios de cultivo a partir de mezclar cada constituyente siguiendo estrictamente el orden indicado en la fórmula y si es necesario, se puede calentar suavemente para una rápida disolución. Evitar temperaturas demasiado elevadas que puedan alterar los componentes o producir sustancias tóxicas.

Los medios de cultivo deben ajustarse al pH indicado en la fórmula, generalmente se realiza con soluciones de ácido clorhídrico (HCl) o hidróxido de sodio (NaOH). En los medios con agar-agar, el pH se puede corregir antes del agregado de agar, pues este no lo altera. En cambio en los medios con gelatina, por ser esta una proteína ácida, se debe realizar la corrección posterior al agregado de la misma.

5.7 DESCRIPCIÓN DE COLONIAS EN CAJA

Una colonia es una agrupación de bacterias o levaduras formada a partir de la reproducción de una Unidad Formadora de Colonia (UFC) sobre un medio sólido (Figura 5.29), aunque poseen tamaño variable son visibles a simple vista. Una UFC puede ser un microorganismo o un grupo de microorganismos de una misma especie que tienen tendencia a permanecer unidas (estafilococos o estreptococos). Las colonias bacterianas tienen determinado tamaño,

forma, consistencia y en algunos casos color característico, que puede variar de acuerdo al medio en que se encuentren, pero generalmente es constante bajo condiciones controladas y dependen de la especie bacteriana que las forme.

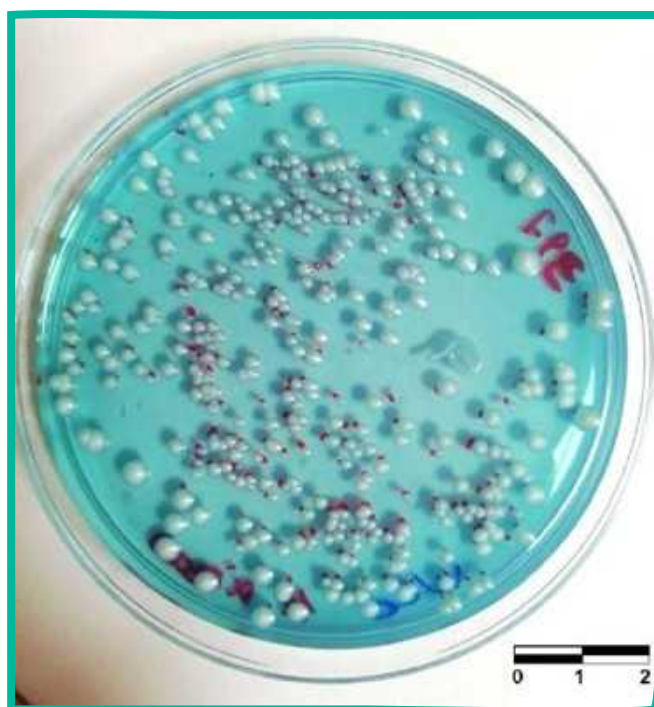


Figura 5.29: Caja de Petri con medio WLN y colonias típicas de levadura en la superficie.

Las características de las colonias ocurren en varias combinaciones y sirven para identificar bacterias en cultivos mezclados. La morfología colonial, aunque deriva de una célula individual, es característica de la masa celular, por ejemplo la pigmentación es aparente en la colonia, pero no en la célula individual. Otro atributo es la consistencia de la colonia, puede ser dura, mucosa (se pegan al ansa y forma filamentos o hilos mucosos cuando se trata de separarla del agar), seca (que puede moverse sobre el agar con el ansa) y cremosa como en las colonias de levadura de cerveza. En el caso de la consistencia mucosa de algunas colonias ésta deriva de la sustancia capsular en bacterias con cápsulas muy grandes.

El tamaño de las colonias es bastante constante para cada especie y puede ir desde colonias muy pequeñas hasta colonias de varios milímetros de diámetro. La forma está determinada por su borde y elevación (Figura 5.30). La superficie de la colonia puede ser uniformemente brillante y suave o puede ser estriada con muescas concéntricas o quebradas. Al examinar la colonia con luz transmitida (contador de colonias o cuando la caja se interpone entre el observador y una fuente de luz) puede aparecer con textura granular o amorfa. La velocidad de desarrollo de una colonia hace referencia al tiempo que tarda en hacerse visible la colonia y pueden ser de desarrollo lento (no perceptible a las 24 horas) o rápido (perceptible a las 24 horas).

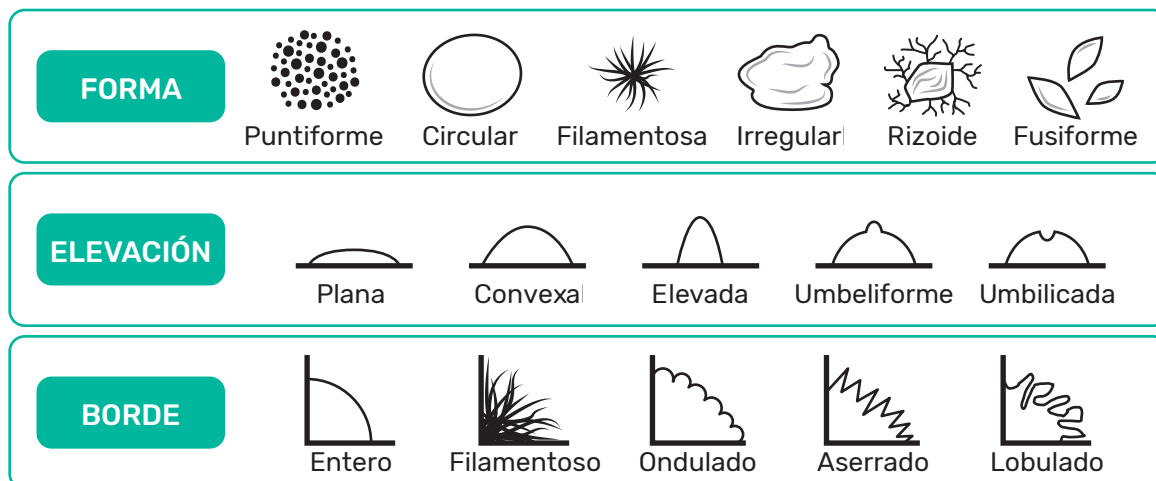


Figura 5.30: Descripción morfológica de las colonias según su elevación, borde y forma.

En resumen, las colonias deben describirse de acuerdo con la planilla bacteriológica (planilla donde se registran los resultados de los análisis microbiológicos) e incluye fecha de siembra y de recuento, tipo de muestra y dilución, UFC totales, número de colonias diferentes y UFC por cada tipo de colonia. Además, por cada tipo de colonia diferente se debe describir su velocidad de desarrollo, tamaño, forma, elevación, borde, pigmentación, superficie, textura y consistencia.

5.8 TÉCNICAS BÁSICAS DE MICROBIOLOGÍA

En este apartado se expondrán diferentes técnicas que se utilizan en muchas determinaciones microbiológicas. Para evitar confusiones se deben tener en claro algunas definiciones:

- **Inóculo:** Denominación que se da al material microbiano que se transfiere a un medio de cultivo.
- **Siembra:** acción de colocar un microorganismo en un medio nutritivo que permita su desarrollo y multiplicación.
- **Repique:** transferencia de una pequeña cantidad de cultivo microbiano a un medio nutritivo fresco.
- **Aislamiento:** separación de microorganismos para la obtención de cultivos puros.
- **Colonia:** masa microbiana visible a simple vista, que desarrolla como una unidad a partir de una sola célula, sobre un sustrato sólido.

5.8.1 Plaqueo de medios de cultivo

Esta técnica que consiste en verter un medio sólido (fundido y estéril) dentro de las cajas de Petri en un ambiente aséptico y obtener placas para ser sembradas.

Procedimiento:

1. Se esteriliza el medio de cultivo, cuando disminuya la temperatura entre 40 - 45 °C, se homogeniza y antes que se solidifique, se vierte el medio en placas apoyadas sobre la mesada de trabajo del flujo laminar. Cada placa de Petri lleva aproximadamente 18 mL de medio, se deben dejar las placas semi abiertas hasta que se enfríen y la condensación de vapor de agua desaparezca.
2. En caso de no poseer flujo laminar, verter el medio de cultivo en las placas de Petri cerca de la llama de un mechero Bunsen. Mantener las cajas cerradas por unos minutos hasta se solidifique el medio. Luego, dentro de una estufa de cultivo, abrir cuidadosamente

las cajas y posicionarlas de manera invertida para eliminar y evitar la condensación de vapor de agua.

3. Luego de unos minutos, cuando se elimine la condensación, tapar las cajas y conservarlas invertidas.

4. En caso de presencia de espuma en la superficie del medio en la placa, flamear con un mechero Bunsen para romper las burbujas.

5. Se pueden almacenar en heladera hasta por una semana.

5.8.2 Dilución en serie

Una dilución es la reducción de la concentración de una sustancia en una solución. En microbiología tiene un significado diferente pero en el mismo sentido ya que en general, no se trata de sustancias en solución sino de microorganismos en suspensión. Entonces en microbiología una dilución consiste en la disminución de la concentración microorganismos en un líquido (en general solución fisiológica o mosto que ayuda a separar células de levadura).

Una dilución en serie consiste en diluciones consecutivas partiendo de una suspensión madre (inicial). Por ejemplo, un 1 mL de cerveza previamente desgasificada se diluye en 9 mL de solución fisiológica, a partir de esto se obtiene una dilución 1:10 con un factor de dilución de 10. A partir de esta dilución se toma una alícuota de 1 mL y se diluye en 9 mL de solución fisiológica, se obtiene una dilución 1:100 con un factor de dilución de 100. De este modo se puede seguir diluyendo las suspensiones hasta llegar a la concentración deseada (Figura 5.31). Entre diluciones se debe homogenizar la muestra agitándolas manualmente o con la ayuda de un agitador de vórtice (Figura 5.9).

“Para preparar solución fisiológica diluir 9 g de Cloruro de Sodio (grado analítico, se adquiere en droguerías) en 1 litro de agua destilada.”

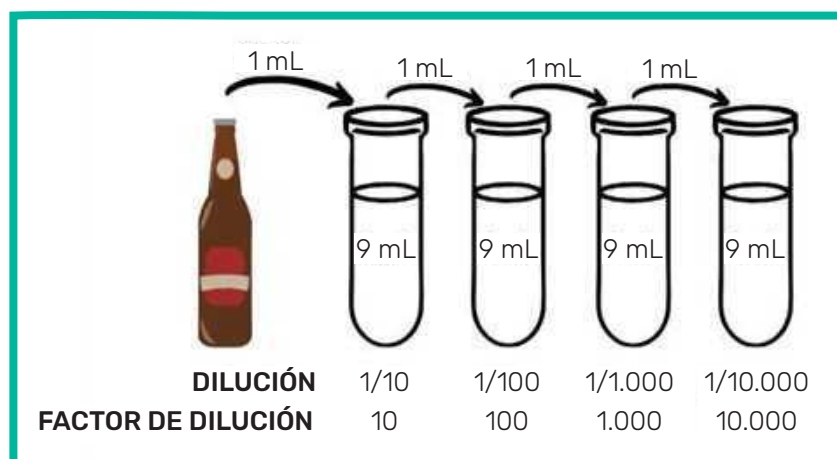


Figura 5.31: Dilución en serie.

Por ejemplo, un factor de dilución (FD) de 100 indica las veces que está diluida la suspensión madre. Si se siembra 0,1 mL una dilución 1:100 (factor de dilución 100) en una caja de Petri con un medio sólido para recuento de microorganismos y se obtiene como resultado 50 UFC (unidades formadoras de colonias) el resultado referido a 1 mL es:

$UFC/mL = \frac{UFC * FD}{VS}$ $UFC/mL = \frac{(50 * 100)}{0,1}$ $UFC/mL = 50\ 000 = 5.10^4$	<p>donde:</p> <p>UFC es unidades formadoras de colonias.</p> <p>FD es factor de dilución.</p> <p>VS es volumen sembrado en la caja.</p>
--	--

5.8.3 Siembra de microorganismos

La siembra es la operación que consiste en colocar microorganismos en un ambiente adecuado para que se desarrollen y multipliquen; en este medio ambiente deben encontrar los recursos necesarios para las actividades metabólicas y respiratorias, un cierto grado de humedad y una temperatura adecuada (Thuar et al., 2015).

Los métodos de siembra más usados en medios solidos son:

- **Siembra en profundidad:** se coloca una alícuota de una muestra (o su dilución) en el interior de una caja de Petri estéril y se vuelca sobre la misma el medio de cultivo agarizado fundido (previamente autoclavado y enfriado a 40 - 45 °C). Este método se utiliza para recuento de microorganismos que requieren un ambiente microaerófilo.
- **Siembra masal en superficie:** en una caja con medio agarizado se siembra un volumen conocido (generalmente 0,1 mL) de la muestra mediante una micropipeta y se distribuye sobre toda la superficie con ayuda de una espátula de Drigalsky (Figura 5.29). Este método se utiliza para recuento de microorganismos aerófilos o anaerófilos si se incuba en la atmósfera modificada de una jarra de anaerobiosis (Figura 5.12).
- **Siembra en estrías por agotamiento:** el objetivo de este procedimiento es obtener colonias separadas y aislarlas fácilmente. Procedimiento adaptado de Madigan (2015), se toma la muestra (o su dilución) con un ansa previamente esterilizada en la llama del mechero (Figura 5.32 A). Se descarga sobre la superficie de una placa de Petri con medio de cultivo agarizado estéril formando estrías. La estría inicial se traza a un costado de la placa con medio sólido. Las estrías se realizan formando ángulo con las estrías iniciales (Figura 5.32: 2B).

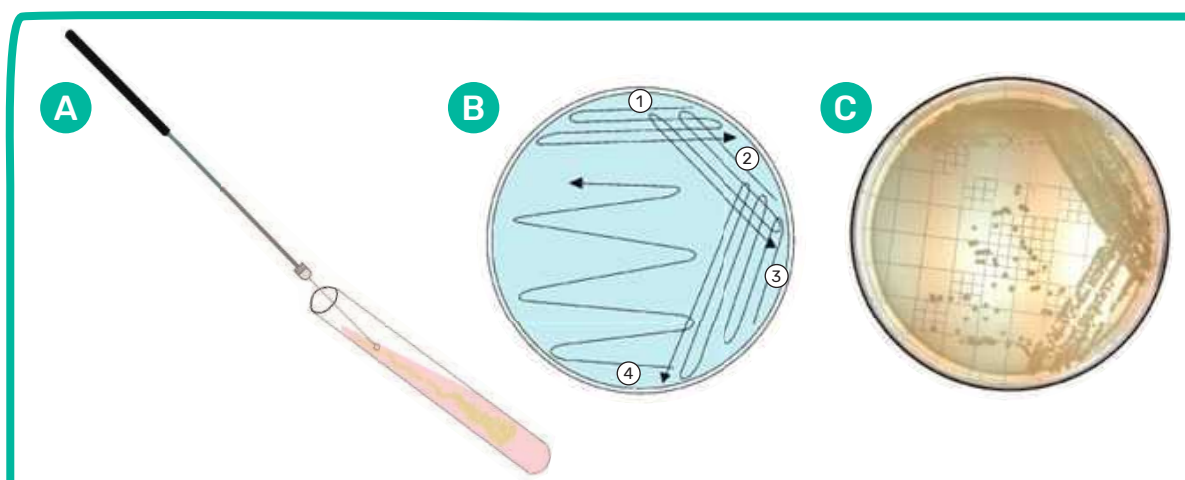


Figura 5.32: Método de siembra en estría por agotamiento. A partir de un inóculo inicial (A), se traza la estría inicial (B1) y las siguientes (B2, B3 y B4). Imagen de una caja de Petri sembrada en estrías por agotamientos luego de incubada (C).

5.8.4 Tinciones

Previo a la tinción propiamente dicha se debe realizar un frotis. El frotis es la operación de fijar microorganismos en la superficie de un portaobjetos para evitar que se laven con los colorantes.

Las tinciones de microorganismos son procedimientos que aumentan el contraste de las células con el medio, lo que permite distinguir su forma y tamaño. De esta manera, a través de la utilización de un microscopio se pueden diferenciar grupos bacterianos por su reacción frente a ciertos colorantes. Existen diversos tipos de coloraciones, las cuales se pueden clasificar en:

- **Coloraciones simples:** usan un solo colorante, como tinción con safranina, cristal violeta o azul de metileno, todas las células se tiñen uniformemente.
- **Coloraciones compuestas:** cuando se emplean dos o más colorantes. La tinción de Gram, es una coloración compuesta, y a su vez diferencial, ya que permite separar las bacterias en dos grandes grupos.

En el capítulo 7 se desarrolla la metodología para realizar frotis y tinciones de interés para un laboratorio cervecero.

MÉTODOS DE CONTROL DE CALIDAD DE LEVADURA Y CERVEZA

MUESTREO DE CERVEZA DESDE
FERMENTADORES

PRUEBA DE MOSTO FORZADO

PRUEBA DE DIACETILO

PRUEBA DE FERMENTACIÓN FORZADA

PRUEBA DE ESTABILIDAD DEL MOSTO
INOCULADO

ENSAYOS DE FERMENTACIÓN

PRUEBA DE DETERIORO DE PRODUCTO
TERMINADO

HISOPADO DE SUPERFICIES

RECuento DE COLONIAS EN PLACA

DETERMINACIÓN DE BACTERIAS COLIFORMES



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

Dalmasso, Lucas Pablo y Gallace, María Eugenia

La selección de los métodos que se describen a continuación responde a técnicas que se pueden realizar con bajo nivel tecnológico y relativamente pequeñas inversiones, desde algunos test sencillos hasta pruebas microbiológicas más complejas.

6.1 MUESTREO DE CERVEZA DESDE FERMENTADORES (adaptado de White y Jamil Zainasheff, 2010)

La toma de muestras directamente desde los fermentadores es un método simple, que requiere de la preparación previa del kit de materiales a utilizar, ya que la muestra se debe obtener de manera aséptica para evitar lecturas erróneas en el laboratorio. Es fundamental que el operario, se quite todos los accesorios de las manos y antebrazos, se lave bien las manos con agua y jabón, y posteriormente se desinfecte con alcohol 70%; otra opción es utilizar guantes de nitrilo y alcohol 70% en las manos enguantadas.

Materiales:

- Recipientes estériles de muestreo previamente rotulados con tipo de muestra y fecha
- Hisopos de algodón y esferas de algodón
- Alcohol medicinal (96%)
- Pulverizador con alcohol al 70%
- Encendedor

Procedimiento:

Si bien puede ser realizado por un operario, es recomendable que intervengan dos, uno para desinfectar y manipular la canilla del fermentador mientras el otro se encarga del recipiente de muestreo.

1. Limpiar el interior del tomamuestras o canilla media del fermentador con un hisopo empapado con alcohol. Repetir hasta que esté limpio e impecable.
2. Limpiar el exterior de la llave con una esfera de algodón empapada con alcohol.
3. En fermentadores de acero inoxidable se puede flamear la canilla con el encendedor. **IMPORTANTE:** no realice este paso en fermentadores plásticos.
4. Tener cerca el recipiente de recolección estéril, etiquetado y con la tapa desenroscada pero no retirarla aún.
5. Abrir la válvula y dejar que fluyan a través del grifo aproximadamente unos 350 mL de cerveza antes de recoger en el recipiente de muestreo estéril. Recolectar un mínimo de 100 mL para realizar pruebas microbianas completas. Cerrar la tapa de forma segura, limpiar y desinfectar el exterior. Trabajar tan rápido como sea posible una vez que haya abierto el recipiente estéril.
6. Repetir el procedimiento de limpieza posterior a la recolección de la muestra, y llevar rápidamente las muestras al laboratorio.

6.2 PRUEBA DE MOSTO FORZADO (adaptado de Libkind Frati y Latorre, 2017)

Este método se utiliza para indicar la eficiencia del protocolo de limpieza y sanitización, permite detectar microorganismos en el proceso de elaboración de mosto y en el circuito hasta su llegada al fermentador (etapas previas a la inoculación de la levadura).

Materiales:

- Ídem materiales para el muestreo desde fermentadores
- 3 recipientes para recolección de mosto estéril
- Estufa de cultivo o lugar cálido

Procedimiento:

1. Recoger de manera aséptica en un recipiente estéril una muestra de mosto desde la olla de hervor. Rotular la muestra como “Control Negativo”.
2. Recoger de manera aséptica una muestra de mosto luego del enfriador y antes de ingresar al fermentador. Rotular la muestra como “Enfriador”.
3. Recoger de manera aséptica una muestra de mosto del fermentador antes de inocular la levadura. Rotular la muestra como “Fermentador”.
4. Colocar las tres muestras en estufa de cultivo a 30 °C durante 7 días o más.
5. Inspeccionar y registrar las observaciones de las muestras desde el primer día (presencia de turbidez y burbujas).
6. Se considera que la muestra está contaminada (positivo) cuando se observa producción de gas y/o turbidez. Siempre se compara con Control Negativo (Figura 6.1) y considerando las tablas 6.1 y 6.2. Si la muestra Control Negativo da positivo indica que los recipientes no estaban estériles y/o el procedimiento de toma de muestra no fue el adecuado.



Figura 6.1: Resultados de la prueba de mosto forzado. (A) resultado negativo (-), sin turbidez y (B) resultado positivo (+), con turbidez y presencia de burbujas.

Tabla 6.1: Resultados de la prueba de mosto forzado.

MUESTRA			OBSERVACIONES	MEDIDAS CORRECTIVAS
control	enfriador	fermentador		
-	+	-	Problemas de limpieza y sanitización del enfriador.	Revisar el protocolo de limpieza y desinfección. Si el problema persiste considerar desarmar el enfriador de placas para una limpieza profunda. Además revisar las mangueras, estas deben conservar su color y estado original.
-	-	+	Problemas de limpieza y sanitización del fermentador, accesorios o conectores.	Revisar el protocolo de limpieza y desinfección. Verificar el estado de la superficie interior del fermentador, especialmente si es de plástico, no se deben detectar incrustaciones minerales ni ralladuras.
-	+	+	Falta de sanitización del enfriador y fermentador o bien, los microorganismos presentes en el intercambiador de calor contaminaron el fermentador.	Tomar las medidas correctivas para los dos casos anteriores.
-	-	-	Los protocolos de limpieza y sanitización funcionan correctamente.	No es necesario tomar medidas correctivas.

Tabla 6.2: Resultados positivos de la muestra de mosto forzado en función del tiempo de incubación y recomendaciones.

TIEMPO HASTA RESULTADO POSITIVO	GRADO DE CONTAMINACIÓN	MEDIDAS CORRECTIVAS
1 día	Contaminación excesiva	Falla grave en la limpieza y desinfección. Se recomienda NO vender la cerveza, ni reutilizar levadura.
2-3 días	Muestra altamente contaminada	Es necesario revisar los protocolos de limpieza, la cerveza podría verse afectada. No mezclar con otros lotes. Realizar análisis sensoriales con frecuencia. No reutilizar la levadura.
4-6 días	Contaminación leve	Verificar los protocolos de limpieza. La cerveza podría o no verse afectada.
7 o más días	Limpieza adecuada	Continuar trabajando de esta manera.

6.3 PRUEBA DE DIACETILO (adaptado de Libkind Frati y Latorre, 2017)

Es una prueba simple no cuantitativa para detectar precursores de diacetilo en una cerveza. Existen numerosas cepas de levaduras cerveceras que son grandes productoras de este tipo de precursores, en particular las levaduras de origen inglés. Para eliminar estos precursores se requiere que la levadura sea viable al finalizar la fermentación, que no haya sedimentado completamente, y suficiente temperatura para que el proceso de reabsorción sea más eficiente. Esto sucede durante la maduración en caliente, una vez que la cerveza llega a la atenuación deseada (Ver capítulo 3).

La prueba de diacetilo permite evaluar si la maduración en caliente fue efectiva, y establecer el tiempo mínimo requerido para completarla para cada estilo de cerveza. Los precursores de diacetilo se convierten en diacetilo por oxidación y se puede forzar esta conversión en el laboratorio, usando calor y oxígeno para transformar el precursor de diacetilo (no posee sabor) a diacetilo (presenta sabor) en poco tiempo. Si efectivamente hay presencia de diacetilo será necesario continuar con la maduración en caliente. Para realizar esta prueba es necesario haber realizado cursos de análisis sensorial y poseer cierta experiencia en reconocer este *off-flavor*.

Materiales:

- Dos vasos de vidrio
- Papel de aluminio o plástico *Film*
- Baño de agua caliente (baño termostático o baño maría)
- Baño de agua helada (baño maría inverso)
- Termómetro

Procedimiento:

1. Calentar el baño de agua caliente entre 60 y 70 °C.
2. Recoger cerveza en maduración en caliente en cada vaso y cubrirlos con papel de aluminio o plástico *Film* (rotular un vaso como “Control” y otro como “Caliente”).
3. Colocar el vaso “Caliente” en el baño de agua caliente, y mantener el vaso “Control” a temperatura ambiente.
4. Luego de 20 minutos, retirar la cerveza del baño caliente y enfriar con un baño de agua fría a la misma temperatura que la otra muestra.
5. Retirar el papel aluminio o plástico *Film* y percibir el aroma de cada muestra. El aroma mantecoso permite reconocer la presencia del diacetilo (Tabla 6.3). Ante la presencia del mismo se recomienda elevar unos grados la temperatura del fermentador y dejar que la levadura siga con el proceso de absorción de diacetilo y su precursor (no transferir, envasar ni embarrilar la cerveza y evitar disminuir la temperatura). Repetir la prueba días posteriores hasta no detectar diacetilo en ambas muestras (control y caliente).

Tabla 6.3: Resultados de la prueba de diacetilo.

MUESTRA		RESULTADO	MEDIDAS CORRECTIVAS
control	caliente		
Sin diacetilo	Sin diacetilo	Ausencia del precursor.	La cerveza está lista.
Sin diacetilo	Con diacetilo	Presencia del precursor.	La cerveza necesita más tiempo de maduración en caliente.
Con diacetilo	Con diacetilo	La cerveza tiene mucho diacetilo o su precursor.	Posible contaminación. Si no es un problema bacteriano, la cerveza necesita más tiempo con la levadura.
Con diacetilo	Sin diacetilo	Resultado incoherente.	Error en el rotulado de los vasos o en el análisis sensorial.

6.4 PRUEBA DE FERMENTACIÓN FORZADA (adaptado de White y Jamil Zainasheff, 2010)

El objetivo de esta prueba es forzar la fermentación para llegar a la máxima atenuación, esto se logra con alta temperatura y agitación constante. El resultado suele ser una densidad final ligeramente inferior a la fermentación principal, es decir el límite de atenuación posible con esa combinación de levadura y mosto (esta fermentación de prueba alcanza la densidad final más rápido que la fermentación principal). La información que brinda este test ayuda a la toma de decisiones acerca del lote de cerveza que se está fermentando, si se detiene temprano y la densidad final es alta, se conoce qué nivel de atenuación era posible. Otra aplicación de esta prueba es ajustar la temperatura de fermentación en base a un porcentaje de atenuación, se sabrá qué valor representa el 100% de la fermentación.

Materiales:

- Ídem materiales para el muestreo desde fermentadores
- Cuarto estufa (opcional)
- Agitador orbital o magnético (opcional)
- Erlenmeyer de 500 mL estéril con tapón de algodón cubierto con papel aluminio. Si se cuenta con agitador magnético colocar la barra magnética (buzo) en el Erlenmeyer previo a la esterilización
- Autoclave u olla a presión

Procedimiento:

1. Recoger asépticamente mosto inoculado y listo para la fermentación en el Erlenmeyer. La muestra debe ser de 100 o 150 mL (Ver ítem 6.1).
2. Colocar el Erlenmeyer en el agitador en cuarto estufa a 28 °C. Si no se cuenta con un cuarto estufa, regular la temperatura ambiente utilizando algún elemento calefactor.
3. Una vez que toda la actividad se detiene, entre 48-72 horas, se debe medir la densidad.

6.5 PRUEBA DE ESTABILIDAD DEL MOSTO INOCULADO

Esta prueba permite comprobar si el proceso de inoculación introdujo contaminación bacteriana, a través de la verificación de la estabilidad del mosto inoculado. Importante: no detecta levaduras ambientales.

Materiales:

- Ídem materiales para el muestreo desde fermentadores
- Solución de cicloheximida 0,1%
- Micropipeta automática de volumen variable 100 – 1000 µL (P1000)
- *Tips* o puntas para micropipeta
- Cuarto estufa, estufa de cultivo o lugar cálido
- Agitador orbital (opcional)

Procedimiento:

1. Recoger asépticamente una muestra de mosto del fermentador después de inocular la levadura (Ver ítem 6.1).
2. Agregar con micropipeta 400 µL (0,4 mL) de solución de cicloheximida al 0,1% por cada 100 mililitros de muestra. **Marcar claramente la muestra como veneno. El consumo accidental de esta muestra es nociva para la salud. En caso de que ocurra, diríjase al centro médico más cercano con la etiqueta del producto.**
3. Colocar la muestra en un cuarto estufa a 30 °C (o en un lugar cálido), durante 7 días en un agitador orbital, o agitar manualmente de manera periódica.
4. Inspeccionar y registrar las observaciones de las muestras desde el primer día (presencia de turbidez y burbujas).
5. Obtener el resultado comparando con la Tabla 6.2.
6. Desechar la muestra.



Peligro, sustancia tóxica.
Al manipular cicloheximida
use gafas, guantes y barbijo.

6.6 ENSAYOS DE FERMENTACIÓN (adaptado de White y Jamil Zainasheff, 2010)

Los ensayos de fermentación en laboratorio tienen como objetivo conocer las características de una cepa de levadura, su atenuación, efectos de tasas de inoculación y características de sabor. Además, se pueden realizar múltiples ensayos simultáneos para comparar diferentes variables (cepa, temperatura, tasa de inoculación, agregado de frutas).

Materiales:

- Erlenmeyers estériles de 2 o 3 litros o botellones (*growler*) preferentemente transparentes para poder observar la fermentación
- *Airlock*
- Pulverizador con alcohol al 70%
- Mosto

Procedimiento:

1. Recoger mosto hasta completar el 75% del volumen de cada recipiente estéril, antes de la inoculación con levaduras del fermentador principal (Ver ítem 6.1). Otra opción es preparar un pequeño volumen de mosto exclusivamente para realizar este ensayo.
2. Inocular con levadura los mostos contenidos en cada recipiente, previamente rotular la fecha y el tipo de cepa de levadura que se inocula en cada caso, la tasa de inoculación y cualquier otro tratamiento con el que se desea experimentar.
3. Registrar y monitorear la temperatura de fermentación desde el momento de la inoculación. El control de temperatura es el parámetro más importante a perfeccionar, caso contrario, la prueba de fermentación no tendrá el mismo resultado que la cerveza de una fermentación principal. Si se cuenta con una cámara de flujo laminar, tomar de manera

aséptica muestras diarias para medir la densidad y construir una curva de fermentación.

4. Una vez concluida la fermentación, registrar el resultado de la degustación de la cerveza y medir los valores de pH y densidad final.

6.7 PRUEBA DE DETERIORO DE PRODUCTO TERMINADO

Las muestras de un mismo lote se pueden someter a diferentes condiciones de almacenamiento para verificar cambios sensoriales a lo largo del tiempo. Este protocolo permite distinguir si existe deterioro de la cerveza y el grado del mismo, además de definir sus posibles causas (oxidación, contaminación) y considerar diferentes estrategias para contrarrestar el efecto negativo. La desventaja de este método es que se requiere personal entrenado en análisis sensorial.

Materiales:

- Tres muestras de cerveza terminada de un mismo lote (en botellas o latas)
- Estufa de cultivo
- Refrigerador o cámara de frío (es necesario mantener la temperatura cerca de 0 °C)

Procedimiento:

1. Día 1: Rotular las muestras de cerveza con los números 1 a 3 (Tabla 6.4). Colocar las muestras 1 y 2 en el refrigerador y la muestra número 3 en estufa de cultivo a 37 °C.
2. Día 7: Colocar en estufa de cultivo a 37 °C la muestra número 2.
3. Día 14: Retirar las muestras de la estufa de cultivo y la muestra almacenada en frío y mantenerlas a hasta que se igualen a temperatura ambiente. Realizar el análisis sensorial a ciegas (sin conocer el tipo de muestra que se evalúa). Para ello, se deberá contar con otra persona para que asista, sirva y organice las muestras (podrá rotular las copas con algún código para su identificación). Lo primero que debe hacer la persona que llevará adelante el análisis será ordenar de manera ascendente y de acuerdo a su criterio el grado de envejecimiento de las cervezas (ejemplo: numerará las copas con el número 1 la de mayor grado de conservación, hasta 3 la de mayor envejecimiento y deterioro. A continuación, podrá proseguir con el protocolo de análisis sensorial y describir diferentes atributos.

Tabla 6.4: Rótulos de las muestras de cerveza de la prueba de deterioro de producto terminado.

Nº DE MUESTRA	DÍAS DE ALMACENAMIENTO A 37°C	DÍAS DE ALMACENAMIENTO EN FRÍO
1	0	14
2	7	7
3	14	0

6.8 HISOPADO DE SUPERFICIES

Es un método muy utilizado en la validación de la efectividad de los procesos de limpieza y desinfección de áreas con superficie plana o con diferentes formas (mangueras, tanques, juntas, enfriadores de mosto y otras superficies) y es relativamente económico (Mostert et al., 2005; Pérez-Rodríguez et al., 2008). Sin embargo, presenta la incapacidad de recuperar

con eficacia todos los microorganismos de la superficie, solo permite un valor aproximado del 20% (Salo et al., 2000). La detección y el recuento de UFC dependen de la liberación eficaz de los microorganismos del material para su posterior recuperación, por ejemplo para las células que forman parte de un biofilm que presentan resistencia al desprendimiento (Salo et al., 2000; Moore y Griffith, 2002; 2007). A continuación, se detallan dos métodos:

6.8.1 Muestreo con hisopos de algodón estériles (adaptado de Brewing Science Institute, 2019)

En este método se utilizan hisopos estériles protegidos en un tubo de polipropileno con fondo redondo y etiqueta-precinto. Un ejemplo comercial es el hisopo Deltalab™, modelo 300250 o cualquier otro de similares características.

Materiales:

- Cajas de Petri
- Medios de cultivo adecuados (Ver ítem 6.9)
- Hisopos de algodón estériles
- Agua destilada estéril en un tubo de ensayo
- Gradilla para tubos de ensayo
- Estufa de cultivo o ambiente templado
- Autoclave u olla a presión
- Mechero Bunsen portátil a gas o alcohol

Procedimiento:

1. Colocar en una gradilla un tubo de ensayo con agua estéril y un hisopo con su tubo protector.
2. Humedecer la punta del hisopo en agua estéril y evitar tocar el interior de los tubos. Para muestrear diferentes superficies, prever un tubo con agua destilada estéril por cada hisopo, de esta manera se minimiza el riesgo de contaminación de la muestra.
3. En superficies planas: sostener el hisopo en ángulo de 30° con la superficie, frotar completamente el hisopo sobre un cuadrado de 100 cm² (cuadrado de 10 cm de lado) unas tres veces invirtiendo la dirección entre los trazos alternos, en superficies irregulares frotar completamente el hisopo en varias direcciones. Para obtener mejores resultados, trabajar cerca de la llama de un mechero (Por ejemplo, materiales pequeños como un conector rápido de un extremo de una manguera).
4. Colocar inmediatamente el hisopo dentro de su tubo protector, cerrar bien la tapa, rotular las muestras y llevarlas al laboratorio lo más pronto posible.
5. En el laboratorio rotular cajas de Petri con el lugar donde se obtuvo la muestra, tomar un nuevo hisopo de algodón estéril y estriar una caja de Petri con el medio de cultivo seleccionado. Rotular esta placa como "Control", la ausencia de crecimiento microbiano asegura que los hisopos y el medio están estériles y que el procedimiento es adecuado.
6. Rotular las placas con el área frotada (por ejemplo: manguera post enfriador) y la fecha. Usar placas con medio WLD para detectar bacterias, Agar para recuento en placa (PCA) o Agar mosto, como medios generales, u otros medios que considere adecuados (más adelante en este capítulo se describen varios medios de cultivo utilizados habitualmente en laboratorios de microbiología cervecera).
7. Colocar las cajas de Petri en estufa de cultivo a 30 °C en posición invertida, es decir con el medio hacia arriba durante 3 a 5 días.
8. Registrar resultados de las colonias: número, tipo, tamaño y color de las colonias. El resultado de hisopado de superficies planas se puede expresar como UFL/cm², mientras

que los resultados de los hisopados de superficies irregulares se expresan como UFC/unidad, por ejemplo 56 UFC/interior de conector rápido.

6.8.2 Muestreo húmedo con hisopos de algodón estériles con Caldo Letheen

Consiste en un hisopo que utiliza caldo Letheen para facilitar la recuperación de bacterias durante el muestreo (Figura 6.2). El caldo Letheen tiene la propiedad de neutralizar yodo, cloro, halógenos, amonio cuaternario, sanitizantes ácidos y otros sanitizantes residuales que permanecen en las superficies, pre o post proceso de sanitización. Este tipo de hisopo incrementa la exactitud de los recuentos obtenidos en los muestreos, está diseñado para ser utilizado en conjunto con cualquier placa Petrifilm™ u otro método de control microbiológico.

Materiales:

- Hisopos Quick Swab Caldo Letheen 6433 de la marca 3M™ u otro de similares características
- Placas Petrifilm™
- Mechero Bunsen

Procedimiento:

1. Rotular el hisopo con los datos del tipo de muestra.
2. En el lugar de muestreo, preparar el hisopo sosteniéndolo con el extremo del bulbo cerca del pulgar. Doblar la válvula roja en un ángulo de 45° hasta que escuchar que la válvula se rompe, esto permite que el caldo de Letheen fluya hacia el extremo inferior del tubo y humedezca el hisopo.
3. Apretar el bulbo que contiene la válvula para transferir todo el caldo de Letheen al extremo inferior del tubo del hisopo.
4. Sostener el bulbo superior, girar y separar el hisopo del tubo que contiene el caldo de Letheen.
5. Sostener el hisopo para formar un ángulo de 30° con la superficie. Frotar completamente el hisopo sobre la superficie (100 cm²) tres veces invirtiendo la dirección entre los trazos alternos. Luego de completar el muestreo, insertar de manera segura el hisopo en su tubo protector y transportar lo más pronto posible al laboratorio.
6. En laboratorio, agitar el hisopo con Vortex (o manualmente de manera vigorosa) durante 10 segundos para liberar las bacterias de la punta de algodón.
7. Exprimir el contenido de la punta del hisopo presionando y girando el hisopo contra la pared del tubo.
8. Cerca de la llama del mechero Bunsen verter cuidadosamente todo el contenido del tubo en una placa Petrifilm™ del modelo que se ajuste a sus necesidades (Por ejemplo: placa Petrifilm™ para recuento de aerobios totales o placa Petrifilm™ para bacterias ácido lácticas).
9. Seguir las indicaciones específicas de incubación de la placa Petrifilm™ (generalmente a 30 °C) durante 48 horas.
10. Registrar los resultados: número de colonias, tipo, tamaño y color.



Figura 6.2: Hisopos de algodón estériles con Caldo Letheen.

6.9 RECuento DE COLONIAS EN PLACA (cajas de Petri)

Es un método muy utilizado para determinar el tamaño de la población de microbios en una muestra. El recuento de microorganismos en placa se basa en que cada uno desarrollará una colonia visible, pero dado que una muestra no es totalmente homogénea, es posible que una colonia se origine de uno o más microorganismos. En este último caso se realiza una subestimación del número de microbios de la muestra, por ejemplo un diplococo generará una sola colonia a pesar que son dos bacterias. Además, muchos de los microorganismos presentes en la muestra no pueden crecer en las condiciones dadas de pH, temperatura, medio de cultivo, tiempo, por lo que el recuento también puede ser inferior al real. Sin embargo, se puede afirmar que cada colonia se formó a partir de por lo menos un microorganismo, entonces la colonia se considera una unidad formadora de colonia (UFC) a los efectos de los cálculos. Se admite por lo tanto que, en los métodos de recuento de microorganismos vivos son inevitables los errores. En los análisis microbiológicos cuantitativos los resultados se expresan en $\text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ (UFC/mL de muestra) y deben considerarse las reglas que se detallan a continuación.

6.9.1 Reglas para la expresión de resultados

La Organización Internacional para la Estandarización (ISO por sus siglas en inglés) estableció en 2014 reglas generales para exámenes microbiológicos. Aquí se detallan los aspectos más importantes de estas normas:

- Los resultados más fiables se obtienen contando placas que contengan entre 10 y 300 colonias.
- Si dos diluciones de la misma muestra contienen entre 10 y 300 colonias, realizar un promedio teniendo en cuenta la dilución. Es decir, cuando las cajas de Petri de dos diluciones decimales consecutivas contienen entre 10 a 300 colonias, calcular el número de UFC/mL de cada dilución y el promedio de los dos valores: éste será el valor UFC/mL de la muestra.
- Redondear los resultados hasta dos dígitos significativos sólo en el momento de la conversión a UFC/mL, y expresar los resultados como un número entre 1,0 y 9,9 multiplicado por la potencia correspondiente de 10 (Por ejemplo: $1,3 \cdot 10^8$ UFC/mL).
- Si las muestras se inocularon en series duplicadas y una o dos placas inoculadas con la misma dilución contienen colonias, calcular el promedio de colonias y multiplicar por el recíproco del factor de dilución para obtener el número de UFC/mL.

- En caso de que todas las placas tengan más de 300 colonias, contar las menos pobladas. Si contienen menos de 10 colonias/cm², contar 12 cuadros de 1 cm² y multiplique el promedio por 56 (si la placa es de 90mm de diámetro); si las colonias están más pobladas, contar 4 cuadros de 1 cm² y multiplicar el promedio por 56. Expresar los resultados como “UFC/mL estimadas”. No exprese los resultados como TNTC (*Too numerous to count*, demasiado numerosos para el recuento) siempre que sea posible.
- Aquellas placas con menos de 10 colonias, pero 4 como mínimo, se calculan los resultados tal como se expone en el caso general y expréselos como “UFC/mL estimadas”.
- Si el total de colonias en una caja es de 3 a 1, la precisión del resultado es demasiado baja, por lo que el resultado se expresará como:

"Los microorganismos estudiados están presentes, pero menos de = $(\frac{4 * FD}{VS}) UFC/mL$ "

donde:

FD: Factor de dilución

VS: Volumen sembrado

- El resultado de las placas en que todas las diluciones de cualquier muestra no tienen colonias, se expresa como:

"menos de = $(\frac{1 * FD}{VS}) UFC/mL$ "

donde:

FD: Factor de dilución

VS: Volumen sembrado

- Considerar que para cada lote de medio de cultivo se usa una placa como control de esterilidad después del autoclavado que se mantiene cerrada todo el tiempo. Además, se destina otra caja de Petri por cada medio de cultivo que se deja abierta en la campana de flujo laminar durante todas las operaciones de manipulación del ensayo, a modo de control de esterilidad del entorno de trabajo. Ambas cajas se incubarán del mismo modo que las sembradas con las muestras.

6.9.2 Recuento con Agar mosto

Es un medio de cultivo general donde se desarrollan tanto bacterias como levaduras. En su composición contiene mosto de cerveza, este resulta apropiado para determinar contaminantes comunes del mosto y de equipos de la cervecería. Es de fácil elaboración y no requiere insumos costosos, por lo que es uno de los principales medios utilizados cuando una empresa incursiona con pruebas microbiológicas.

La preparación del mosto para este medio de cultivo es sencillo, pero es posible ahorrar tiempo preparando un volumen mayor para mantenerlo conservado a -18 °C (freezer), llamado mosto *stock*.

Materiales:

- Olla de cocina común
- Recipiente plástico o metálico de volumen igual o superior a la olla
- Botellas plásticas de 500 mL con tapa (reutilizada, de agua o gaseosa)
- Mosto *stock*
- 2 g de Agar-Agar
- Solución de Hidróxido de sodio 1 M
- Ácido clorhídrico 1 M
- Medidor de pH digital

- Autoclave u olla a presión
- Frasco autoclavable de 250 mL (Figura 5.24)
- Micropipeta automática de volumen variable 100 – 1000 µL (P1000)
- Tips o puntas para micropipeta
- Cajas de Petri estériles
- Espátula de Drigalsky
- Mechero Bunsen
- Estufa de cultivo
- Cabina de flujo laminar (opcional)
- Solución de cicloheximida 0,1% (opcional)

Preparación de mosto stock:

1. Durante la elaboración de una cerveza 100% malta base, y una vez concluido el macedado, retirar mosto en una olla de cocina, diluir con agua hasta ajustar la densidad a $1025 - 1030 \text{ kg/m}^3$, es importante que este mosto no contenga lúpulo.
2. Hervir durante 15 minutos y si es necesario agregar agua para compensar el volumen evaporado.
3. Trasvasar el mosto a otro recipiente evitar los sedimentos, suplementar con Zinc a razón de $0,2 - 0,3 \text{ ppm}$ y ajustar pH a $5,2 \pm 0,2$ utilizar hidróxido de sodio o ácido clorhídrico según corresponda.
4. Lavar la olla de cocina y hervir nuevamente el mosto durante 5 minutos. Una vez concluido el hervor realizar un torbellino (*whirlpool*) y esperar a que la temperatura descienda y sedimenten los sólidos.
5. Llenar las botellas con el volumen de mosto que utilizará posteriormente, (evitar los sedimentos) y congelar a -18°C .

Procedimiento:

1. Disolver 20 gramos de Agar-Agar en 1 L de mosto *stock* previamente descongelado. Preparar el volumen necesario, considerar que cada caja de Petri contendrá entre 18 y 20 mL.
2. Ajustar el pH hasta un valor de $5 \pm 0,2$ (utilizar ácido clorhídrico para acidificar o hidróxido de sodio para alcalinizar el medio).
3. Autoclavar el medio a 121°C durante 15 minutos (temperaturas más altas o duraciones más largas son perjudiciales para este medio).
4. Plaquear según las indicaciones del ítem 5.8.1.
5. Rotular las cajas con tipo de medio, nombre de muestra y dilución.
6. Sembrar 0,1 mL de la muestra en la superficie y esparcir con espátula de Drigalsky previamente flameada con alcohol, cerrar e invertir las placas. Considerar realizar diluciones seriadas de la muestra si hay sospecha de contaminación severa.
7. Colocar en estufa de cultivo a 30°C o en un ambiente cálido e incubar por 72 horas.
8. Registrar el crecimiento, identificar las diferencias entre tipos de colonias y realizar el recuento de cada una de ellas.
9. Seleccionar colonias típicas para identificación por tinción de Gram u otros métodos.

Opcional:

- Se puede agregar cicloheximida una concentración final de 4 mg/L para hacerlo selectivo para



Peligro, sustancia tóxica.
Al manipular cicloheximida
use gafas, guantes y barbijo.

contaminantes bacterianos, ya que suprime el crecimiento de la mayoría de las levaduras y hongos filamentosos.

- El agregado de antibióticos debe ser posterior a la esterilización con autoclave cuando la temperatura disminuye a 40 – 45 °C.
- Este medio con cicloheximida también se utiliza para detectar bacterias anaeróbicas. Para esto incubar dentro de una jarra o bolsa de anaerobiosis con un sobre generador de anaerobiosis; otra opción es recrear un ambiente microaerófilo realizando siembra en profundidad.

6.9.3 Recuento con medio WLN y WLD (Wallerstein Laboratories Nutrient y Wallerstein Laboratories Differential)

Los medios de cultivo WLN y WLD sirven para detectar contaminantes usuales en cervezas. Contienen indicador verde de bromocresol que permite que medios tornen su coloración de azul a amarillo o verde claro en presencia de bacterias productoras de ácidos. También pueden incubarse cajas de Petri con este medio de forma aeróbica y anaeróbica. Las condiciones aeróbicas ayudarán a identificar bacterias productoras de ácido acético y bacterias entéricas, mientras que las condiciones anaeróbicas a *Lactobacillus* y *Pediococcus*. La única diferencia entre estos dos medios de cultivo nutritivos es que el medio WLN no contiene cicloheximida, y al no ser selectivo permite el crecimiento de levaduras de cerveza, levaduras ambientales, bacterias y hongos filamentosos.

Interpretación de resultados: *Saccharomyces cerevisiae* puede crecer como una colonia blanca, verde pálido o azul verdosas, la interpretación se realiza de manera sencilla, si el crecimiento de las colonias es espaciado y poco abundante. Otras especies de *Saccharomyces* y géneros de levaduras ambientales generalmente se distinguen fácilmente del típico crecimiento que tiene la levadura en WLN, porque la morfología de las otras colonias es notablemente diferente (arrugadas, levantadas, ásperas, polvorientas), y su color generalmente difiere también, pasando de blanco por sombras de azul a verde (Torres Torres, 2007).

El medio de cultivo WLD presenta un color azulado, cuando bacterias ácido lácticas o acéticas comienzan a crecer, estas acidifican el medio y se torna de color amarillo que permite diferenciarlas (Trochine y Latorre, 2018).

Materiales:

- Medio WLN
- Agua destilada
- Autoclave u olla a presión
- Micropipeta automática de volumen variable 100 – 1000 µL (P1000)
- Tips o puntas para micropipeta
- Cajas de Petri estériles
- Erlenmeyer de 500 mL
- Tapón de algodón y papel aluminio
- Mechero Bunsen
- Estufa de cultivo
- Cabina de flujo laminar (opcional)
- Solución de cicloheximida 0,1% (opcional)

Preparación de las placas con medio WLN:

1. Disolver 15 g de medio WLN comercial en un Erlenmeyer de 500 mL, con 200 mL de

agua destilada. Cerrar con un tapón de algodón cubierto de papel aluminio y hervir el contenido durante 1 minuto agitando constantemente para fundir el medio.

2. Autoclavar a 121 °C. durante 10 minutos (recordar que temperaturas más altas o duraciones más largas son perjudiciales al medio).
3. Plaquear según las indicaciones del ítem 5.8.1.
4. Rotular las cajas con tipo de medio, nombre de muestra y dilución.
5. Sembrar 0,1 mL de la muestra en la superficie del medio y esparcir con espátula de Drigalsky, previamente flameada con alcohol. Cerrar e invertir las placas. Considerar realizar diluciones seriadas de la muestra según corresponda.
6. Colocar en estufa de cultivo a 25 °C. o en ambiente cálido.
7. Incubar cuatro (4) días y realizar el recuento de levaduras. Es posible que las colonias bacterianas demoren entre cuatro y siete días en desarrollar lo suficiente para identificar el organismo.

Opcional:

- Para preparar el medio WLD siga el procedimiento para la preparación de las placas con medio WLN con la diferencia de agregar cicloheximida al medio a una concentración final de 4 mg/L.
- Es importante que el agregado del antibiótico cicloheximida sea posterior a la esterilización con autoclave cuando la temperatura disminuye a 40 – 45°C.
- Considerar incubar las placas en anaerobiosis. Para esto se deberá contar con jarra o bolsa de anaerobiosis con un sobre generador de anaerobiosis.



Peligro, sustancia tóxica.
Al manipular cicloheximida
use gafas, guantes y barbijo.

6.9.4 Recuento con Medio UBA (Universal Beer Agar)

Es un medio de cultivo definido que se encuentra disponible de manera comercial y contiene nutrientes y agar. Se puede agregar una proporción de cerveza para simular de manera más certera el ambiente natural que se encuentra en una cervecería, de esta manera, el medio se vuelve más selectivo a microorganismos contaminantes de cerveza. También puede agregarse cicloheximida (4 mg/L) y de esta manera se corroboran sólo contaminaciones por bacterias.

Este medio permite detectar la presencia de organismos no deseados junto con la levadura que se va a inocular en un fermentador, también en el mosto o en la cerveza almacenada. Las técnicas de incubación aeróbica detectan la presencia de *Acetobacter* sp., en cambio la incubación en una jarra o bolsa de anaerobiosis es adecuada para recuento de anaerobias estrictas y facultativas, y la siembra en profundidad para recuento de especies microaerófilas.

Materiales:

- Medio UBA
- Agua destilada
- Cerveza 25 mL
- Autoclave u olla a presión
- Erlenmeyer de 500 mL
- Tapón de algodón y aluminio
- Micropipeta automática de volumen variable 100 – 1000 µL (P1000)

- *Tips* o puntas para micropipeta
- Cajas de Petri estériles
- Espátula de Drigalsky
- Mechero Bunsen
- Estufa de cultivo
- Cabina de flujo laminar (opcional)
- Solución de cicloheximida 0,1% (opcional)

Procedimiento:

1. Disolver 5,5 gramos de medio UBA en un Erlenmeyer con 75 mL de agua destilada, cerrar con un tapón de algodón y papel aluminio, y hervir el contenido durante un minuto con agitación constante para fundir el medio.
2. Agregar 25 mL de cerveza sin desgasificar al medio caliente.
3. Autoclavar a 121 °C. durante 10 minutos, temperaturas más altas o duraciones más largas son perjudiciales al medio.
4. Plaquear según las indicaciones del ítem 5.8.1.
5. Rotular las cajas con tipo de medio, nombre de muestra y dilución.
6. Sembrar 0,1 mL de la muestra en la superficie y esparcir con espátula de Drigalsky previamente flameada con alcohol, luego cerrar e invertir las placas. Realizar diluciones seriadas de la muestra si se sospecha la existencia de contaminación severa.
7. Colocar en estufa de cultivo a 28– 30 °C. o en un ambiente cálido e incubar por 72 horas.
8. Registrar el crecimiento, tipo y número de colonias.
9. Seleccionar colonias típicas para identificación por tinción de Gram u otros métodos.

Opcional:

- Agregar cicloheximida al medio a una concentración final de 4 mg/L. El medio se vuelve selectivo para los contaminantes bacterianos al suprimir el crecimiento de la mayoría de levaduras y hongos filamentosos.
- Es importante que el agregado del antibiótico cicloheximida sea posterior a la esterilización con autoclave cuando la temperatura disminuye a 40 – 45°C.



Peligro, sustancia tóxica.
Al manipular cicloheximida
use gafas, guantes y barbijo.

6.9.5 Recuento con Medio ABD (Advanced Beer-spoiler Detection Medium)

Este medio permite la detección de una amplia gama de bacterias lácticas que deterioran cervezas, incluidas cepas que son difíciles de revelar por metodología convencional. Además, el medio ABD puede usarse como único indicador para diferenciar la capacidad de descomposición de la cerveza de bacterias lácticas sin más pruebas confirmatorias en las cervecerías, lo que proporciona considerables beneficios para la industria cervecera (Suzuki et al., 2008).

Materiales:

- Caldo MRS (Man Rogosa Sharpe)
- Acetato de sodio
- Agar-Agar
- Cerveza Lager comercial tipo Pilsner

- Solución de cicloheximida 0,1%
- Hidróxido de sodio 1 M
- Ácido clorhídrico 1 M
- Medidor de pH
- Autoclave u olla a presión
- Erlenmeyer de 1 L
- Tapón de algodón y aluminio
- Micropipeta automática de volumen variable 100 – 1000 µL (P1000)
- *Tips* o puntas para micropipeta
- Cajas de Petri estériles de tipo ventilada
- Espátula de Drigalsky
- Mechero Bunsen
- Estufa de cultivo
- Cabina de flujo laminar
- Jarra de anaerobiosis
- Sobre generador de anaerobiosis

Procedimiento:

1. Disolver 1,3 gramos de Caldo MRS, 0,25 gramos de acetato de sodio y 7,5 gramos de Agar-Agar en un Erlenmeyer.
2. Agregar 500 mL de cerveza Lager comercial tipo Pilsner previamente desgasificada mediante agitación.
3. Ajustar el pH hasta un valor de $5 \pm 0,2$ con ácido clorhídrico o hidróxido de sodio para acidificar o alcalinizar el medio.
4. Cerrar con un tapón de algodón y papel aluminio y disolver el medio hirviendo el contenido durante un minuto con agitación constante.
5. Autoclavar a 121 °C durante 15 minutos. Temperaturas más altas o duraciones más largas son perjudiciales al medio.
6. Finalizado el proceso de esterilización, esperar que el medio de cultivo alcance 40 – 45 °C y agregar 5 mL de solución de cicloheximida 0,1%, homogenizar y antes que se solidifique, plaquear según las indicaciones del ítem 5.8.1.
7. Rotular las cajas con tipo de medio, nombre de muestra y dilución.
8. Sembrar 0,1 mL de la muestra en la superficie y esparcir con espátula de Drigalsky previamente flameada con alcohol, cerrar e invertir las placas. Considerar realizar diluciones seriadas de la muestra si hay sospecha de contaminación severa.
9. Incubar las placas en la jarra de anaerobiosis con el sobre generador de anaerobiosis en estufa de cultivo a 28 – 30 °C durante 7 días.
10. Crecimiento en este medio indica contaminación bacteriana. Seleccionar colonias típicas para identificación por tinción de Gram u otros métodos.

6.9.6 Recuento con Medio HLP (Hsu's *Lactobacillus Pediococcus* Medium)

Es una prueba para determinar la presencia de bacterias ácido lácticas Gram positivas de los géneros *Lactobacillus* y *Pediococcus*. Este medio contiene cicloheximida y es selectivo para el crecimiento de bacterias anaerobias. La inoculación cuando el medio está aún en forma líquida (40 °C.) permite crear un efecto anaeróbico del ambiente antes de solidificarse.

Materiales:

- Medio HLP
- Agua destilada
- Agar-Agar
- Micropipeta automática de volumen variable 100 – 1000 µL (P1000)
- Tips o puntas para micropipeta
- Tubos de cultivo estériles con tapa de rosca de 16 x 150 mm (tubos falcon)
- Erlenmeyer de 500 mL
- Tapón de algodón y papel aluminio
- Mechero Bunsen
- Estufa de cultivo

Procedimiento:

1. Mezclar 7 gramos de medio HLP y 2 gramos de agar con 100 mililitros de agua destilada en un Erlenmeyer, cerrarlo con tapón de algodón y papel aluminio.
2. Calentar a ebullición haciendo girar el contenido con frecuencia hasta que el medio se disuelva completamente.
3. Pipetear 1 mL de la muestra a analizar y eyectar en un tubo Falcon estéril. Rotular cada tubo con un número de muestra y fecha.
4. Esperar a que el medio se enfríe hasta 45 °C.
5. Transferir 17 mL de medio HLP a cada tubo que contiene la muestra y cerrar bien las tapas.
6. Invertir suavemente los tubos dos veces para distribuir la muestra uniformemente.
7. Colocar los tubos en estufa de cultivo a 30 °C durante 48 horas.
8. Realizar un recuento preliminar. Las colonias de *Lactobacilos* aparecen con color blanco en forma de lágrima invertida, y las colonias de *Pediococcus* aparecen con forma esférica de color blanco.
9. Colocar nuevamente en estufa de cultivo a 30 °C durante un período adicional de 24 a 48 horas y realizar el conteo final.



Peligro: use gafas, guantes y barbijo.

6.9.7 Recuento con Medio LMDA (Lee's Multi-Differential Agar)

Es un medio de cultivo nutritivo complejo que permite detectar la mayoría de los microorganismos (bacterias y levaduras) que se encuentran comúnmente en una cervecería. Las bacterias productoras de ácido como *Acetobacter* y *Gluconobacter*, debido a su capacidad para disolver el carbonato de calcio, se identificarán mediante el desarrollo de una zona clara alrededor de las colonias. Además, la identificación de las colonias se verá facilitada por las características reacciones de color. Se puede usar el mismo medio bajo condiciones anaeróbicas para detectar *Lactobacillus* y *Pediococcus*. Las colonias de *Lactobacillus* presentan una zona de halo y aparecen de color blanco verdoso con un centro verde oscuro y parte inferior amarilla. Las colonias de *Pediococcus* crecen más lentas que los otros organismos y aparecen más pequeñas con una zona halo estrecha. Este medio puede hacerse selectivo para la detección de bacterias mediante la adición de cicloheximida (4 mg/L) luego del autoclavado para suprimir el crecimiento de levadura en el cultivo.

Materiales:

- Medio LMDA
- Agua destilada
- Autoclave u olla a presión
- Micropipeta automática de volumen variable 100 – 1000 µL (P1000)
- Tips o puntas para micropipeta
- Cajas de Petri estériles
- Erlenmeyer de 500 mL
- Tapón de algodón y papel aluminio
- Mechero Bunsen
- Estufa de cultivo
- Cabina de flujo laminar (opcional)
- Solución de cicloheximida 0,1% (opcional)

Procedimiento:

1. Mezclar 8,3 g de medio comercial LMDA en un Erlenmeyer de 500 mL con 100 mL de agua destilada, cerrar con un tapón de algodón y papel aluminio y hervir el contenido durante 1 minuto agitando constantemente para disolver el medio.
2. Autoclavar a 121 °C durante 15 minutos. Temperaturas más altas o duraciones más largas son perjudiciales al medio.
3. Plaquear según las indicaciones del ítem 5.8.1.
4. Rotular las cajas con tipo de medio, nombre de muestra y dilución.
5. Sembrar 0,1 mL de la muestra en la superficie del medio y esparcir con espátula de Dri-galsky previamente flameada con alcohol. Cerrar e invertir las placas. Considerar realizar diluciones seriadas de la muestra si hay sospecha de contaminación severa.
6. Colocar en estufa de cultivo a 30 °C o en ambiente cálido.
7. Las colonias bacterianas demoran entre cuatro y siete días en desarrollar lo suficiente para identificar el organismo.

Opcional:

- Se puede agregar cicloheximida a una concentración final de 4 mg/L para hacer selectivo el medio para los contaminantes bacterianos (suprime el crecimiento de la mayoría de levaduras y hongos filamentosos).
- Es importante que el agregado de los antibióticos sea posterior a la esterilización con autoclave cuando la temperatura disminuye a 40 – 45 °C.
- Este medio con el agregado de cicloheximida también puede ser utilizado para detectar bacterias anaeróbicas. Para esto se deberá incubar dentro de una jarra o bolsa de anaerobiosis con un sobre generador de anaerobiosis. Otra opción es recrear un ambiente microaerófilo realizando siembra en profundidad.



Peligro, sustancia tóxica.
Al manipular cicloheximida
use gafas, guantes y barbijo.

6.9.8 Recuento con Medio LWYM (Lin's Wild Yeast Medium)

Este medio de cultivo se utiliza para la detección y cuantificación de poblaciones de levadura ambiental en cervezas. El crecimiento de la levadura domesticada es suprimido por un componente del medio (cristal violeta). La levadura ambiental se desarrolla como colonias

más grandes y distintas. Si bien este medio está diseñado para fomentar el crecimiento principalmente de levaduras silvestres del género *Saccharomyces*, varias cepas de levaduras que no son *Saccharomyces* también podrán crecer en este medio.

Materiales:

- Medio LWYM
- Solución comercial de Cristal Violeta
- Agua destilada
- Autoclave u olla a presión
- Erlenmeyer de 250 mL
- Micropipeta automática de volumen variable 100 – 1000 µL (P1000)
- Tips o puntas para micropipeta
- Cajas de Petri estériles
- Espátula de Drigalsky
- Tapón de algodón y aluminio
- Mechero Bunsen
- Estufa de cultivo
- Cabina de flujo laminar (opcional)

Procedimiento para preparar las cajas con medio sólido LWYM:

1. Este medio se prepara a partir de dos recipientes separados, utilizando polvo deshidratado LWYM y solución Cristal Violeta. La concentración de cristal violeta está ajustada por el fabricante para proporcionar condiciones óptimas para el crecimiento de levadura ambiental y la inhibición de cultivo de levadura. Es esencial utilizar la solución de cristal violeta del mismo número de lote que se proporciona con el polvo deshidratado LWYM.
2. Agregar 4,4 gramos de medio LWYM en 100 mL de agua destilada en un Erlenmeyer de 500 mL y agregar 1 mL de solución de cristal violeta.
3. Calentar a ebullición para disolver el medio. Agitar el matraz con frecuencia para evitar que de apelmace o queme.
4. Autoclavar a 121 °C durante 15 minutos para esterilizar el medio. Retire rápidamente del autoclave y plaquee según las indicaciones del ítem 5.8.1.
5. Las placas con el medio sólido pueden almacenarse en posición invertida a 4 °C solamente durante 24 a 48 horas antes de su uso.

Procedimiento para la siembra de muestras con altos niveles de levadura:

1. La concentración celular debe determinarse según las indicaciones del ítem 7.4.6.1.
2. Diluir la suspensión de levadura para tener aproximadamente $5 \cdot 10^6$ cél/mL.
3. Rotular las cajas con tipo de medio, nombre de muestra y dilución.
4. Inocular con micropipeta 0,2 mL de muestra diluida que contiene aproximadamente 1 millón de células de levadura en una placa con medio LWYM.
5. Dispersar el inóculo de manera uniforme sobre la superficie del medio, usando una espátula de Drigalsky sin llegar hasta los bordes de la placa.
6. Incubar las placas invertidas en condiciones aeróbicas a 28–30 °C.
7. Examinar las placas después de 4 a 6 días. Las colonias desarrolladas en el medio pueden considerarse levaduras silvestres, algunas cepas de levadura domesticada pueden mostrar un ligero crecimiento en medio LWYM, por lo que solo las colonias distintas se

consideran levaduras silvestres o ambientales. Además, algunas levaduras ambientales de rápido crecimiento (por ejemplo *S. willianus* o *Candida mycoderma*) pueden mejorar el crecimiento de la levadura domesticada. Por lo tanto, algunas colonias de levadura domesticada pueden mostrar un ligero crecimiento en el entorno de las colonias de levadura silvestre.

8. Para el caso de muestras con baja concentración de levaduras, el procedimiento es más complejo y excede los objetivos del presente manual.

6.10 DETERMINACIÓN DE BACTERIAS COLIFORMES

Las enfermedades entéricas causadas por bacterias coliformes se transmiten casi exclusivamente por contaminación fecal. Aislar bacterias entéricas patógenas directamente de cervezas contaminadas es difícil, dado que en caso de estar presente, lo está en pequeña proporción, a menos que la contaminación haya sido reciente y masiva. Para demostrar la existencia de contaminación fecal, basta con poner de manifiesto que la muestra contiene bacterias que habitan normalmente en el tracto intestinal, incluso aunque éstas no sean agentes causantes de enfermedad. Las bacterias que principalmente se usan como indicadores de dicha contaminación son estreptococos fecales y *Escherichia coli*.

Los métodos de análisis sanitarios desarrollados por los bacteriólogos difieren ligeramente de unos países a otros, a continuación se detalla uno de ellos adaptado al análisis de cervezas y consta de dos partes, un análisis presuntivo y un análisis confirmativo.

6.10.1 Análisis Presuntivo

Este análisis determina la presencia de bacterias coliformes pero no indica que estas sean fecales.

Materiales:

- Tres tubos de ensayo con tapones por cada muestra de cerveza
- Medio caldo de Mac Conkey
- Trampa de gases (campanita Durham)
- Autoclave u olla a presión
- Micropipeta automática de volumen variable 100 – 1000 µL (P1000)
- Tips o puntas para micropipeta
- Erlenmeyer de 500 mL
- Mechero Bunsen
- Estufa de cultivo
- Cabina de flujo laminar (opcional)

Procedimiento:

1. Preparar en el Erlenmeyer la cantidad necesaria de medio caldo de Mac Conkey según indicaciones del fabricante hasta que quede totalmente disuelto.
2. Dosificar 10 mL de medio caldo de Mac Conkey en los tubos de ensayo.
3. Colocar una trampa de gases por cada tubo de ensayo y cerrar el tubo con un tapón (Figura 6.3).
4. Autoclavar a 121 °C durante 10 minutos (temperaturas más altas o duraciones más prolongadas son perjudiciales al medio).
5. Dejar enfriar a temperatura ambiente.

6. En la cabina de flujo laminar o cerca de la llama de un mechero Bunsen, sembrar 1 mL de muestra de cerveza en un tubo. Se recomienda realizar esta prueba por triplicado (3 tubos por cada muestra de cerveza).
7. Rotular e incubar en estufa de cultivo a 37 °C por 48 horas.
8. Registrar el resultado: observar presencia de gas retenido en la trampa. Se considera positivo si al menos ocupa el 10% del volumen (Figura 6.4).



Figura 6.3: Tubo con medio Mac Conkey y trampa para gases.

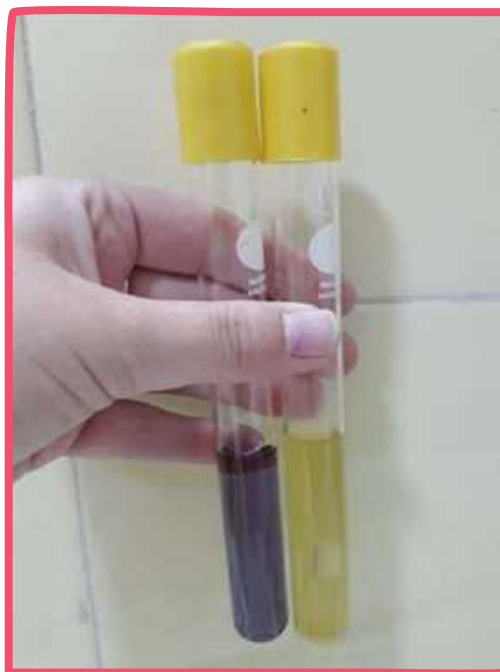


Figura 6.4: Posibles resultados de análisis presuntivos. Izquierda resultado negativo, derecha resultado positivo (presencia de gas mayor al 10% de la campana de Durham).

6.10.2 Análisis Confirmativo

Este análisis sirve para determinar la presencia o ausencia de bacterias fecales, específicamente *Escherichia coli*. Estas colonias son relativamente pequeñas con un brillo verde metálico con el centro negro (Figura 6.5). Las colonias de *Enterobacter aerogenes* (bacteria coliforme ambiental) son más grandes, mucosas, de color rosado y sin brillo.



Figura 6.5: Placa del análisis confirmativo con colonias de *E. coli*.

Materiales:

- Medio de cultivo Agar Eosina Azul de Metileno (Agar EAM o de Levine)
- Agua destilada
- Autoclave u olla a presión
- Erlenmeyer de 500 mL
- Ansa en anillo
- Cajas de Petri estériles
- Mechero Bunsen
- Estufa de cultivo
- Cabina de flujo laminar (opcional)

Procedimiento:

1. Preparar en el Erlenmeyer la cantidad necesaria de medio caldo de Mac Conkey según indicaciones del fabricante hasta que quede totalmente disuelto.
2. Autoclavar a 121 °C durante 15 minutos. Temperaturas más altas o duraciones más largas son perjudiciales al medio.
3. Plaquear según las indicaciones del ítem 5.8.1.
4. Rotular las cajas con tipo de medio y nombre de muestra.
5. Por cada tubo con resultado positivo del análisis presuntivo, tomar material con un ansa en anillo y sembrar en estrías por agotamiento en cajas Medio de cultivo Agar Eosina Azul de Metileno (Agar EAM o de Levine).
6. Incubar en estufa de cultivo las cajas en posición invertida de 24 a 48 horas a 37 °C.
7. Observar el desarrollo y registrar el resultado.

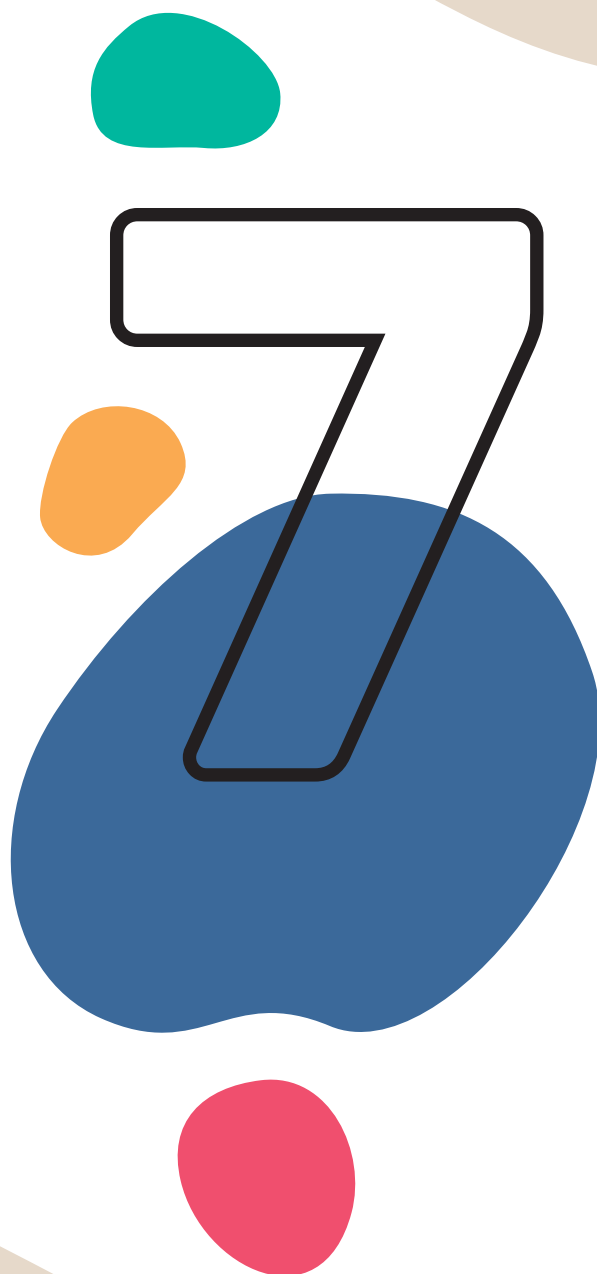
MICROSCOPIA PARA LABORATORIOS CERVECEROS

MICROSCOPIO ÓPTICO

RECOMENDACIONES PARA EL USO DEL
MICROSCOPIO ÓPTICO

USO DEL MICROSCOPIO

OBSERVACIÓN DE MICROORGANISMOS



CAPÍTULO 7: MICROSCOPIA PARA LABORATORIOS CERVECEROS

Caramuti, Valeria Eugenia; Ruiz Espindola, Milton; Gallace, María Eugenia y Dalmasso, Lucas Pablo

El microscopio es fundamental en cualquier laboratorio de microbiología para observar microorganismos, tanto de forma directa como a través de coloraciones. Esta herramienta es sumamente útil en un laboratorio cervecero ya que permite realizar recuento de levaduras y determinar su viabilidad de manera rápida y sencilla. En la primera parte de este capítulo se abordan las características generales de un microscopio óptico y su funcionamiento. En la segunda parte, se explican técnicas microbiológicas básicas para realizar tinciones y recuento de células a través del uso de una Cámara de Neubauer.

7.1 MICROSCOPIO ÓPTICO

Un microscopio óptico de luz transmitida consiste básicamente en un tubo con lentes de aumento en ambos extremos. Permite visualizar estructuras pequeñas, cuyas dimensiones son inferiores al poder de resolución del ojo humano. La luz es emitida desde abajo, por lo que los objetos a observar deben ser lo suficientemente transparentes para formar las imágenes. Un microscopio óptico cuenta con elementos mecánicos, elementos ópticos y un sistema de iluminación (Figura 7.1 y 7.2) que permiten la amplificación (aumento) y el poder de resolución.

7.1.1 Elementos mecánicos

En la Figura 7.1 se puede observar un microscopio y las distintas partes del mismo. La parte mecánica consta del pie, la columna o brazo, la platina, el tubo y los tornillos macrométrico y micrométrico. El pie (Figura 7.1, A1) se encuentra en la base, suele tener forma de herradura o “T” y en él descansa el resto del microscopio. La columna o brazo (Figura 7.1, A2), ubicada sobre el pie, sirve de soporte a los accesorios y debe tomarse de la misma cuando se desea trasladar el microscopio, aunque de ser posible no deben transportarse para evitar deterioro y rupturas.

La platina (A3), ubicada en la parte media, de forma cuadrada o rectangular, soporta el preparado y presenta un orificio en el centro que permite el paso de la luz; una pinza de sujeción (A4) para el preparado y sobrepuesta a ella un sistema mecánico que permite mover el mismo a voluntad en dos direcciones (llamadas Norte-Sur y Este-Oeste), mediante el movimiento de tornillos ortogonales (A5) ubicados sobre la platina o pendientes de ella. El tubo (A6) sostiene al sistema óptico, en la parte superior se ubican las lentes oculares (B11) que pueden ser una, monocular, o dos en los microscopios binoculares. En su extremo inferior se ubica el revólver (A7), una placa giratoria que sostiene las lentes objetivos (B10), de distintos aumentos, que pueden cambiarse al girar el revólver. Los tornillos macrométrico (A8) y micrométrico (A9) se utilizan para enfocar el material a observar, el primero efectúa un ajuste rápido y grosero, y el segundo un ajuste lento y preciso.

7.1.2 Elementos ópticos

Los elementos ópticos son los objetivos, las lentes oculares y el condensador. Cada objetivo consiste en un conjunto de lentes que permiten un determinado aumento. En los microscopios modernos es común que los objetivos sean parafocales, es decir, cuando se encuentra enfocado uno de ellos, al girar el revólver y cambiar por otro objetivo, éste resulta prácticamente enfocado, siendo suficiente sólo una ligera corrección con el micrométrico para lograr el enfoque perfecto. Existen dos tipos de objetivos, los secos y los de inmersión y se diferencian entre sí en función del medio situado entre la muestra y la lente del objetivo. En los objetivos secos, no hay ningún medio entre la muestra y el objetivo solo aire. Los objetivos de inmersión, en cambio, están diseñados para observar la muestra a través de aceite de inmersión.

Los oculares son un sistema de lentes que amplía la imagen producida en el objetivo. Los oculares más habituales son los de 6X y 10X, cuya denominación está grabada en el lateral de cada ocular, y determinan el aumento primario. El aumento total se obtiene multiplicando el aumento del ocular por el aumento del objetivo, e indica cuántas veces está amplificada la imagen que se obtiene del material examinado. Por ejemplo si un microscopio posee un ocular de 10X y se está observando con el objetivo de 40 X, el aumento total es 400X, es decir amplifica la imagen 400 veces.

El condensador (Figura 7.2, B12) está constituido por una lente que concentra los rayos y proporciona un cono de luz adecuado en tamaño y naturaleza, para obtener resultados óptimos en la observación. El condensador presenta un tornillo (Figura 7.2, B13) que permite el desplazamiento vertical (subir y bajar) según las necesidades del observador. Además, posee un diafragma semejante al de una cámara fotográfica que deja penetrar sólo los rayos útiles y elimina los laterales que generalmente molestan. La apertura y cierre del diafragma permite modificar el brillo y contraste de la muestra. El diafragma también debe ajustarse al objetivo seleccionado, los de menor aumento necesitan menor cantidad de luz, y se recomienda cerrar el diafragma, en cambio, los de mayor aumento necesitan más luz, por lo tanto el diafragma se debe abrir.

7.1.3 Sistema de iluminación

El sistema de iluminación del microscopio consta de una fuente de luz y dos perrillas, una de encendido y otra que regula la intensidad de la luz (Figura 7.2, C14, C15 y C16). Existen básicamente dos tipos de fuentes de luz, la bombilla incandescente y los emisores LED. Los emisores LED brindan mejor calidad de luz y su durabilidad es mayor.

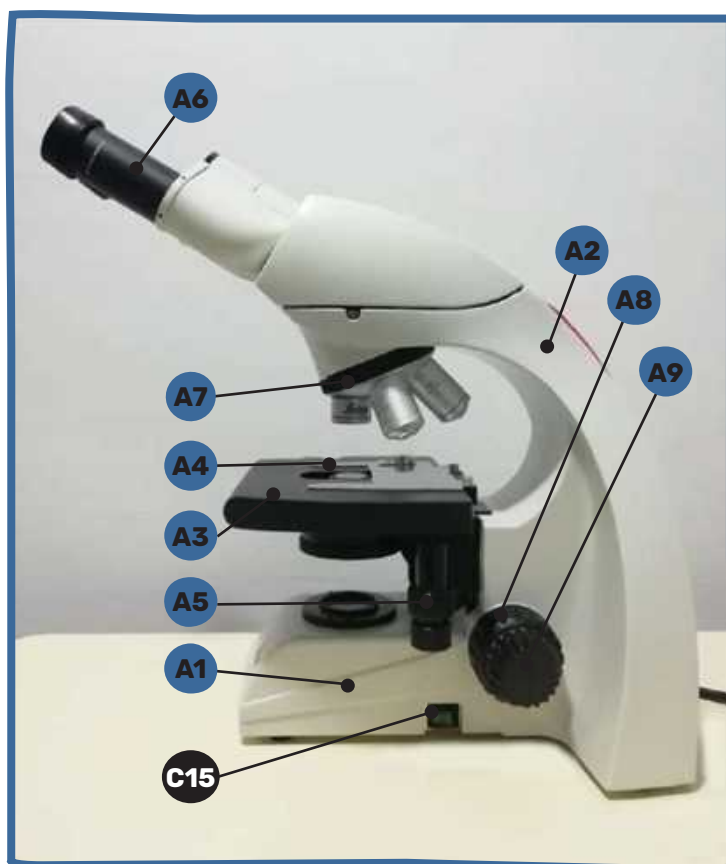


Figura 7.1: microscopio vista lado derecho. Elementos mecánicos (A): pie (A1), brazo (A2), platina (A3), pinza de sujeción (A4), tornillos ortogonales (A5), tubo (A6), revólver (A7), tornillo macrométrico (A8), tornillo micrométrico (A9). Sistema de iluminación (C): perilla de encendido (C15).

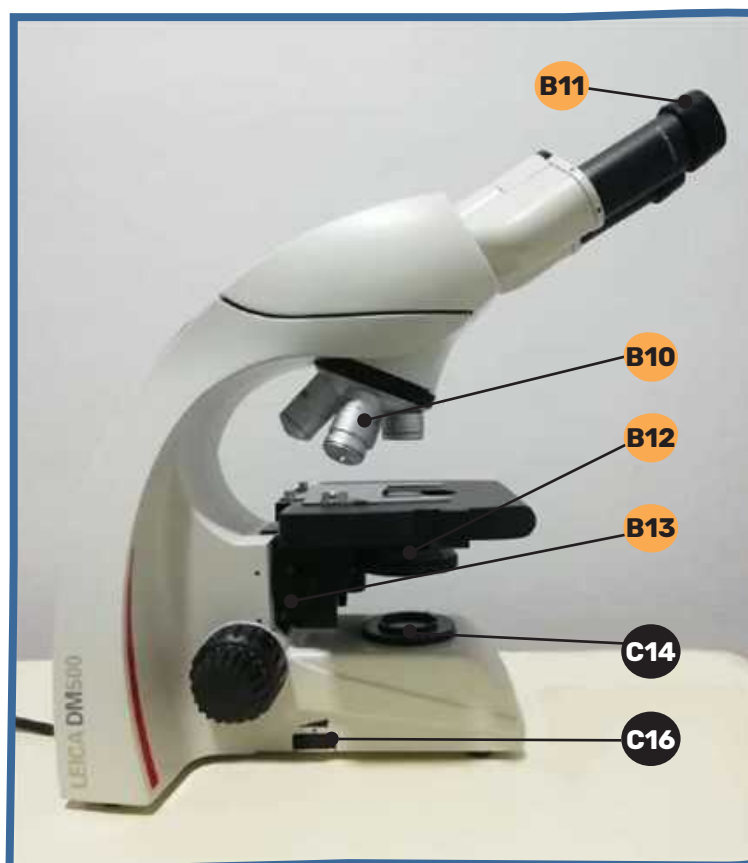


Figura 7.2: microscopio vista lado izquierdo. Elementos ópticos (B): objetivos (B10), lentes oculares (B11), condensador (B12), tornillo del condensador (B13). Sistema de iluminación (C): fuente de luz (C14), perilla regulación de intensidad (C16).

7.2 RECOMENDACIONES PARA EL USO DEL MICROSCOPIO ÓPTICO

1. Las observaciones con objetivos secos comienzan con el de menor aumento. Esto le dará una visión integral del preparado y le permitirá seleccionar las mejores áreas o las de especial interés, que luego observará con mayores aumentos.
2. La iluminación debe ser homogénea y de buena intensidad, pero no excesiva y deberá modificarla de acuerdo con el objetivo que utilizará.
3. Nunca acerque el objetivo al preparado si no está mirando por el costado del microscopio, así evitará la destrucción de muestras y lentes.
4. Siempre que haga una observación, ajuste el enfoque con el tornillo micrométrico, aun cuando ya haya sido enfocado por otra persona previamente (es usual que existan diferencias de enfoque entre un observador y otro).
5. El microscopio óptico otorga imágenes invertidas del objeto, por lo tanto, el movimiento que realice de la platina será inverso al corrimiento de la imagen.
6. Los portaobjetos y cubreobjetos deben estar siempre limpios y secos.

7.3 USO DEL MICROSCOPIO

A continuación se detallan los lineamientos generales para la observación en microscopio con objetivos secos:

1. Separar completamente la platina del objetivo mediante el tornillo macrométrico.

2. Colocar el preparado microscópico (portaobjeto) en la platina y ajustar con la pinza de sujeción.
3. Colocar el objetivo de menor aumento (de rastreo), generalmente es 4X.
4. Encender el microscopio.
5. Utilizar los tornillos ortogonales para centrar la zona a observar del portaobjeto en línea con el objetivo.
6. Observar el preparado por el costado del microscopio y levantar la platina cuidadosamente con el tornillo macrométrico hasta hacer tope, o bien hasta que la lente del objetivo se encuentre más o menos a 1 mm de la superficie del portaobjeto.
7. Observar por los oculares y enfocar hasta que la imagen sea nítida con ayuda de los tornillos macro y micrométrico. Buscar el mejor lugar de observación (bordes) y ajustar la intensidad de la iluminación, la apertura del diafragma y la altura del condensador.
8. Cambiar al objetivo mayor siguiente y volver a enfocar (solo utilizar el micrométrico). Repetir la operación hasta llegara enfocar con el objetivo de 40X o 60X (según modelo de microscopio).

7.3.1 Técnica de inmersión

Esta técnica se utiliza cuando se desea observar partículas muy pequeñas o células de bacterias. El objetivo de inmersión, como su nombre lo indica, necesita emplear aceite de inmersión entre el objetivo y la muestra, y tiene un aumento de 95 o 100X (en el lateral indica *oil*). La ventaja de utilizar los objetivos de inmersión es que, la luz que llega al objetivo no necesita atravesar el aire, lo que se traduce en un aumento en la calidad de imagen ya que reduce la refracción de la luz incidente. En consecuencia, los objetivos de inmersión son utilizados en aplicaciones donde se requiere un gran aumento y alta resolución.

Procedimiento:

1. Bajar la platina del microscopio con el tornillo macrométrico y colocar el portaobjeto.
2. Colocar sólo una gota de aceite de inmersión sobre el preparado (una pequeña gota es suficiente).
3. Poner el objetivo de inmersión en posición de observación, **recordar que es el único objetivo que se puede utilizar en esta técnica.**
4. Observar por fuera de los oculares del microscopio, subir la platina con el tornillo macrométrico hasta que el objetivo toque la gota de aceite. A partir de ese momento el objetivo estará prácticamente dentro de su distancia focal. Enfocar el preparado con movimientos suaves del tornillo micrométrico.
5. Terminada la observación, bajar la platina y limpiar el objetivo con papel de seda o de cigarrillo. **No debe utilizarse alcohol para limpiar las lentes, ya que deteriora el pegamento que las sostienen.**

Importante: evitar todo contacto entre el objetivo y el cubreobjetos, ya que distancia de trabajo que existe cuando se utilizan objetivos de 40X a 100X es muy reducida (aproximadamente 0,12 mm) puede suceder que la lente frontal tome contacto con el cubreobjetos con lo cual dicha lente puede rayarse o desplazarse hacia atrás. Actualmente los objetivos cuentan con un sistema protector retráctil situado en el interior del tubo del objetivo, sin embargo se debe tener precaución pues los microscopios antiguos o de menor tecnología no presentan este mecanismo de seguridad.

7.4 OBSERVACIÓN DE MICROORGANISMOS

Existen técnicas para observación de microorganismos vivos (preparados frescos) y otras llamadas frotis donde se fijan microorganismos al portaobjetos y se les realiza una tinción posterior. Las tinciones ofrecen información adicional a la simple observación de la morfología, ya que ponen de manifiesto, por ejemplo, características de la pared celular o la existencia de estructuras especiales, como esporas bacterianas.

7.4.1 Preparados frescos

La confección de preparados para observación en fresco es la técnica más simple de examinar microorganismos vivos, y consiste en suspenderlos en un medio líquido como agua.

Materiales:

- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Ansa en anillo
- Mechero de Bunsen
- Microscopio óptico

Procedimiento:

1. Esterilizar el ansa en anillo a calor directo de la llama del mechero.
2. Colocar una pequeña porción de muestra en el portaobjeto.
3. En muestras con alta concentración de microorganismos (crema de levaduras o bacterias de una colonia de una caja de Petri) se puede añadir una gota de agua con el ansa, previamente esterilizada, para diluir la suspensión. En muestras de cerveza no es necesario agregar agua.
4. Apoyar el lateral de un cubreobjeto en la superficie del portaobjeto de manera tal que al soltar el cubre, tape la muestra y así evitar burbujas en el medio líquido.
5. Observar al microscopio con los objetivos secos (10X a 60X). Este es un preparado temporal, ya que la muestra se evapora en poco tiempo.
6. Una vez finalizada la observación del preparado microbiológico, desechar el portaobjeto de manera segura. Resulta práctico disponer de una botella plástica de boca ancha para depositar transitoriamente los portaobjetos. Una vez llena, cerrar la botella y descartar.

7.4.2 Preparación de frotis

El objetivo de preparar un frotis es fijar los microorganismos en la superficie de un portaobjeto para posteriormente realizar una coloración (simple o compuesta).

Materiales:

- Ansa en anillo
- Portaobjetos
- Broche o pinza de madera
- Mechero Bunsen

Procedimiento:

1. Extendido: limpiar un portaobjeto y desengrasarlo con alcohol, luego esparcir la muestra sobre un portaobjeto. Si se utiliza crema de levadura colocar una pequeña por-

ción con un ansa estéril y agregar una gota de agua. Disgregar el material con un ansa en anillo y esparcir en una fina capa sobre el vidrio (si la suspensión es muy concentrada resultará en preparados de difícil observación).

2. Secado: con ayuda de un broche de madera, tomar el portaobjeto y agitar suavemente en la columna de aire caliente que genera la llama del mechero (evitar el contacto directo con la llama y la ebullición del agua del frotis).

3. Fijado: Con ayuda de un broche de madera, pasar rápidamente el portaobjeto tres veces por la llama del mechero con la muestra hacia arriba. El portaobjeto debe notarse caliente, pero no debe quemar cuando se coloca en la parte posterior de la mano. Este procedimiento mata y adhiere los microorganismos al portaobjeto, si no se realiza correctamente las células se lavan y se pierde la tinción.

7.4.3 Coloración simple con Azul de Metileno

La coloración simple utiliza un solo colorante, en este caso el azul de metileno, que facilita la observación de bacterias a través del microscopio. El azul de metileno actúa rápidamente sobre todas las células bacterianas y no produce un color tan intenso que oscurezca los detalles celulares. Esta técnica utiliza solución de azul de metileno a una concentración del 1%, mucho mayor a la que se utiliza para determinar viabilidad de levaduras. Importante: Se deben rotular adecuadamente ambas soluciones para evitar confusiones.

Materiales:

- Azul de Metileno
- Matraz aforado de 50 mL
- Balanza
- Cuchara/espátula para laboratorio
- Frasco de vidrio color ámbar de 70 mL con tapa
- Píseta con agua destilada
- Materiales necesarios para realizar un frotis
- Soporte para tinciones
- Recipiente plástico
- Aceite de inmersión
- Microscopio óptico con aumento 1000X

Procedimiento para preparar solución de azul de metileno para coloración (1%):

1. Colocar 0,5 g de Azul de Metileno en un matraz aforado de 50 mL y agregar aproximadamente 25 mL de agua destilada.
2. Agitar hasta que el azul de metileno esté completamente disuelto.
3. Agregar agua destilada hasta llegar al nivel del cuello del matraz, con ayuda de una píseta completar los últimos centímetros hasta llegar al nivel de aforo.
4. Trasvasar al frasco de vidrio color ámbar.

Procedimiento para la coloración con Azul de Metileno:

1. Tomar una muestra del material a testear y realizar un frotis (por ejemplo una colonia bacteriana desarrollada en una caja de Petri).
2. Colocar el frotis sobre un soporte para tinciones y por debajo un recipiente para evitar teñir la piletta del laboratorio (Figura 7.3).
3. Cubrir el frotis con solución de Azul de Metileno y dejar actuar por 1 minuto.

4. Lavar suavemente con agua corriente con la ayuda de una piseta.
5. Secar el extendido con la corriente de aire caliente del mechero (evitar el contacto directo con la llama, una temperatura excesiva arruinará el preparado).
6. Observar con microscopio óptico a 400X. Luego cubrir el frotis con una gota de aceite de inmersión y observar con aumento 1000X.
7. Resultados: registrar presencia o ausencia de microorganismos. En caso de presencia, reconocer forma, tamaño y frecuencia con la que se observa en el preparado.



Figura 7.3: Portaobjetos en un soporte para tinciones sobre un recipiente plástico.

7.4.4 Coloración de Gram

Las bacterias de acuerdo a la composición y estructura de las paredes se pueden clasificar en Gram positivas (G+) y Gram negativas (G-). Esta clasificación tiene importancia como una primera prueba para diferenciar grupos de microorganismos. Las G+, retienen el primer colorante (cristal violeta o violeta de Genciana) y se observan violetas. Las G-, no retienen el primer colorante cuando se les aplica un decolorante formado por una mezcla de alcoholes y se tiñen con el segundo colorante (safranina), por lo tanto se ven rosadas.

Materiales:

- Materiales necesarios para realizar un frotis
- Soporte para tinciones
- Recipiente plástico
- Broche o pinza de madera
- Kit para tinción de Gram (solución de violeta de genciana, lugol, decolorante para Gram y solución de safranina)
- Piseta con agua
- Aceite de inmersión
- Microscopio óptico con aumento 1000X

Procedimiento:

1. Realizar un frotis con la muestra deseada (ejemplo colonia desarrollada en una caja de Petri, muestra de cerveza o crema de levaduras) colocarlo sobre un soporte para tinciones en un recipiente para evitar teñir la piletta del laboratorio (Figura 7.3).
2. Cubrir el frotis con Violeta para Gram y dejar actuar 20 segundos.
3. Lavar suavemente con agua con la ayuda de una piseta durante 10 segundos.
4. Cubrir con Lugol y dejar actuar 30 segundos.
5. Lavar.

6. Cubrir con decolorante para Gram y dejar actuar 10 segundos.
 7. Lavar.
 8. Cubrir con Safranina para Gram y dejar actuar 20 segundos (Figura 7.4).
 9. Lavar.
 10. Secar el extendido con la corriente de aire caliente del mechero (evitar el contacto directo con la llama, una temperatura excesiva arruinará el preparado).
 11. Observar con microscopio óptico a 400X. Luego cubrir el frotis con una gota de aceite de inmersión y observar con aumento 1000X.
 12. Resultados: las bacterias Gram positivas se observan de color violáceo, y las bacterias Gram negativas se observan de color rosado-rojizo.
- NOTA:** para el lavado se puede utilizar agua destilada o corriente, en todos los casos se debe realizar suavemente durante 10 segundos con ayuda de una piseta.



Figura 7.4: Tinción de Gram.

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

Este método permite estimar la proporción de células vivas de levadura en muestras de diferente origen (cerveza en fermentación, crema de levadura o levadura propagada). En este caso está planteada una concentración de azul de metileno de 0,01% pero otros autores como Libkind Frati (2018) indican que ese valor es de referencia y que han obtenido mejores resultados con una solución más diluida (0,001%). Esta técnica es precisa para muestras de levadura con alta viabilidad, por lo que no es recomendable para muestras almacenadas por mucho tiempo.

Materiales:

- Azul de metileno
- Matraz de 1000 mL
- Balanza
- Cuchara/espátula de laboratorio
- Frasco de vidrio color caramelo de 1000 mL con tapa
- Piseta con agua destilada
- Porta y cubreobjetos
- Micropipeta automática de volumen variable 100 – 1000 µL (P1000)
- Tips o puntas azules para micropipeta
- Tubos de ensayo

- Gradilla para tubos de ensayo
- Microtubos de 2 mL (tipo Eppendorf)
- Pipeta de Pasteur
- Microscopio óptico

Procedimiento para preparar solución de azul de metileno para viabilidad (0,01%):

1. Disolver 0,1 g de Azul de Metileno en un matraz aforado en 500 mL de agua destilada, agitar hasta que esté completamente disuelto.
2. Agregar agua destilada con ayuda de una piseta hasta llegar al nivel de aforo.
3. Trasvasar al frasco de vidrio color caramelo y almacenar en heladera por un lapso no mayor a 6 meses.

Procedimiento para determinar viabilidad de levaduras:

1. Mezclar en el microtubo 1 mL de la solución de azul de metileno para viabilidad con 1 mL de la muestra de levaduras o su dilución.
2. Colocar una gota de la solución anterior sobre un portaobjetos con una pipeta de Pasteur, cubrir con cubreobjetos y evitar que queden burbujas de aire entre ambos vidrios.
3. Observar al microscopio (aumento de 400X). La concentración debe ser entre 40 y 60 células por campo del microscopio. Si el número de células es mucho mayor, realizar diluciones de la muestra de levaduras para facilitar la visualización.
4. Examinar al menos 500 células. **IMPORTANTE:** no se deben considerar los brotes, es decir las células hijas que aún no se han separado, excepto si su tamaño es mayor a la mitad de la célula madre.
5. La viabilidad se calcula como el porcentaje de células no teñidas o de color azul claro (las células muertas aparecen de color azul oscuro) según la siguiente fórmula:

$\text{Viabilidad (\%)} = \frac{(\text{CT} - \text{CM})}{(\text{CT} * 100)}$	<p>donde:</p> <p>CT: Células totales contabilizadas</p> <p>CM: Células muertas</p>
--	--

7.4.6 Cámara de Neubauer

Una cámara de Neubauer (Figura 7.5) es un tipo especial de portaobjetos de uso habitual en medicina, biología y microbiología, permite realizar recuentos de esporas y células en un medio líquido. En el caso particular de microbiología cervecera, se lo utiliza para contar células de levadura de una muestra.

Esta cámara de recuento está adaptada al microscopio de campo claro, consiste en un portaobjetos que tiene dos zonas ligeramente deprimidas (hemicámaras) que permiten hacer dos recuentos simultáneos, en cuyo fondo se ha marcado una cuadrícula de dimensiones conocidas. La cámara se cubre con un cubreobjetos especial denominado cubrecámara (de mayor espesor que un cubreobjetos común) que se adhiere por los laterales humedecidos por acción de la tensión superficial.

El líquido con las células a contar se introduce por capilaridad entre la cámara y el cubrecámara, previa dilución. Se observa la retícula (cuadrícula) al microscopio con el aumento adecuado y se cuentan las células. A partir del número de células contadas y del volumen de líquido que admite la hemicámara, se calcula la concentración de células (CC) en la muestra líquida aplicada.

La retícula de la Cámara de Neubauer está compuesta por cuadros (recuadros, cuadrados) de tres tamaños diferentes: cuadros grandes, medianos y pequeños. Una Cámara tradicional posee 9 cuadros grandes (de 1 mm^2). El cuadro grande central se denomina área de recuento y es la zona donde se contabilizan las células de levadura. El área de recuento contiene 16 cuadros medianos y cada uno de ellos está subdividido en 16 cuadros pequeños. Existe una Cámara de Neubauer mejorada (Improved) a la que se le han realizado cambios en las líneas triples de división y en lugar de 16 cuadros medianos posee 25 (Figura 7.6).

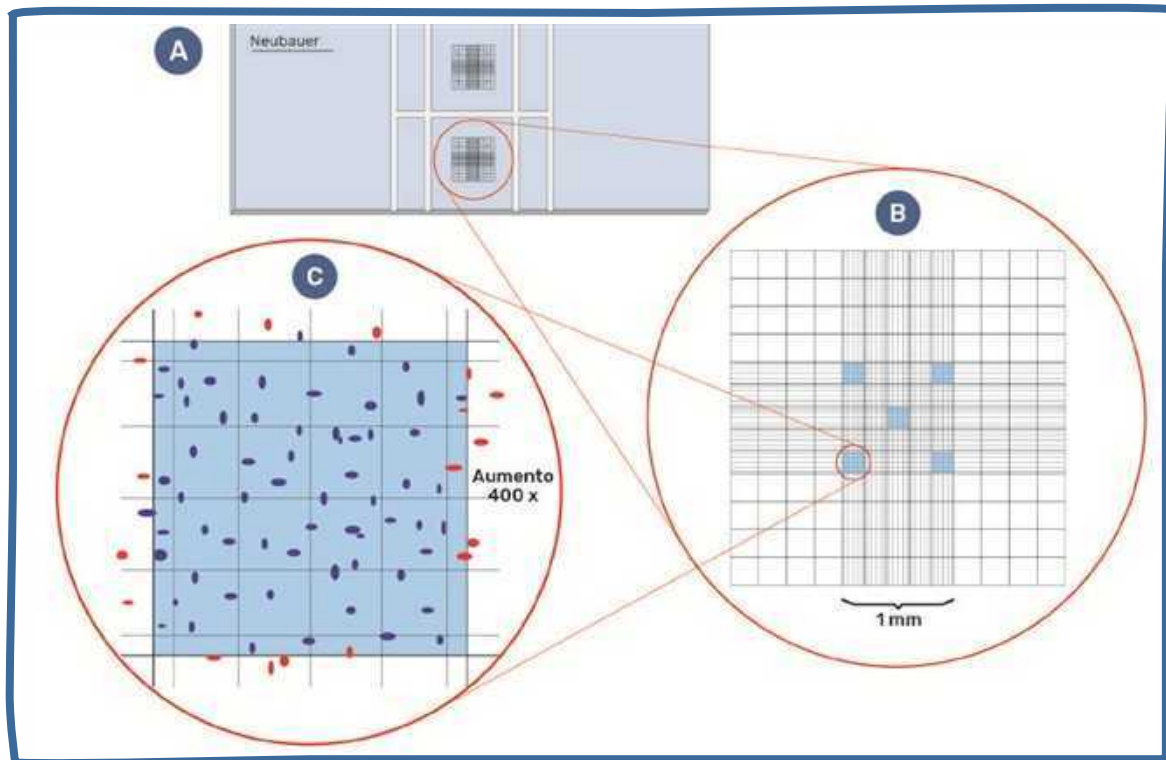


Figura 7.5: (A) Representación de una Cámara de Neubauer Improved. (B) Retícula de la cámara. (C) Aumento 400X cuadro mediano con presencia de células de levadura.

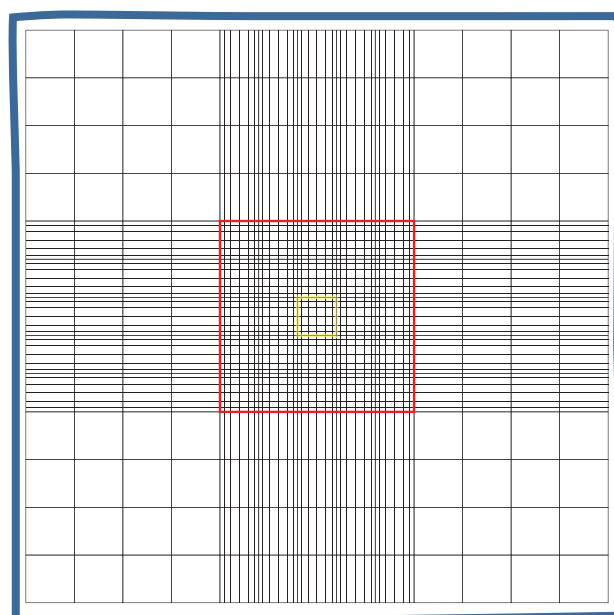


Figura 7.6: Retícula de Cámara de Neubauer Improved. En color rojo se delimita el área de recuento (cuadro grande), en color amarillo uno de los 25 cuadros medianos.

7.4.6.1 Recuento de levadura con Cámara de Neubauer

Uno de los métodos de conteo o recuento de células de levadura es a través del uso de un microscopio, una Cámara de Neubauer y algunos elementos básicos de laboratorio. Este método permite visualizar las células de levadura directamente y también a través de una tinción simple se puede determinar la viabilidad. Conociendo esta información, es posible estandarizar el inóculo de levadura en la elaboración de cerveza. A continuación se propone un método:

Materiales:

- Microscopio óptico
- Cámara de Neubauer *Improved*
- Cubrecámara
- Micropipeta automática de volumen variable 100 - 1000 μL (P1000)
- *Tips* o puntas azules para micropipeta
- Recipiente limpio
- Tubos de ensayo
- Gradilla para tubos de ensayo
- Microtubos de 2 mL (tipo Eppendorf)
- Agua destilada o mosto de cerveza 1030 kg/m^3

Toma de muestra:

1. Antes de tomar la muestra se debe homogenizar la biomasa para que la concentración de levadura sea uniforme. Es importante que la muestra sea representativa para obtener resultados.
2. La muestra se debe tomar de manera aséptica para evitar la contaminación de la fuente. Rociar la válvula o tomamuestra con alcohol 70% o ácido peracético y dejar actuar un minuto.
3. Utilizar un recipiente para tomar una pequeña muestra de la fuente y volver a rociar la válvula o tomamuestra. El recipiente para tomar la muestra puede ser un simple vaso bien limpio ya que no se utilizará para elaborar cerveza.

Dilución de la muestra:

1. El conteo de células en una cámara de Neubauer requiere dilución previa de la muestra según se indica en ítem 5.8.2. Es importante agitar la muestra para eliminar todo el gas y lograr una correcta homogenización. Además, el agua destilada de los tubos de ensayo se puede reemplazar por mosto, esto ayuda a separar las células y tener una fácil visualización. En la tabla 7.1 se indican diluciones para obtener la concentración de células adecuada que sirven como referencia.
2. También se puede realizar el análisis de viabilidad, para esto se deberá agregar partes iguales de solución de azul de metileno para viabilidad y de la dilución adecuada de muestra (Ver ítem 7.4.5). Por ejemplo: si se desea realizar un recuento y viabilidad de levaduras con una dilución de 1:200 se debe obtener una dilución de la muestra a 1:100.
3. Tomar un microtubo colocar 1 mL de solución de azul de metileno y 1 mL de la dilución 1:100 de la muestra de levaduras. Homogeneizar con vortex antes de cada transferencia, de esta manera se obtiene una dilución final de 1:200 que será utilizada para cargar la Cámara de Neubauer.

Tabla 7.1: diluciones recomendadas según tipo de muestra. Carga de la Cámara de Neubauer:

TIPO DE MUESTRA	DILUCIÓN
Cerveza	-
Cerveza en fermentación	1:10 a 1:100
Crema de levadura	1:200 a 1:1000

4. Lavar la cámara y el cubrecámara con alcohol 96%. Si es necesario, lavar con agua destilada con una gota de detergente y secar con papel absorbente suave sin frotar.

5. Acoplar el cubrecámara a presión con los bordes humedecidos hasta que se formen patrones de anillos concéntricos con los colores del arcoíris llamados anillos de Newton. El cubrecámara deberá recubrir las dos hemicámaras (zonas de recuento).

6. Tomar una porción de la dilución correspondiente con pipeta Pasteur. Apoyar la punta de la pipeta en el borde del cubrecámara, en el extremo de una de las zonas de recuento, el líquido debe ingresar en la hemicámara por capilaridad desde el lateral a la zona de recuento.

7. **IMPORTANTE:** En caso de exceso de líquido, presencia de burbujas o si se movió el cubrecámara, repetir el proceso de carga de la Cámara de Neubauer nuevamente.

Recuento mediante microscopio óptico:

1. Enfocar el área de recuento según las indicaciones del ítem 7.3.

2. Contar sólo cinco cuadros medianos cuando la distribución de las células en el área de recuento (cuadro grande) sea uniforme; cuando la distribución no es uniforme hacer el recuento de todos los cuadros medianos (16 cuadros para el caso del modelo tradicional o 25 cuadros medianos para la cámara mejorada).

3. Para realizar el conteo localizar el primer cuadro mediano y contar según se describe seguidamente (**IMPORTANTE:** se debe preparar una nueva muestra con una dilución acorde si la cantidad de células no se encuentra en el rango de 20 a 100 células por cuadro mediano). Pocas células pueden no ser representativas de la muestra original y por otra parte demasiadas células pueden ser difíciles de contar y se puede incurrir en errores de conteo. La cantidad óptima es de 40 o 50 células por cuadro mediano aproximadamente. De todas formas, si la cantidad de células es de 20 a 100 por cuadro mediano, contar los restantes 4 cuadrados medianos (Figura 7.7).

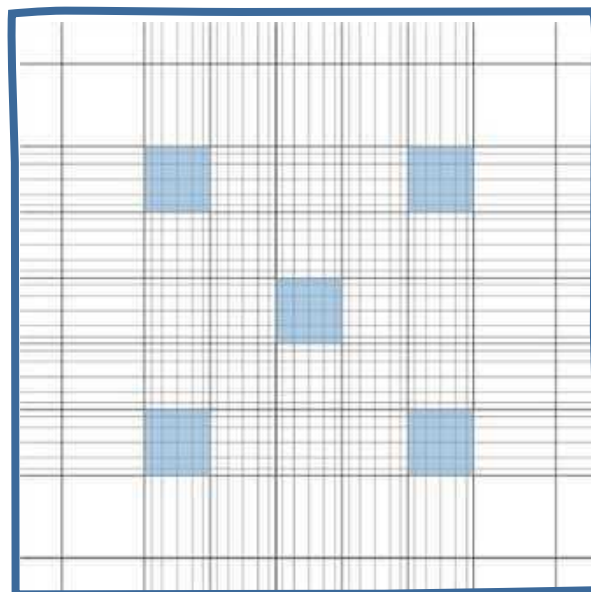


Figura 7.7: Representación del área de recuento de una Cámara de Neubauer Improved, en color celeste se indica los cinco cuadros medianos que se deben contar.

Consideraciones generales para el recuento:

- Las células hijas se contabilizan sólo si al menos alcanzan la mitad del tamaño que la célula madre.
- No se deben contar las levaduras que tocan las líneas inferior y derecha que delimitan el cuadro mediano (línea central de la triple línea). En la Figura 7.5 (C) se puede observar un ejemplo de recuento donde se contabilizan las células representadas en azul y no se contabilizan las células representadas en rojo.
- Cuando se realice simultáneamente la prueba de viabilidad de levaduras discriminar entre células vivas y muertas y calcular el porcentaje de células vivas (se considera célula viva o viable cuando se visualiza incolora o celeste/azul claro).

Cálculo de concentración de células:

1. Calcular las células totales contenidas en el cuadro grande central (CTCC). Si se contabilizaron todos los cuadros medianos (16 o 25 cuadros) realizar la suma para obtener el total. Cuando el recuento se haya realizado en cinco cuadros medianos, se deben sumar entre sí y multiplicarlo por 5 (para el caso de una Cámara de Neubauer mejorada).
2. Calcular el número de células por mL de muestra. Se debe multiplicar la cantidad total de células contenidas en el cuadro grande por 10.000, ya que el volumen de líquido contenido en la Cámara de Neubauer es de 1/10.000 mL.
3. En caso de haber realizado alguna dilución, el número de células por mL debe multiplicarse por el factor de dilución como indica la fórmula:

$$CC = CTCC * 10.000 * FD$$

donde:

CC (cél/mL): Concentración de células de levadura de la muestra.

CTCC: Células totales contenidas en el cuadro grande central.

FD: factor de dilución.

7.4.6.2 Cantidad de levadura necesaria para inocular un fermentador

Para realizar este cálculo son necesarios ciertos datos de la levadura como viabilidad (%), concentración de células en la muestra (cél/mL) y la tasa de inoculación (Ver ítem 4.4). En la práctica cotidiana resulta más fácil trabajar con unidades de masa, es decir transformar mililitros (mL) y litros (L) a gramos (g) y kilogramos (kg) respectivamente. En el caso de las cremas de levadura de 1×10^9 células/mL una aproximación razonable es $1 \text{ L} = 1 \text{ kg}$.

La siguiente fórmula se sugiere para calcular el volumen de crema de levaduras a inocular en un fermentador:

$VC = \frac{NC}{CC * V * 0,01}$	<p>donde:</p> <p>VC: Volumen de crema de levaduras a inocular (mL)</p> <p>CC: Concentración de células de levaduras de la muestra (cél/mL)</p> <p>V: Viabilidad de la muestra de levaduras (%)</p> <p>NC: Células totales (Ver ítem 4.4)</p>
---------------------------------	--

Ejemplo:

Para inocular 1200 L de mosto de 11 °P con levadura Ale (1.200.000 mL), cuya tasa de inoculación es de 0,75 millones de células de levadura por mililitro de mosto por grado plato (Ver ítem 4.4) donde la crema de levadura posee una concentración de 1.10^9 (cél/mL) y una viabilidad del 92% el volumen de crema de levaduras a inocular será:

<p>Número de células de levadura a inocular = $0,75 \cdot 10^6 \text{ células} * 1.200.000 \text{ mL} * 11 \text{ °P}$</p>

<p>Número de células de levadura a inocular = 9 900 000 000 000</p>

Como es un número extremadamente grande, se puede expresar con notación científica (Ver anexo 2):

<p>Número de células de levadura a inocular = $9,9 \cdot 10^{12}$</p>
--

Entonces, el volumen de crema de levaduras a inocular es:

$VC = \frac{NC}{CC * V * 0,01}$ $VC = \frac{9,9 \cdot 10^{12} \text{ (cél.)}}{1.10^9 \text{ (cél/mL)} * 92 \text{ (\%)} * 0,01}$ $VC = 10.761 \text{ mL} = 10,76 \text{ L}$	<p>donde:</p> <p>VC: Volumen de crema de levaduras a inocular (mL)</p> <p>CC: Concentración de células de levaduras de la muestra (cél/mL)</p> <p>V: Viabilidad de la muestra de levaduras (%)</p> <p>NC: Células totales (Ver ítem 4.4)</p>
---	--

Por lo tanto, para este caso hay que inocular 10,76 L de crema de levadura (10,76 kg).

7.4.6.3 Software ImageJ

ImageJ es un programa de procesamiento de imágenes digitales (software libre) desarrollado en el National Institutes of Health. Este programa dispone de un plug-in que detecta automáticamente el número de células a partir de una fotografía tomada con un microscopio y permite realizar el conteo de manera rápida y sencilla.

7.4.6.4 Aplicación para celulares *microBrew.AR*

MicroBrew.AR es una aplicación desarrollada por InnQube a pedido del Instituto Andino Patagónico de Tecnologías Biológicas y Geoambientales (IPATEC) el laboratorio de Microbiología Aplicada, Biotecnología y Bioinformática de Levaduras (Mabblev), específicamente diseñada para las necesidades de las cervecerías, posee una interfase amigable e intuitiva que facilita los cálculos y análisis necesarios para optimizar la reutilización de las levaduras cerveceras. Es una aplicación muy completa y gratuita que se puede descargar desde cualquier buscador de aplicaciones.

SOLUCIÓN DE PROBLEMAS

DINÁMICA DE LA FERMENTACIÓN
ATENUACIÓN
FLOCULACIÓN
SABORES Y AROMAS
LEVADURA PARA REUTILIZACIÓN



CAPÍTULO 8: SOLUCIÓN DE PROBLEMAS

Dalmaso, Lucas Pablo

En este capítulo se plantean algunos de los problemas más comunes relacionados con la fermentación y sus posibles causas. También se proponen diferentes perspectivas para revertir la situación actual y evitar que vuelva a ocurrir en los siguientes lotes de producción. Es importante tener en claro que durante la producción de cerveza intervienen múltiples factores en cada etapa del proceso y que, el personal a cargo la elaboración debe entrenarse para evaluar y abordar los problemas desde una mirada integral. En general, ante la presencia de inconvenientes se debe ir desde lo más sencillo y fundamental (nivel macro) hasta cuestiones particulares, específicas y excepcionales de las reglas (nivel micro).

8.1 PROBLEMAS RELACIONADOS CON LA DINÁMICA DE LA FERMENTACIÓN

8.1.1 Retraso del inicio

En general, cuando se presume que la fermentación no ha comenzado, lo cual es poco común, en realidad se está frente a un retraso en el inicio de la fermentación (fase de latencia muy prolongada). Muchos cerveceros enfatizan en tener una fase de latencia muy corta, a menudo en detrimento del sabor de la cerveza, ya que éste proviene de la cantidad y tasa de crecimiento de levaduras apropiadas.

En cervezas Ale la fermentación comienza dentro de las primeras 12 hs, antes de ese tiempo no se puede diagnosticar que la fermentación no haya comenzado. Una vez pasado ese tiempo se debe indagar en las posibles causas del retraso.

Existen varias posibilidades para que la fermentación no comience, las más comunes tienen que ver con la salud de la levadura y la temperatura del mosto, sin embargo hay que asegurarse de que la persona a cargo de la inoculación en una distracción no haya olvidado realizar esa tarea.

En primer lugar, se debe inspeccionar el fermentador en busca de signos de kraeusen (anillo de espuma sobre la superficie de la cerveza) esto sería indicio de la fermentación ocurrir y que la producción de CO₂ es todavía escasa para ser detectada. Muchas veces, simplemente no se observa burbujeo en el *airlock* aunque la fermentación tiene su curso normal, ya que puede haber pérdidas de CO₂ por juntas y roscas del fermentador. En ese caso se debe tomar una muestra y medir la densidad específica y el pH, y a partir de esos datos determinar qué ocurre.

- **Caso 1:** densidad y pH igual después de 12-24 horas (para cepas Ale) y temperatura dentro del rango óptimo. Se debe inocular levadura adicional, lo ideal sería levadura activa (de otro lote de cerveza) o levaduras almacenadas en frío (si es la misma levadura que se utilizó para inocular el mosto en problemas, verificar la viabilidad y descartar en caso de que sea baja). La tercera opción es inocular con levadura seca y luego oxigenar nuevamente el mosto. La oxidación y el envejecimiento en este punto no es un problema ya que el inóculo nuevo utilizará la segunda dosis de oxígeno, aunque es probable que el oxígeno de la primera adición no haya sido utilizado y cause daños por oxidación del mosto.
- **Caso 2:** durante las primeras 12 horas la densidad permanece igual que en el momento de inoculación, pero el pH disminuye de 0,5 a 0,8 puntos. Es probable que la fermentación esté en curso, aunque no haya ningún signo visible, por ello se deben revisar los procedimientos para determinar las tasas de inoculación, niveles de oxígeno y la viabilidad de la levadura.
- **Caso 3:** la densidad es baja, pero diferente a los niveles normales de atenuación, y sin actividad apreciable. Puede ser una fermentación incompleta, ver ítem 8.2 de este capítulo.

Una vez que inició la fermentación hay que determinar donde ocurrió el error, para ello se deberán evaluar los siguientes puntos:

1. Tiempo:

Una fase de latencia de 12 horas para una cerveza Ale y 24 – 36 horas para una Lager es normal. Una reducción en la temperatura del mosto disminuye el metabolismo de la levadura y produce una fase de latencia más prolongada.

2. Levadura:

- Porcentaje de viabilidad
- Origen de la levadura
- Problemas en el transporte, almacenaje y manejo antes de inocular
- Posibilidad de que se congelaran los paquetes de levadura seca o la crema de levaduras almacenadas

3. Mosto:

- Temperatura de mosto muy altas (más de 40 °C)
- Congelación del mosto o temperaturas por debajo de la temperatura óptima para la cepa de levadura
- En una cerveza Lager al estar más frío el mosto (fermentación a menor temperatura), más dióxido de carbono se disolverá antes de que la cerveza alcance el punto de saturación y las burbujas comiencen a formarse y asciendan a la superficie.
- Maltas almacenadas en condiciones de alta humedad y temperatura pueden desarrollar hongos que sintetizan sustancias tóxicas (micotoxinas) para los organismos vivos.
- Niveles altos de contaminación que pueden dañar o inhibir el crecimiento de las levaduras.

8.1.2 La fermentación no termina

Cuando la fermentación parece no terminar se debe medir la densidad y compararla con la prueba de fermentación forzada (ver ítem 6.4). Esto puede presentar tres escenarios diferentes:

- **Caso 1:** la densidad coincide con la prueba de fermentación forzada o valor cercano. Este caso puede ser una mala interpretación del proceso de fermentación, es decir, aunque del *airlock* se desprenda CO₂ no asegura que la cerveza fermente, ya que el CO₂ puede desprenderse por aumento de la temperatura cuando se supera el punto de saturación. También cualquier tipo de movimiento, vibración y agitación puede hacer que una solución saturada empiece a expulsar gas.
- **Caso 2:** densidad de la cerveza menor que la prueba de fermentación forzada. Es causada posiblemente por contaminación bacteriana y/o de levadura ambiental. Se recomienda realizar el análisis sensorial, recuento de microorganismos contaminantes y descartar el lote de cerveza.
- **Caso 3:** densidad más alta que la prueba de fermentación forzada. Indica que la fermentación puede seguir su progreso lentamente. La prueba de fermentación forzada es necesaria para asegurar que la cerveza ha alcanzado la densidad final adecuada para ese mosto, aunque las recetas sugieran un valor de densidad final, éste depende del proceso de producción del mosto. En caso que haya levadura activa en suspensión se debe elevar la temperatura de fermentación, por lo menos tres grados centígrados, que permita aumentar la actividad de las levaduras. Además, se podría adicionar levaduras de otro fermentador en el pico de actividad de fermentativa (Ver ítem 8.3).

8.2 PROBLEMAS RELACIONADOS CON LA ATENUACIÓN

La prueba de fermentación forzada (Ver ítem 6.4) brinda el valor máximo de atenuación, en consecuencia permite conocer el valor mínimo de densidad que puede alcanzar un lote de cerveza. Por ejemplo si una prueba de fermentación forzada muestra que la cerveza solo se atenuará hasta 1015 kg/m^3 , entonces es ilógico esperar que caiga a 1010 kg/m^3 . Sin embargo si ese mismo lote disminuye por debajo de 1015 kg/m^3 , permite aseverar la existencia de algún tipo de contaminación, por lo que se deberán extremar el cuidado de la limpieza y sanitización para encontrar el foco de infección y eliminarlo. Por el contrario, es común que la fermentación del lote principal sea uno o dos puntos mayor que la densidad final mostrada por la prueba de fermentación forzada. Existen casos en que la cerveza no alcanza la densidad final esperada, probablemente por algún problema en la fermentación, se deberán considerar entonces ciertos factores:

- 1) La temperatura de fermentación fue demasiado baja y la levadura no estaba lo suficientemente activa para completar la fermentación. Es importante evitar los cambios de temperatura, especialmente al principio durante la fase de latencia y finalización de la fermentación, ya que las levaduras son muy sensibles a pequeños cambios de temperatura. La disminución en la velocidad de fermentación, producirá menos calor y, si la temperatura es demasiado baja, se detendrá o reducirá la velocidad repentinamente, lo que hará que sea muy difícil alcanzar la densidad final.
- 2) La sobreinoculación a través de los diferentes ciclos de re-utilización, también puede resultar en una baja atenuación. Generalmente, la fermentación iniciará rápidamente y terminará normalmente, pero las generaciones sucesivas comenzarán a exhibirse problemas de vitalidad. La viabilidad disminuye con el tiempo, y la población en general se vuelve lenta, desde la fermentación se producen pocas células nuevas (baja multiplicación = células envejecidas = baja viabilidad = baja atenuación).
- 3) La tasa de inoculación demasiado baja y existencia insuficiente de células para completar la fermentación. Se recomienda que ocurran entre tres y cuatro divisiones de levaduras durante la fermentación.
- 4) La mala salud de la levadura y la falta de nutrientes puede hacer que la fermentación se detenga antes de alcanzar la densidad final.
- 5) La reutilización de levaduras reiteradas veces y la cosecha muy temprana, puede ejercer presión selectiva sobre la población y causar subatenuación. Las levaduras que sedimentan primero son las menos atenuantes, por lo que si éstas se cosechan y a través de sucesivas reutilizaciones, se obtendrán cervezas menos atenuadas. Por el contrario, una cosecha de levadura muy tardía puede afectar negativamente la salud de la levadura y la atenuación de futuros lotes.
- 6) Deficiencia de oxígeno al inicio de la fermentación en cervezas de alta densidad pueden restringir el crecimiento y afectar la salud celular. Además, las cervezas de alta densidad podrían beneficiarse de una dosis adicional de oxígeno alrededor de las 12 horas de inoculadas.
- 7) La falta de oxígeno a través de las sucesivas reutilizaciones puede afectar la salud de la levadura, ya que no podrá sintetizar correctamente lípidos de su pared celular dificultando la reproducción y crecimiento.
- 8) Bajos niveles de FAN pueden provocar una fermentación lenta o incluso producir cervezas sub-atenuadas. Asegurar que las maltas aporten entre $150 - 200 \text{ mg/L}$ de FAN o adicionar nutrientes comerciales.

Algunas de las opciones para contrarrestar problemas de sub-atenuación pueden ser:

- Incrementar la temperatura para aumentar la actividad metabólica de las levaduras, es una de las mejores formas de ayudar a alcanzar la densidad final deseada.
- Mover la levadura inyectando cuidadosamente CO₂ a través del fondo del cono del fermentador, permite que la levadura entre en contacto nuevamente con la cerveza y podría ayudar a alcanzar la atenuación deseada.
- No se recomienda la adición extra de levadura ya que una cerveza parcialmente fermentada es un medio de cultivo poco amigable para la levadura, por la presencia de alcohol, baja concentración de oxígeno, e insuficiente cantidad de azúcares y nutrientes. En caso extremo, agregar levadura de otro fermentador que esté en su máxima de actividad y no oxigenar nuevamente el mosto/cerveza.
- La adición de enzimas podría ayudar si el problema radica en la composición de los azúcares del mosto, pero no corrige problemas de viabilidad y vitalidad de las levaduras.

8.3 PROBLEMAS RELACIONADOS CON LA FLOCULACIÓN

La levadura necesita una pequeña cantidad de calcio para que se produzca la floculación (50 partes por millón de calcio en el agua) por lo que resulta un elemento imprescindible. Se debe tener especial precaución cuando se utiliza un equipo de ósmosis inversa para el tratamiento del agua y en caso de ser necesario, se debe agregar calcio para evitar deficiencias.

Por otra parte, los cambios en la floculación se pueden deber a levaduras con deficiente salud y fermentaciones problemáticas. En particular, cuando se reutiliza la levadura por varias generaciones, puede existir un efecto en la presión de selección donde se propaguen las que más sedimentan o las que permanecen más tiempo en suspensión.

8.4 PROBLEMAS RELACIONADOS CON SABORES Y AROMAS

En capítulos anteriores se abordaron problemáticas que ocasionan sabores y aromas indeseables en la producción, en este apartado se ampliará la información en relación a este tema.

8.4.1 Diacetilo

El diacetilo es un producto normal de la fermentación, y algunas cepas de levadura producen más que otras. Sin embargo, la levadura metaboliza el diacetilo en un compuesto sin sabor durante la fermentación activa. Este compuesto es reconocido por su sabor similar a la manteca, pochoclo o *toffee*, y es uno de los *off-flavors* más comunes en las cervezas.

Existen varios factores que determinan la cantidad de diacetilo que permanece después de la fermentación:

- Una fermentación incompleta puede dejar altos niveles de diacetilo en la cerveza, por falta de tiempo de contacto suficiente entre la levadura y el mosto para absorber el diacetilo que se produjo durante la fermentación.
- Una temperatura más cálida al comienzo de la fermentación, mientras la levadura crece genera un mayor nivel de precursores de diacetilo. En caso que el proceso continúe con una baja temperatura de fermentación puede resultar en niveles altos de diacetilo. Levadura sana con el tiempo y temperatura adecuada al final de la fermentación da como resultado cerveza con niveles de diacetilo muy bajos.
- Algunas bacterias ácido lácticas producen diacetilo y pueden presentar problemas cuando el proceso de embotellado de cerveza no es correcto. La cerveza puede contaminarse y luego de algunas semanas desarrolla acidez y sabor a diacetilo.
- Deficiencias de FAN en el mosto pueden provocar cervezas con niveles altos de diacetilo.

8.4.2 Dimetil Sulfuro (DMS)

El DMS posee un sabor y un aroma que recuerda al de vegetales cocidos (choclo o apio hervido) y se puede percibir en concentraciones extremadamente bajas.

Todas las maltas contienen en su composición química S-Metil Metionina (SMM), el aminoácido responsable de generar DMS en cervezas. Las maltas más pálidas poseen concentraciones superiores.

Durante el macerado gran parte del SMM se convierte en DMS y en Dimetil sulfóxido (DMSO). El DMS es muy volátil y gran parte desaparece rápidamente durante el hervor del mosto (se debe mantener la olla destapada), se recomienda hervir el mosto por 90 minutos especialmente si el mosto proviene de malta 100% Pilsen.

El DMSO puede reducirse por acción de algunas cepas de levadura en la fermentación y formar DMS. Esto explica la presencia de DMS en cervezas que han tenido un buen hervor durante la cocción (Anness, 1979). Las levaduras Lager u otras fermentadas a bajas temperaturas tienden a producir más DMS, mientras que las fermentaciones Ale más vigorosas producen niveles más bajos.

Entre las soluciones para evitar el exceso de DMS se encuentran: elegir correctamente la malta (la concentración de precursores de DMS difiere entre marcas comerciales), disminuir el porcentaje de malta Pilsen. Además, el maíz como adjunto cervecero puede resaltar la percepción de DMS, por eso se recomienda hervir el mosto de manera vigorosa por más de 60 minutos y no cubrir la olla de hervor.

8.4.3 Acetaldehído

El acetaldehído es un paso intermedio en la producción de etanol, se encuentra en todas las cervezas y, puede contribuir positivamente en su sabor. Sin embargo la concentración excesiva se puede reconocer por el aroma y el sabor a manzana verde o sidra.

Existen varias razones para los altos niveles de acetaldehído en la cerveza terminada, algunas se detallan a continuación:

- Parámetros que fomentan una fermentación excesivamente rápida, como la sobre inoculación de levadura y la alta temperatura de fermentación.
- Cuando se interrumpe la fermentación o cuando la levadura flocula prematuramente.
- La conversión de etanol a vinagre por bacterias del ácido acético, particularmente del género *Acetobacter* sp., puede producir acetaldehído. En ese caso, el sabor y aroma a manzana verde va a estar acompañada de un evidente carácter a vinagre.
- La oxidación del etanol luego de la fermentación produce sabores a manzana verde.
- Para evitar acetaldehído en exceso se recomienda utilizar adecuada tasa de inoculación, control de temperatura de fermentación, respetar adecuadamente las fases de la fermentación, adecuada limpieza y desinfección, y evitar el contacto e incorporación de oxígeno a la cerveza.

8.4.4 Alcoholes superiores

La presencia de alcoholes superiores interviene en caracteres deseados en el *bouquet* de las cervezas y ese efecto positivo depende del tipo de alcohol superior y su concentración. Hirst y Richter (2016) indican que altas concentraciones de alcoholes superiores generan un fuerte sabor a solvente y punzante que crea una sensación de calentamiento en boca, mientras que niveles adecuados pueden incrementar la complejidad en ciertos estilos.

Los alcoholes superiores más influyentes en el *flavor* de las cervezas son el propanol, el isobutanol, el feniletanol, el alcohol amílico y el alcohol isoamílico. Este último, se en-

cuentra generalmente en mayor proporción y es el que más afecta la tomabilidad de la cerveza (*Drinkability*), dado que a concentraciones elevadas genera un intenso carácter a solvente (Olaniran, 2017).

Durante el proceso de producción de cerveza, las levaduras a partir del metabolismo de aminoácidos generan los alcoholes superiores. Tanto las levaduras como las condiciones de fermentación y la composición del mosto afectan el perfil de alcoholes superiores y sus concentraciones (Loviso y Libkind, 2018). En general, las levaduras tipo Lager proveen aromas y sabores más limpios, asociados a una baja producción de alcoholes superiores y ésteres comparados con levaduras de tipo Ale (Walther et al., 2014).

Los altos niveles de sacarosa en el mosto aumentan la producción de alcoholes superiores (He et al., 2014), mientras que el metabolismo de la maltosa disminuye la concentración de estos compuestos en comparación con fuentes de carbono más fácilmente asimilables, como glucosa y fructosa (Lei et al., 2016). Por esto se debe tener en consideración el tipo de azúcar agregado para aumentar la densidad inicial del mosto (Loviso y Libkind, 2018).

En mostos fermentados con levaduras de tipo Ale de densidad inicial 1075 kg/m^3 se observó un incremento en los niveles de alcoholes superiores respecto de mostos de densidad inicial menor (Saerens et al., 2008). La formación de alcoholes superiores es favorecida en presencia de oxígeno y ácidos grasos insaturados, estos estimulan el crecimiento de las levaduras y el metabolismo de aminoácidos. La tasa de inoculación también afecta la producción de alcoholes superiores, aunque diferentes autores han aportado resultados contradictorios al respecto, al parecer el impacto de la concentración de inóculo en el *flavor* depende también de la cepa de levadura, su estado fisiológico y las condiciones de propagación (Loviso y Libkind, 2018).

8.4.5 Fenoles

El exceso de fenoles en la cerveza se presenta como aromas y sabores medicinales y a plástico. Existen cepas que producen mayor cantidad de fenoles, con aroma a clavo de olor, utilizadas generalmente para fermentar cervezas de trigo alemanas. La producción de estos compuestos, por parte de la levadura, está directamente relacionada con la salud celular y la tasa de crecimiento.

Como primera medida hay que descartar que el exceso de fenoles se deba a la presencia de cloro en el agua de elaboración, proveniente del agua de red o introducido a través de desinfectantes y limpiadores clorados. Este tipo de productos al combinarse con compuestos de la malta pueden formar cloro-fenoles que provocan potentes sabores y aromas medicinales.

Las levaduras ambientales producen habitualmente compuestos aromáticos fenólicos y presentan muy baja floculación y sedimentación (son muy pulverulentas). La contaminación con este tipo de levaduras provoca presencia de fenoles, por lo que se debe revisar el protocolo de limpieza y desinfección.

8.4.6 Azufre

La levadura necesita azufre para sintetizar proteínas, lo absorbe del mosto en forma de iones sulfato (SO_4^{2-}) y lo reduce a ácido sulfhídrico (S_2H), resultando en cervezas azufradas con aromas a huevo podrido, carne o fósforo. Una vez terminada la fase de síntesis, las moléculas excedentes de ácido sulfhídrico son expulsadas de la célula y como son volátiles salen de esta junto con el CO_2 . También pueden producir azufre algunos géneros de bacterias y otras levaduras como *Obesombacterium* y *Hafnia* ssp. respectivamente.

La eliminación de CO_2 expulsa los compuestos sulfurosos fuera del fermentador, por esto es importante asegurar una fermentación vigorosa sin embargo cuando al término de la fer-

mentación la cerveza posee un contenido de azufre considerable, se pueden seguir al menos dos opciones:

- **Caso 1.** En las cervezas frías (0 – 4 °C) se puede elevar la temperatura hasta 20 – 22 °C (temperatura ambiente). De este modo se disminuye la solubilidad del CO₂ contenido en la cerveza liberándose al ambiente a través del *airlock*. Si el problema persiste y se cuenta con fermentadores isobáricos o tanques de cerveza brillante (BBT por sus siglas en inglés) se puede repetir el proceso si previamente se recarbonata la cerveza disminuyendo la temperatura e inyectando CO₂.
- **Caso 2.** Inyectar CO₂ cuidadosamente, por la parte inferior del cono del fermentador, para desalojar el compuesto indeseado hacia el exterior (previamente descartar la mayor cantidad de biomasa de levadura).

8.4.7 Acidez

En las cervezas de estilo *Sour* y *Lambic* la acidez es un carácter distintivo, sin embargo es poco deseado en el resto de las cervezas y cuando se presenta este problema, es importante revisar el protocolo de limpieza y desinfección.

La contaminación bacteriana es la causa más común de sabores y aromas ácidos en la cerveza, particularmente las bacterias del ácido láctico y ácido acético son las responsables. Algunas bacterias del género *Lactobacillus* producen características ácidas particulares en la cerveza que permite que se diferencien de bacterias de género *Acetobacter* que produce sabores similares al vinagre. Otros organismos como *Brettanomyces*, pueden producir también ácido acético bajo condiciones específicas.

8.4.8 Ácido Isovalérico

La principal causa de su presencia en cervezas es la utilización de lúpulos degradados, esta sustancia se percibe como aroma a queso o medias sucias. Conforme el lúpulo envejece, y si está expuesto al oxígeno y altas temperaturas, los alfa-ácidos comienzan a oxidarse, esto disminuye el potencial de amargor del lúpulo y genera compuestos como el ácido isovalérico.

Las levaduras ambientales especialmente *Brettanomyces* spp., constituye otra fuente de ácido isovalérico, que aporta a las cervezas, además de los ya descritos, un carácter intenso, sudoroso, a montura o corral.

Para evitar este tipo de compuestos se recomienda, mantener una correcta higiene y desinfección y conservar los lúpulos en condiciones adecuadas y prescindir del uso de lúpulos viejos sobre todo si tiene altos niveles de amargor.

8.5 PROBLEMAS RELACIONADOS CON LEVADURA PARA REUTILIZACIÓN

8.5.1 Baja viabilidad de la levadura

Existen dos razones fundamentales donde se presenta baja viabilidad de levadura cuando es cosechada para su reutilización:

- **Caso 1.** Mala salud de la levadura al momento de la cosecha. Esta condición se puede dar por un escaso nivel de reservas energéticas para mantener su metabolismo, causada por una reducida tasa de inóculo, insuficiente nivel de oxígeno disuelto en el mosto y baja viabilidad inicial. Cuando la fermentación es normal y vigorosa, entonces es probable que la levadura sea saludable al final de la fermentación.
- **Caso 2.** Condiciones deficientes de mantenimiento del cono del fermentador. En general los conos de los fermentadores no poseen control de temperatura, en ambientes con altas temperaturas, principalmente en verano, la levadura contenida puede superar ampliamente la temperatura ideal y acelerar el metabolismo. Esto provocaría el

consumo de sus propias reservas energéticas y si se prolonga en el tiempo, disminuye la viabilidad. Además, la recolección de levadura debe ser lo suficientemente pronto, para evitar estresar las células por alcohol, pH o estrés hidrostático (estrés generado por el peso de la columna de cerveza que debe soportar la levadura en fermentadores muy altos).

8.5.2 Conservación en frío de levadura cosechada

Al momento de conservar la levadura en frío entre 2–4 °C se deben considerar otras variables:

- Presión del dióxido de carbono: incluso una pequeña presión, es perjudicial para la levadura mientras está almacenada, ya que las paredes celulares pueden sufrir daños y disminuir la viabilidad.
- Las temperaturas de almacenamiento más bajas resultan en una vida útil más larga, a menos que se congele accidentalmente levadura. Es preferible elevar algunos grados más la temperatura ante el riesgo de congelación.
- Los materiales y recipientes para el almacenamiento deben estar limpios y desinfectados, y libres de agentes limpiadores y desinfectantes, ya que van a afectar la salud de la levadura. Es recomendable un correcto enjuague de los productos de limpieza y un esmerado escurrimiento del sanitizante.
- Para almacenar biomasa de levadura por algunos días se debe realizar la cosecha en frío, de esta manera se obtiene biomasa con buen nivel de reservas energéticas y baja proporción de cerveza (levadura compacta y espesa).
- No se recomienda reutilizar la levadura de cervezas con alto contenido de alcohol ya que podrían tener una baja viabilidad.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, D. A. & Ingledew, W. M.** (2005b). The importance of aeration strategy in fuel alcohol fermentations contaminated with *Dekkera/Brettanomyces* yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69, 16–21. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-1927-0>
- Abbott, D. A., Hynes, S. H. & Ingledew, W. M.** (2005) Growth rates of *Dekkera/Brettanomyces* hinder their ability to compete with *Saccharomyces cerevisiae* in batch corn mash fermentations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66, 641–647. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-004-1769-1>
- Aguilar Uscanga, M., Delia, M. L. & Strehaiano, P.** (2003). *Brettanomyces bruxellensis*: effect of oxygen on growth and acetic acid production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61, 157–162. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1197-z>
- Anness, B., Bamforth, C. & Wainwright, T.** (1979). The measurement of dimethyl sulphoxide in barley and malt and its reduction to dimethyl sulphide by yeast. *Journal of the Institute of Brewing*, 85(6), 346–349. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1979.tb03940.x>
- Anness, B. & Bamforth, C.** (1982). Dimethyl sulphide a review. *Journal of the Institute of Brewing* (Great Britain), 88(4) 244–252. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1982.tb04101.x>
- Arevalo Chávez, S.** (1998). *Optimización de la producción del agente de biocontrol Candida sake* (CPA-1) (Tesis Doctoral, Universitat de Lleida). <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/8389/TSMAC1de3.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Assche, P.** (1992). Microbial Contamination of Beer. *Cerevisiae and Biotechnology*, 17, 45–56.
- Back, W.** (1994) Secondary contaminations in the filling area. *Brauwelt International*, 4, 326–333.
- Back, W.** (2003). Biofilme in der Brauerei und Getränkeindustrie – 15 Jahre Praxiserfahrung. *Brauwelt online*, 24/25, 1–5.
- Back, W.** (2005). Brewery. En Carl Fachverlag, H (Ed.), *Colour Atlas and Handbook of Beverage Biology* (pp. 10–112). Alemania.
- Bamforth, C. W.** (2002). Standards of Brewing – A Practical Approach to Consistency and Excellence. *Journal of the Institute of Brewing*, 108(4), 514–515.
- Bleoanca, I. & Bahrin, G.** (2013). Overview on Brewing Yeast Stress Factors. *Romanian Biotechnological Letters*, 18(5), 8559–8572.
- Boulton, C. & Quain, D.** (2006). Brewing Yeast and Fermentation. Blackwell Science. vol. II.
- Brandam, C., Castro-Martinez, C., Delia, M. L., Ramon-Portugal, F. & Strehaino, P.** (2008). Effect of temperature on *Brettanomyces bruxellensis*: metabolic and kinetic aspects. *Canadian Journal of Microbiology*, 54, 11–18
- Brewing Science Institute.** (2019). Brewer's Laboratory Handbook: brewing without the blindfold™ v2 2–13–19. <https://brewingscience.com/wp-content/uploads/2019/02/BSI-Brewers-Handbook-2019-Brewing-without-the-Blindfold.pdf>

- Briggs, D. E., Boulton, C. A., Brookes, P. A & Stevens, R.** (2004). *Brewing: Science and Practice*. Whoodhead Publishing. Pp.567-575.
- Casey, G. & Ingledew, W.** (1986). Ethanol tolerance in yeasts. *Critical Reviews in Microbiology*, 13(3), 219-80.
- Centers for Disease Control and Prevention [CDCP].** (1994). *Bacillus cereus: Food Poisoning Associated with Fried Rice at Two Child Day Care Centers*. <https://www.cdc.gov/mmwr/pre-view/mmwrhtml/00025744.htm>
- Cheftel, J. C., Cheftel, H. y Besancon, P.** (2000). Higiene y limpieza de las instalaciones En *Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos Vol II* (pp. 353-372). Zaragoza, España: Editorial Acribia S.A.
- Ciani, M., & Ferraro, L.** (1997). Role of oxygen on acetic acid production by *Brettanomyces/Dekkera* in winemaking. *Journal of Science, Food, and Agriculture*, 75, 489-495. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199712\)75:4<489::AID-JSFA902>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199712)75:4<489::AID-JSFA902>3.0.CO;2-9)
- D'Amore, T., Crumplen, R. & Stewart, G.** (1991). The involvement of trehalose in yeast stress tolerance. *Journal of Industrial Microbiology*, 7, 191-195. <https://doi.org/10.1007/BF01575882>
- De Nicola, R., & Walker, G. M.** (2011). Interacciones de zinc con levadura de cerveza: impacto en el rendimiento de la fermentación. *Revista de la Sociedad Americana de Químicos de cerveza*, 69(4), 214-219. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-2011-0909-0>
- Deák, T.** (2008). *Handbook of Food Spoilage Yeasts*. CRC Press, Taylor and Francis Group.
- European Brewery Convention.** (2001) *Analytica Microbiologica*. Fachverlag Hans Carl.
- Fisher, C. & Scott, T.** (2000). *Flavores de los alimentos. Biología y Química*, Chapter I and II. Zaragoza, España: Editorial Acribia S.A.
- Freer, S. N.** (2002). Acetic acid production by *Dekkera/Brettanomyces* yeasts. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18, 271-275. <https://doi.org/10.1023/A:1014927129259>
- Frioni, L.** (2005). Los microorganismos: estructuras y funciones. *Microbiología básica, ambiental y agrícola*. (pp. 11-65) Editorial Universidad de la República.
- Generalitat de Catalunya.** (2019). Guía de prácticas correctas de higiene para pequeños productores de cerveza. Departamento de Salud. Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria.
- Gibson, B., Lawrence, S., Leclaire, J., Powell, C. & Smart, K.** (2007). Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. *FEMS Microbiology Reviews*, 31, 535-569. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00076.x>
- Granès, D., Médina, E., Blateyron, L., Roméro, C., Bru, E., Roux, C., Bonnefond, C., Piperno, A., Rouanet, M. & Oui, T.** (2006). Alimentación nitrogenada de la levadura. ICV Montpelier, Francia: Flash Info Vendanges.
- HACH.** (2016). DR6000 en el sector de la industria cervecera: Métodos importantes según MEBAK y ASBC. <https://es.hach.com/asset-get.download.jsa?id=50904526663>
- Haikara, A. & Helander, I.** (2002). *Pectinatus, Megasphaera and Zymophilus*. In: M. Dworkin (Ed), *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Database for the Microbiological Community*, 3rd edition (pp. 111-116). Microbiology Society, Reino Unido.
- Haikara, A. & Lounatmaa, K.** (1987). Characterization of *Megasphaera* sp., a new anaerobic

- beer spoilage coccus. Proceedings of the European Brewer Convention Congress. Oxford University Press. Pp.473- 480.
- He, Y., Dong, J., Yin, H., Zhao, Y., Chen, R., Wan, X., Chen, P., Hou, X., Liu, J. & Chen, L.** (2014). Wort composition and its impact on the flavour-active higher alcohol and ester formation of beer – a review. *Journal of The Institute of Brewing*, 120, 157-163. <https://doi.org/10.1002/jib.145>
- Henriksson, E. & Haikara, A.** (1991). Airborne microorganisms in the brewery filling area and their effect on microbiological stability of beer. *Monatsschrift fur Brauwissenschaft*, 44(1), 4-8.
- Hill, A. E. & Bamforth, C. W.** (2009). Capítulo: Microbiological stability of beer. In: Beer Quality Perspective. Academic Press Elsevier. Webserie: <https://epdf.pub/beer-a-quality-perspective-handbook-of-alcoholic-beverages.html>
- Hirst, M. & Richter, C.** (2016). Review of Aroma Formation through Metabolic Pathways of *Saccharomyces cerevisiae* in Beverage Fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture*, 67, 361-370. DOI:10.5344 / ajev.2016.15098
- International Organization for Standardization [ISO]**, (2014).ISO 7218:2007. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General rules for microbiological examinations. <https://www.sis.se/api/document/preview/916422/>
- Kunze, W.** (2006). *Tecnología para cerveceros y malteros*. VLB Berlín. Berlín, Alemania.
- Lei, H., Xu, H., Feng, L., Yu, Z., Zhao, H. & Zhao, M.** (2016). Fermentation performance of lager yeast in high gravity beer fermentations with different sugar supplementations. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 122, 583-588. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.05.004>
- Lentini, A., Rogers, P., Higgins, V., Dawes, I., Chandler, M., Stanley, G. & Chambers, P.** (2003). The impact of Ethanol Stress on Yeast Physiology. In K. Smart (Ed.). *Brewing Yeast Fermentation Performance* (2° Ed., pp. 25-38). Wiley Editorial. <https://doi.org/10.1002/9780470696040.ch3>
- Ley N°18284.** Código Alimentario Argentino Normas para Producción, Elaboración y Circulación de Alimentos para Consumo Humano en todo el País. Boletín Nacional Buenos Aires, 28 de julio de 1969.
- Libkind Frati, D. y Latorre, M.** (2017). Control de contaminaciones: test de mosto forzado. <https://ipatec.conicet.gov.ar/wp-content/uploads/sites/72/2017/08/IPATEC-Test-mosto-forzado-V1-2017.pdf>
- Libkind Frati, D. y Latorre M.** (2017). Recomendaciones para realizar el test forzado de diacetilo. <https://ipatec.conicet.gov.ar/wp-content/uploads/sites/72/2017/05/IPATEC-Test-forzado-de-diacetilo-V3-2017-1.pdf>
- Libkind Frati, D., Moliné, M., Eizaguirre, J., Latorre, M. y Cavallini, M.** (2018). Guía curso teórico - práctico sobre “Microscopía y recuento de levaduras para productores de cerveza”. Instituto Andino Patagónico de Tecnologías Biológicas y Geoambientales (IPA-TEC – CONICET), Universidad Nacional del Comahue (UNComahue).
- López Tevez, L. y Torres, C.** (2006) Guía de trabajos prácticos de Microbiología general. Facultad de Agroindustrias de la Universidad Nacional del Nordeste. <http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/tp5.pdf>

- Loviso, C. y Libkind, D.** (2018). Síntesis y regulación de los compuestos del aroma y sabor derivados de la levadura en la cerveza: alcoholes superiores. *Revista Argentina de Microbiología*, 51(4), 386–397. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2018.08.006>
- Loviso, C., y Libkind, D.,** (2018). Síntesis y regulación de compuestos del aroma y el sabor derivados de la levadura en la cerveza: ésteres. *Revista Argentina de Microbiología*, 50(4), 436–446. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.11.006>
- Madigan, M., Martinko, J., Bender, K., Buckley, D., & Stahl, D.** (2015). Microorganismos y microbiología. En M. Martín-Romo (Ed.) *Brock. Biología de los microorganismos* (14 ed., pp. 34–49). Pearson Educación.
- Martens, H.** (1996). *Microbiology and biochemistry of the acid ales of Roeselare* (PhD. Thesis) Katholieke Universiteit Leuven, Leuven.
- McLaren, J. I., Fishborn, T., Briem, F., Englmann, J. & Geiger, E.** (2001). Zinc problem solved? *Brauwelt International*, 19(1), 60–63.
- Meier-Dörnberg, T., Kory, O., Jacob, F., Michel, M., & Hutzler, M.** (2018). *Saccharomyces cerevisiae* variety diastaticus friend or foe? *FEMS Yeast Research*, 18(4), foy023. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foy023>
- Moore, G. & Griffith, C.** (2002). A comparison of surface sampling methods for detecting co-liforms on food contact surfaces. *Food Microbiology*, 19, 65–73. <https://doi.org/10.1006/fmic.2001.0464>
- Moore, G. & Griffith, C.** (2007). Problems associated with traditional hygiene swabbing: the need for in-house standardization. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 1090–1103. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03330.x>
- Mostert, M. A., Holah, J. & Lelieveld, H. L.** (2005). *Handbook of hygiene control in the food industry*. Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC, Cambridge, Reino Unido.
- Nicolau, A. & Turtoi, M.** (2006). Microbiologie generala. Factori care influenteaza dezvoltarea microorganismelor (pp. 107–118). Italia: Editura Academica.
- O'Connor-Cox, E. S. C. & Ingledew, W. M.** (1990) Effect of the Timing of Oxygenation on Very High Gravity Brewing Fermentations. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 48(1), 26–32. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-48-0026>
- Olaniran, A., Hiralal, L., Mokoena, M. & Pillay, B.** (2017). Flavour-active volatile compounds in beer: production, regulation and control. *Journal of The Institute of Brewing*, 123, 13–23. <https://doi.org/10.1002/jib.389>
- Palmer, J.** (2006). *How to Brew: everything you need to know to brew great beer every time*. Colorado, EEUU: Brewers publications.
- Parker, N.** (2008). Are Craft Brewers Underaerating Their Wort?. *MBA Technical Quarterly*, 45(4), 352–354.
- Pérez-Rodríguez, F., Valero, A., Carrasco, E., García, R. M. & Zurera, G.** (2008). Understanding and modelling bacterial transfer to foods: a review. *Trends in Food Science and Technology*, 19, 131–144. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.08.003>
- Priest, F., & Stewart, G.** (2006). Microbiology and Microbiological Control in the Brewery. In F. Priest (Ed.), *Handbook of Brewing* (pp. 607–625). CRC Press Taylor and Francis Group.

- Sakamoto, K. & Konings, W.** (2003). Beer spoilage bacteria and hop resistance. *International Journal of Food Microbiology*, 89, 105–124. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00153-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00153-3)
- Salo, S., Laine, A., Alanko, T., Sjöberg, A. M. & Writanen, G.** (2000). Validation of the microbiological methods Hygicult dipslide, contact plate, and swabbing in surface hygiene control: a Nordic collaborative study. *Journal of AOAC International*, 83, 1357–1365. <https://doi.org/10.1093/jaoac/83.6.1357>
- Sarlin, T., Nakari-Setälä, T., Linder, M., Penttilä, M. & Haikara, A.** (2005). Fungal hydrophobins as predictors of the gushing activity of malt. *Journal of the Institute of Brewing*, 111, 105–111. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2005.tb00655.x>
- Smart, K.** (2003). Brewing yeast fermentation performance. Oxford Brookes University (UK). Blackwell Science.
- Suzuki, K., Asano, S., Iijima, K., Kuriyama, H. & Kitagawa, Y.** (2008). Development of detection medium for hard-to-culture beer-spoilage lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 104(5), 1458–1470. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03669.x>
- Takacs, P. & Hackbarth, J. J.** (2007). Oxygen-Enhanced Fermentation. *MBAA Technical Quarterly*, 44, 104–107.
- Thuar, A. y Gallace, M. E.** (2019). Guía de Trabajos Prácticos, Microbiología Agrícola. Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de La Pampa.
- Thuar, A., Bruno, C. y Vidal, C.** (2015). Microbiología en práctica: manual de técnicas de laboratorio para la enseñanza de microbiología agrícola. 1º Ed. UniRío Editorial.
- Meier-Dörnberg, T., Kory, O. I., Jacob, F., Michel, M. & Hutzler, M.** (2018). *Saccharomyces cerevisiae* variety diastaticus friend or foe?—spoilage potential and brewing ability of different *Saccharomyces cerevisiae* variety diastaticus yeast isolates by genetic, phenotypic and physiological characterization. *FEMS Yeast Research*, 18(4), 1–27. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foy023>
- Torres Torres, M. P.** (2007). Valoración de la calidad microbiológica del producto en proceso en una planta productora de bebidas alcohólicas (Tesis de grado para obtener el título de Microbiólogo Industrial). Facultad De Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana.
- Trochine, A. y Latorre, M.** (2018). Guía curso teórico práctico sobre “Contaminantes cerveceros y su control en fábrica”. Instituto Andino Patagónico de Tecnologías Biológicas y Geoambientales (IPATEC – CONICET), Universidad Nacional del Comahue (UNComahue).
- Van der Kühle, A. & Jespersen, L.** (1998). Detection and identification of wild yeast in lager breweries. *Journal of the Institute of Brewing*, 43, 205–213. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00113-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00113-5)
- Van Oevelen, D., Spaepen, M., Timmermans, P. & Verachtert H.** (1977). Microbiological aspects of spontaneous wort fermentation in the production of lambic and gueuze. *Journal of the Institute of Brewing*, 83, 356–360.
- Van Oevelen, D., De l'Escaille, F. & Verachtert, H.** (1976). Synthesis of Aroma Compounds During the Spontaneous Fermentation of Lambic and Gueuze. *Journal of the Institute of Brewing*, 82, 322–326.
- Van Vuuren, H. J. J. & Priest, F. G.** (1996). Gramnegative brewery bacteria. In: F. G. Priest and

Campbell, I. *Brewing Microbiology* 3rd edition (pp. 2251-2253). London.

Vanbeneden, N., Frederik, G. & Freddy, R. (2008). Formation of 4-vinyl and 4-ethyl derivatives from hydroxycinnamic acids: Occurrence of volatile phenolic flavour compounds in beer and distribution of Pad1 – activity among brewing yeasts. *Food Chemistry*, 107 (1), 221–230. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.008>

Vanderhaegen, B., Neven, H., Cogne, S., Vertrepin, K. J., Derdelinckx, C. & Verachtert, H. (2003). Bioflavoring and Beer Refermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62, 140–150. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1340-5>

Vaughan, A., O’Sullivan, T. & Van Sinderen, D. (2005). Enhancing the Microbiological Stability of Malt and Beer. *Journal of the Institute of Brewing*, 111(4), 335–371. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2005.tb00221.x>

Verachtert, H. & Iserentant, D. (1995). Properties of Belgian acid beers and their microflora. Part I. The production of gueuze and related refreshing acid beers. *Cerevisiae, Belgian Journal of Brewing and Biotechnology*, 20, 37–41.

Verstrepen, K., Derdelinckx, G. & Verachtert, H. (2003). Yeast flocculation: what brewers should know. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61, 197–205. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1200-8>

Walther, A., Hesselbart, A. & Wendland, J. (2014). Genome Sequence of *Saccharomyces carlsbergensis*, the World’s First Pure Culture Lager Yeast. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 4(5), 783–793. <https://doi.org/10.1534/g3.113.010090>

White, C., & Zainasheff, J. (2010) *Yeast, The Practical Guide to Beer Fermentation*. Colorado, EEUU: Brewers publications.

Yakobson, C. (2010). Pure culture fermentation characteristics of *Brettanomyces* yeast species and their use in the brewing industry (Master's Thesis). International Centre for Brewing and Distilling located at Heriot-Watt University in Edinburgh, Scotland.

Zhao, X. & Bai, F. (2009). Mechanisms of yeast stress tolerance and its manipulation for efficient fuel ethanol production. *Journal of Biotechnology*, 144(1), 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2009.05.001>

Zhao, X. & Bai, F. (2012). Zinc and yeast stress tolerance: Micronutrient plays a big role. *Journal of Biotechnology*, 158, 176–183. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.06.038>

ANEXOS

ANEXO 1 - Ejemplo de un programa de limpieza y desinfección CIP, de un fermentador de acero inoxidable

FICHA DE LIMPIEZA Y SANITIZACIÓN N°6					
EQUIPO			FERMENTADORES DE ACERO INOX.		
Momento:			Inmediatamente luego del vaciado		
Responsable:			Cristian Leavi		
Productos:			Resourse Alcalino marca “Power-clean”		
			Super Dilac Ácido marca “Power-clean”		
			Power-clean Vortex, ác. Peracético		
PROCEDIMIENTO DE LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN					
Etapas	Función	Temp. y tiempo	Producto	Dosificación	Frecuencia
1. Pre-enjuague	Eliminar restos grandes	50 °C. 5 -10 min.	Agua de termotanque		Inmediatamente luego del vaciado
2. Limpieza alcalina	Eliminar materia orgánica	70 °C. 20 min. CIP	Resourse Alcalino	1 L y completar con agua hasta 50 lts	Luego de cada uso
3. Enjuague*1	Eliminar restos alcalinos.	50 °C. 5 -10 min.	Agua de termotanque		Luego de CIP alcalino
4. Lavado ácido	Remoción depósitos minerales	Temp. ambiente 20 min.	Super Dilac	2 L y completar con agua hasta 50lts	Luego de 3 fermentaciones
5. Enjuague*1	Eliminar restos ácidos	Temp. ambiente 5 -10 min.	Agua de red		Luego de limpiador ácido
6. Sanitización	Disminuir carga de microbios.	Temp. ambiente	Power-clean Vortex	100 mL y completar con agua hasta 50 lts	Luego del enjuague post limpieza
*1 Comprobar correcto enjuague mediante la medición de pH del agua descartada.					
SEGURIDAD					
Equipos de protección personal:			Guantes y gafas protectoras		
Manipulación general de los productos:			No ingerir. Evitar todo contacto con los ojos, la piel o la ropa. No respirar gases, nieblas o vapores. Utilizar solamente con buena ventilación. Lavarse las manos después de la manipulación.		
Actuación en caso de accidentes					
Contacto con ojos y piel con alguno de los productos:			Lavar con abundante agua		
Teléfono de emergencias médicas:			107		

ANEXO 2 - Notación científica

La notación científica, es una forma de simplificar la expresión de números enteros muy grandes, o números decimales extremadamente pequeños y es representada matemáticamente como:

$$m \cdot 10^n$$

La interpretación de esta fórmula es que al valor de “*m*” hay que multiplicarlo diez veces por la base “10” elevada al exponente “*n*” (con el valor que muestre), para obtener de nuevo la cifra o número original que dio lugar a la expresión simplificada en notación científica. En esa fórmula, “*m*” representa un número, entero o decimal, mayor que “0” y menor que “10”, mientras que el exponente “*n*” puede ser un número entero positivo (+) o negativo (–), que varía de acuerdo con el valor del número que representa “*m*”. Por su parte, cuando el valor del exponente corresponde a un número negativo, éste se identifica agregándole delante el signo (–).

Ejemplo 1:

Se debe inocular con 2 000 000 000 (dos mil millones) de células de levadura:

Se representa en notación científica como: $2 \cdot 10^9$ células.

Ejemplo 2:

La producción de cerveza ascendió a 45 358 792 (cuarenta y cinco millones trescientos cincuenta y ocho mil setecientos noventa y dos) litros anuales:

Se representa: 4,5358792.107 litros, y de forma simplificada: $4,53 \cdot 10^7$ litros.

Ejemplo 3:

Un micrómetro equivale a 0,000001 metros:

Se representa en notación científica como: $1 \cdot 10^{-6}$ metros.

La siguiente tabla muestra diferentes valores numéricos, sus equivalentes en notación científica y la representación numérica completa de cada uno.

VALOR NUMÉRICO	REPRESENTACIÓN NUMÉRICA	NOTACIÓN CIENTÍFICA
Miltrillonésima	1.10^{-21}	0,000000000000000000001
Trillonésima	1.10^{-18}	0,0000000000000000001
Milbillonésima	1.10^{-15}	0,000000000000001
Billonésima	1.10^{-12}	0,000000000001
Milmillonésima	1.10^{-9}	0,000000001
Millonésima	1.10^{-6}	0,000001
Milésima	1.10^{-3}	0,001
Centésima	1.10^{-2}	0,01
Décima	1.10^{-1}	0,1
Uno	-	1
Diez	1.10^1	1 0
Cien	1.10^2	1 00
Mil	1.10^3	1 000
Millón	1.10^6	1 000 000
Millardo	1.10^9	1 000 000 000
Billón*	1.10^{12}	1 000 000 000 000
Mil billones	1.10^{15}	1 000 000 000 000 000
Trillón	1.10^{18}	1 000 000 000 000 000 000
Mil trillones	1.10^{21}	1 000 000 000 000 000 000 000

* El billón en habla hispana, se representa como 10^{12} , mientras que en Estados Unidos de Norteamérica se denomina billon a la cifra 10^9 .

ANEXO 3 - Tabla de conversiones entre densidad específica y grados plato

PLATO (°P)	DENSIDAD (kg/m³)	PLATO (°P)	DENSIDAD (kg/m³)	PLATO (°P)	DENSIDAD (kg/m³)
0,5	1002	14,0	1057	27,5	1117
1,0	1004	14,5	1059	28,0	1120
1,5	1006	15,0	1061	28,5	1122
2,0	1008	15,5	1063	29,0	1124
2,5	1010	16,0	1065	29,5	1127
3,0	1012	16,5	1068	30,0	1129
3,5	1014	17,0	1070	30,5	1132
4,0	1016	17,5	1072	31,0	11,34
4,5	1018	18,0	1074	31,5	1136
5,0	1020	18,5	1076	32,0	1139
5,5	1022	19,0	1079	32,5	1141
6,0	1024	19,5	1.81	33,0	1144
6,5	1026	20,0	1083	33,5	1146
7,0	1028	20,5	1085	34,0	1149
7,5	1030	21,0	1087	34,5	1151
8,0	1032	21,5	1090	35,0	1154
8,5	1034	22,0	1092	35,5	1156
9,0	1036	22,5	1094	36,0	1159
9,5	1038	23,0	1096	36,5	1161
10,0	1040	23,5	1099	37,0	1164
10,5	1042	24,0	1101	37,5	1166
11,0	1044	24,5	1103	38,0	1169
11,5	1046	25,0	1106	38,5	1171
12,0	1048	25,5	1108	39,0	1174
12,5	1050	26,0	1110	39,5	1176
13,0	1053	26,5	1113	40,0	1179
13,5	1055	27,0	1115	40,5	1182

ANEXO 4 - Ejemplo de ficha de seguridad

FICHA DE DATOS DE SEGURIDAD SOLUCIÓN DEL CICLOHEXIMIDA 0,1%

Fecha de emisión - 12/08/2008.

SR0222

Sección 1. Identificación del producto y de la compañía

No del producto	SR0222
Nombre comercial	SOLUCIÓN DEL CICLOHEXIMIDA 0,1%
Fabricante	Oxoid Limited Wade Road Basingstoke Hants RG24 8PW ENGLAND Tel: + 44 (0)1256 841144 Fax: + 44 (0)1256 463388
Proveedor	Oxoid Limited Wade Road Basingstoke Hants RG24 8PW ENGLAND Tel: + 44 (0)1256 841144 Fax: + 44 (0)1256 463388

Sección 2. Identificación de los riesgos

Peligros más importantes	Nocivo por ingestión.
--------------------------	-----------------------

Sección 3. Composición e información sobre los ingredientes

Preparado - Ingredientes peligrosos (Europa)

Componente	Nº CAS	Concentración	Clasificación	Frases de riesgo
Cicloheximida	66-81-9	0.10 % w/v	T+ - Muy tóxico.	R28- Muy tóxico por ingestión.
	200-636-0		N - Peligroso para el medio ambiente. Repr. Cat. 2 Mutágeno, Categoría 3.	R51/53- Tóxico para los organismos acuáticos, puede provocar a largo plazo efectos negativos en el medio ambiente acuático. R61- Riesgo durante el embarazo de efectos adversos para el feto. R68- Posibilidad de efectos irreversibles.

Sección 4. Primeros auxilios

Primeros Auxilios - Ojos	Enjuagar inmediatamente con agua corriente durante al menos 15 minutos, levantando ocasionalmente los párpados superior e inferior.
Primeros Auxilios - Piel	Lavar con agua y jabón.
Primeros Auxilios - Ingestión	Evite la mano al contacto de boca. De ser ingerido, busque el consejo médico.

Sección 5. Medidas de extinción de incendios

Medios de extinción - Apropiado(s)	No combustible. Utilizar agentes extintores apropiados para los materiales cercanos.
------------------------------------	--

FICHA DE DATOS DE SEGURIDAD

SOLUCION DEL CICLOHEXIMIDA 0,1%

Fecha de emisión - 12/08/2008.

SR0222

Sección 6. Medidas a tomar en el transcurso de derrames accidentales

Precauciones personales

Recomendado: Guantes desechables de vinilo. Gafas de seguridad.

Derrame

Absorber con un material inerte y poner el producto esparcido en un recipiente apropiado para desechos.

Sección 7. Manejo y almacenaje

Manipulación

Evítese el contacto con los ojos, la piel y la ropa.

Almacenamiento

Almacén en un refrigerador en 2 a 8 °C (36 a 46 °F).

Sección 8. Controles de exposición/protección personal

Medidas de protección - Manos

Recomendado: Guantes desechables de vinilo.

Medidas de protección - Ojos

Recomendado: Gafas químico-protectoras o escudo facial (EN166, 167 y 168).

Medidas de protección - Cuerpo

Bata de laboratorio.

Sección 9. Propiedades físicas y químicas

Estado físico

Líquido.

Color

Incoloro.

Sección 10. Datos sobre la estabilidad y la reactividad

Estabilidad

Estable en las condiciones de conservación y manipulación recomendadas (ver sección 7).

Sección 11. Información toxicológica

Toxicidad aguda

Bajo nivel de toxicidad aguda.

Sección 12. Información sobre la ecología

Ecotoxicidad

Ningún dato específico.

Sección 13. Consideraciones en el momento de la eliminación

Consideraciones sobre la eliminación

Desecho peligroso. Desechar de conformidad con todas las normativas federales, estatales y locales aplicables.

Sección 14. Información sobre el transporte

ONU : Número ONU

No regulado.

Sección 15. Informaciones reglamentarias

Requisitos de etiqueta

Nocivo



Frases de riesgo

R22- Nocivo por ingestión.

CE Clasificación

Xn - Nocivo.

ANEXO 5 - Equivalencia de unidades


	UNIDAD	ABREVIATURA	EQUIVALENCIA
LONGITUD	Metro	m	1 m
	decímetro	dm	0,1 m
	Centímetro	cm	0,01 m
	Milímetro	mm	0,001 m
	Micrómetro	μm	0,000001 m
	Nanómetro	nm	0,000000001 m
	Angstrom	Å	0,0000000001 m
SUPERFICIE	Metro cuadrado	m ²	1 m ²
	Decímetro cuadrado	dm ²	0,01 m ²
	Centímetro cuadrado	cm ²	0,0001 m ²
	Milímetro cuadrado	mm ²	0,000001 m ²
VOLUMEN	Metro cúbico	m ³	1 m ³
	Decímetro cúbico	dm ³	0,001 m ³
	Centímetro cúbico	cm ³	0,000001 m ³
	Milímetro cúbico	mm ³	0,000000001 m ³
MASA	Kilogramo	kg	1 kg
	Hectogramo	hg	0,1 kg
	Decagramo	dag	0,01 kg
	Gramo	g	0,001 kg
	Decigramo	dg	0,0001 kg
	Centigramo	cg	0,00001 kg
	Miligramo	mg	0,000001 kg
	Microgramo	μg	0,000000001 kg

PARTES POR MILLÓN A mg/kg
1 ppm = 1 mg/kg

PARTES POR BILLÓN A PARTES POR MILLÓN
1 ppb = 0,001 ppm

VOLUMEN
1 Litro (L) = 1 dm ³

PORCENTAJE (% m/m) A PARTES POR MILLÓN
1% = 10 000 ppm

The background of the entire page is a detailed, colorful illustration of a microbiological environment. It features various types of microorganisms: long chains of purple oval cells with internal structures, clusters of smaller purple cells, green rod-shaped bacteria with flagella, and other smaller, more complex structures in red, orange, and green. The background is a light cream color with scattered small, colorful dots and lines.

El crecimiento del sector cervecero en los últimos años impulsó la necesidad de crear *Microbiología cervecera*. Este manual fue diseñado como una herramienta básica para los cerveceros artesanales que se inician en la actividad y para aquellos con más experiencia, que pretenden mejorar su producción a través del uso apropiado de los recursos disponibles.

Microbiología cervecera explica de manera sencilla y práctica técnicas de laboratorio para la manipulación de microorganismos, el instrumental necesario acorde a cada actividad y además, permite al usuario contar con una base teórica que fundamente la toma de decisiones en su cervecería y permita elaborar un producto artesanal de excelente calidad.

ISBN 978-987-86-6088-2



9 789878 660882