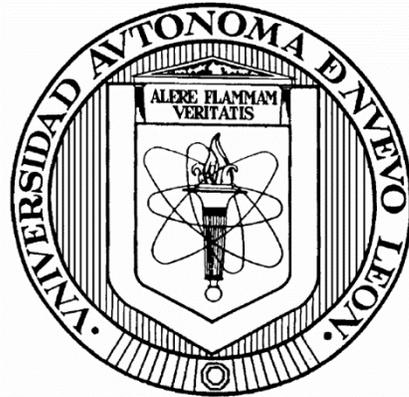


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS EN CERVEZAS
ARTESANALES DISPENSADAS EN BARRIL EN EL ESTADO DE NUEVO
LEÓN**

Por

Q. B. P. KAREN CECILIA LEAL BUSTILLOS

Como requisito parcial para obtener el grado de MAESTRA EN CIENCIAS CON
ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA APLICADA

Julio, 2024

**IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS EN
CERVEZAS ARTESANALES DISPENSADAS EN BARRIL EN EL
ESTADO DE NUEVO LEÓN**

Aprobación de la Tesis:

DR. ULRICO JAVIER LÓPEZ CHUKEN

Asesor de tesis

DR. JULIO SILVA MENDOZA

Coasesor de tesis

DRA. MELISSA MARLENE RODRIGUEZ DELGADO

Comité tutorial

DR. EDGAR ALLAN BLANCO GÁMEZ

Comité tutorial

DR. JUAN FRANCISCO VILLARREAL CHIU

Comité tutorial

DRA. MARÍA ELENA CANTÚ CÁRDENAS

Subdirectora de Estudios de Posgrado

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a todas las personas que hicieron posible la realización de esta tesis.

A mi asesor, el Dr. Ulrico López Chuken, y a mi coasesor, el Dr. Julio Silva por su apoyo y sobre todo por la libertad y la confianza que depositaron en mí para desarrollar esta investigación.

A la Dra. Pilar Morales, por sus valiosos consejos y por brindarme la oportunidad de llevar a cabo este proyecto en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas.

A mis padres por siempre apoyarme y enseñarme el valor del esfuerzo y la dedicación.

A Héctor, con quien compartí largas horas en el laboratorio. Su compañía y amistad hicieron de este tiempo una experiencia mucho más llevadera y agradable.

A Ricardo, quien desde el primer día confió en mí, me brindó su apoyo y estuvo a mi lado, incluso a la distancia.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1 Definición del problema y justificación	11
1.2 Hipótesis.....	12
1.3 Objetivo general.....	12
1.4 Objetivos específicos	12
2. ANTECEDENTES	14
2.1 Importancia de la cerveza en el mundo	14
2.2 La industria cervecera artesanal en México.....	16
2.3 Características fisicoquímicas.	17
2.4 Parámetros	17
2.5 Proceso de elaboración de cerveza.....	19
2.6 Bacterias ácido lácticas (BAL)	21
2.7 Bacterias ácido lácticas deterioradoras.	22
2.8 Fuentes de contaminación.....	25
2.9 Formación de biopelículas en los sistemas de dispensación.....	28
2.10 Productos sanitizantes.	29
3. MATERIALES Y MÉTODOS	31
3.1 Puntos de muestreo.	31
3.2 Elaboración de base de datos.	32
3.3 Selección de muestras.	32
3.4 Toma de muestras.....	33
3.5 Aislamiento e identificación de microorganismos.....	33
3.6 Capacidad de las BAL para producir biopelículas.....	34
3.7 Análisis estadístico.....	36
3.8 Efectividad de sanitizantes	36
3.9 Disposición de residuos.....	38
4. RESULTADOS	39
4.1 Selección de muestras	39
4.2 Identificación de BAL.....	40
4.3 Producción de biopelículas.....	51

4.4	Efectividad de sanitizantes	56
4.5	Propuesta del plan de sanitización	59
5	DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	60
5.1	Identificación de bacterias ácido lácticas (BAL).....	60
5.2	Producción de biopelículas.....	61
5.3	Eficiencia de sanitizantes	63
6.	CONCLUSIONES	67
7.	PERSPECTIVAS DEL TRABAJO	69
8.	LITERATURA CITADA	70
9.	APÉNDICES	74
	APÉNDICE A. BASE DE DATOS DE CERVEZAS ARTESANALES DISPONIBLES POR ESTABLECIMIENTO.....	76
	APÉNDICE B. PROCEDIMIENTO ESTANDARIZADO DE SANITIZACIÓN DEL SISTEMA DE DISPENSACIÓN DE CERVEZA DE BARRIL.....	81

LISTA DE TABLAS

Tabla I Cervezas seleccionadas en el proyecto	40
Tabla II Resultados de los muestreos realizados..	41
Tabla III Características macroscópicas y microscópicas de las cepas aisladas en el primer muestreo	41
Tabla IV Características macroscópicas y microscópicas de las cepas aisladas en el segundo muestreo	42
Tabla V Características macroscópicas y microscópicas de las cepas aisladas en el tercer muestreo	44
Tabla VI Resultados de pruebas bioquímicas	47
Tabla VII Correlación entre la presencia de bacterias ácido lácticas y los parámetros IBU, ABV y SRM	48
Tabla VIII Correlación entre la producción de biopelícula y parámetros IBU, ABV y SRM	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Principales países exportadores de cerveza en el año 2022.....	15
Figura 2 Escala SRM	18
Figura 3 Proceso general de elaboración de cerveza.....	20
Figura 4 Principales géneros bacterianos involucrados en la contaminación de cerveza en distintas etapas de producción	26
Figura 5 Establecimientos que cuentan con cerveza dispensada de barril.....	39
Figura 6 Morfología macroscópica y microscópica de <i>Lactobacillus casei</i>	46
Figura 7 Comparación de la producción de biopelícula de los distintos estilos de cerveza	49
Figura 8 Relación entre la concentración de cristal violeta y la concentración de etanol	50
Figura 9 Relación entre concentración de cristal violeta y el parámetro IBU de cada estilo de cerveza	51
Figura 10 Relación entre concentración de cristal violeta y el parámetro SRM de cada estilo de cerveza.....	52

NOMENCLATURA

MRS+	Medio Man, Rogosa y Sharpe modificado
BAL	Bacterias ácido lácticas
mL	Mililitros
µL	Microlitros
ppm	Partes por millón
UFC	Unidades formadoras de colonia
Min	Minuto
ACERMEX	Asociación Cervecera Mexicana
IBU	International Bitterness Unit
ABV	Alcohol by Volume
SRM	Standard Reference Method
mg	Miligramos
p/p	Peso/peso
fig.	Figura
EPS	Exopolisacárido
ZMM	Zona Metropolitana de Monterrey
ABD	Advance Beer spoilage Detection
nm	Nanómetro
A	Absorbancia

1. INTRODUCCIÓN

Desde hace miles de años, la cerveza ha formado parte de la humanidad. Según la ACERMEX, actualmente en México existen alrededor de 1200 cerveceras independientes, número que año con año se ve incrementado. Los sistemas de dispensación de cerveza de barril son una potencial fuente de contaminación, ya que, al no realizar una apropiada sanitización de sus componentes, pueden llegar a formar películas bacterianas que contaminen y deterioren el producto final (Quain, 2016). Esto provoca pérdidas económicas a productores y comerciantes por el estropeo del producto, por lo que es de suma importancia detectar los microorganismos causantes del deterioro de cerveza, así como establecer controles y buenas prácticas con el fin de minimizar el daño que puedan ocasionar.

La cerveza es la tercera bebida más consumida en el mundo. Si bien se trata de una industria sumamente próspera, existen diversos factores de riesgo para estas empresas, sobre todo para las cerveceras independientes que elaboran cerveza de forma artesanal. La cerveza es un líquido fermentado elaborado a partir de agua, malta, lúpulo y levadura (Sohrabvandi et al., 2020). Ha sido reconocida como una bebida microbiológicamente estable debido a que las sustancias presentes en ella, como el etanol, el dióxido de carbono y el lúpulo, la hacen un medio desfavorable para muchos microorganismos (Sakamoto & Konings, 2003). Adicional a esto, procesos como la pasteurización y la filtración reducen significativamente la presencia de microorganismos que puedan contaminar el producto y alterar su calidad (Goldammer, 2022). Algunos grupos

de bacterias tienen la capacidad de desarrollarse aún en las condiciones que se presentan en este medio. Las principales especies de microorganismos que han sido aisladas de muestras de cerveza deteriorada son *Lactobacillus brevis*, *L. lindneri* y *P. damnosus*, todas ellas pertenecientes al grupo de Bacterias Ácido Lácticas (BAL). Entre los principales indicadores de deterioro de cerveza por microorganismos se encuentran el incremento de turbidez, viscosidad, acidificación ya sea por ácido láctico o acético y aromas fenólicos. La cerveza artesanal tiene alta susceptibilidad de sufrir contaminación por BAL deterioradoras, ya que la mayoría no cuenta con controles estrictos de pasteurización y/o filtración de sus productos como las cervezas industrializadas (Goodman et al., 2020). La cerveza puede llegar a contaminarse a través de distintas fuentes (Baiano, 2021). Esta contaminación puede dividirse en dos tipos: La primaria, originada principalmente por el uso de materias primas en crudo y la contaminación secundaria que ocurre una vez que el producto terminado es embotellado, enlatado, embarrilado o una vez que es distribuido, ya sea por mal almacenamiento o durante el proceso de dispensación (Sakamoto & Konings, 2003). Según Zhenbo et al. (2020), más de la mitad de los problemas microbiológicos tanto de cerveza artesanal como de cerveza industrial son causados por contaminaciones secundarias.

Por lo anteriormente expuesto, el objetivo del presente proyecto fue determinar la presencia de bacterias ácido lácticas causantes de deterioro en cervezas artesanales dispensadas en barril producidas en el estado de Nuevo León. Además, se diseñó un procedimiento de sanitización para el sistema de

dispensación, con el objetivo de minimizar los incidentes de contaminación y por consiguiente, la merma de cerveza.

1.1 Definición del problema y justificación

El presente proyecto ayudó a determinar la presencia de bacterias ácido lácticas causantes de deterioro en cervezas artesanales en barril producidas en Nuevo León, las cuales son dispensadas en establecimientos de la Zona Metropolitana de Monterrey. Además, se propuso un plan de sanitización para mejorar el proceso de limpieza de los sistemas de dispensación.

Asimismo, la presente investigación surgió de la demanda expresa de productores locales, así como de dueños de establecimientos donde se dispensa cerveza artesanal, para buscar estrategias que minimicen el deterioro de producto y las mermas económicas que esto provoca.

1.2 Hipótesis

Existe una correlación entre la presencia y la capacidad de formar biopelículas de las cepas de BAL aisladas de muestras de cerveza artesanal dispensadas de barril y los parámetros IBU, ABV y SRM de cada estilo de cerveza.

1.3 Objetivo general

Aislar e identificar las cepas de BAL presentes en muestras de distintos estilos de cerveza artesanal producida en Nuevo León dispensadas de barril y determinar su capacidad para formar biopelículas.

1.4 Objetivos específicos

- Establecer una base de datos actualizada de establecimientos dentro de la Zona Metropolitana de Monterrey que cuenten con sistema de dispensación de cerveza artesanal de barril producida en Nuevo León.
- Recabar muestras de producto terminado de los principales establecimientos de la Zona Metropolitana de Monterrey que cuenten con sistema de dispensación de cerveza artesanal de barril.
- Aislar e identificar las bacterias ácido lácticas presentes en las muestras.
- Determinar la capacidad de formar biopelículas de las cepas aisladas.

- Comparar la capacidad de formar biopelículas de las BAL deterioradoras en relación con los distintos estilos de cerveza artesanal en el mercado.
- Analizar estadísticamente la relación entre la presencia de BAL y la capacidad para formar biopelículas y los parámetros IBU, ABV y SRM de cada estilo de cerveza.
- Evaluar la capacidad sanitizante de los productos más utilizados para la limpieza de las líneas del sistema de dispensación.
- Proponer acciones preventivas de sanitización para minimizar la carga bacteriana en las líneas del sistema de dispensación.

2. ANTECEDENTES

2.1 Importancia de la cerveza en el mundo

La cerveza es la tercera bebida más consumida a nivel mundial. Es un líquido fermentado elaborado a partir de agua, malta, lúpulo y levadura (Sohrabvandi et al., 2020). La cerveza ha sido reconocida desde hace miles de años como una bebida microbiológicamente estable, debido a que las sustancias presentes en ella, como el etanol, el dióxido de carbono y el lúpulo, la hacen un medio desfavorable para muchos microorganismos (Sakamoto & Konings, 2003). Adicional a esto, procesos como la pasteurización y la filtración reducen significativamente la presencia de microorganismos que puedan contaminar el producto y alterar su calidad (Goldammer, 2022).

Según Statista, en el año 2022 la producción a nivel global de cerveza fue de 1.86 billones de hectolitros en comparación con los 1.3 billones producidos en el año 1998. México es uno de los principales productores cerveceros, pues ocupa el lugar número 4 a nivel mundial, produciendo cerca de 134.7 millones de hectolitros; además México se ha mantenido durante la última década como el principal país exportador de cerveza, superando a países como Bélgica, Alemania y Países Bajos (INEGI). En la figura 1 se muestran los principales países exportadores de cerveza.

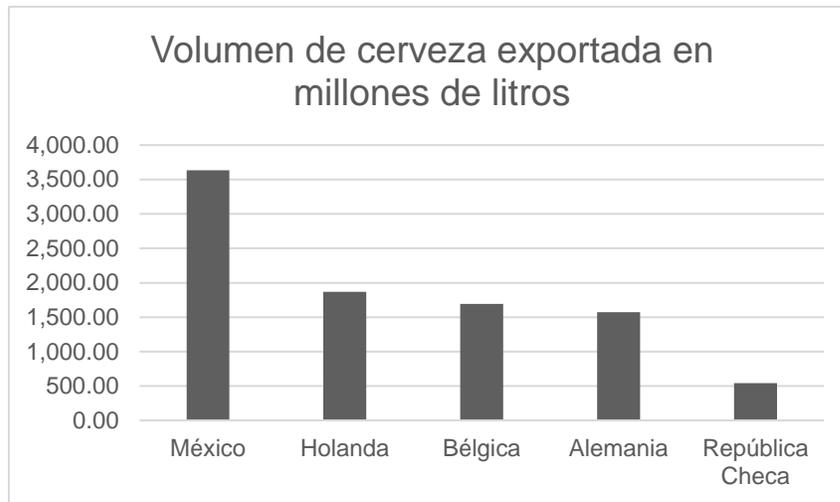


Figura 1 Principales países exportadores de cerveza en el año 2022. Datos de Statista.

Desde 1990, en Estados Unidos las cerveceras artesanales resurgieron como una alternativa a las cervezas convencionales, desatando una tendencia global que ha llegado a la mayoría de los países (Gómez-Corona et al., 2016).

El término cervecería artesanal, hace referencia a pequeñas empresas productoras de cerveza, que en comparación con las enormes cervecerías corporativas cuentan con las siguientes características: son empresas pequeñas que producen en volúmenes limitados, el cual, sumando todas las cervecerías artesanales de México no sobrepasa el 1% del mercado cervecero; son independientes de las cerveceras dominantes del mercado; son tradicionales, es decir, utilizan los 4 ingredientes tradicionales para su elaboración (agua, malta, lúpulo y levadura) (Baiano, 2021).

2.2 La industria cervecera artesanal en México.

En el año 2019, el total de cervecerías artesanales en el país era de 1020. Informes de la ACERMEX estiman que, para finales del 2022, México ya contaba con más de 1200 cerveceras independientes. Nuevo León ocupa el tercer lugar a nivel nacional en producción de cerveza artesanal, solo detrás de Jalisco y Baja California, quienes ocupan el primero y el segundo lugar, respectivamente. La producción de cerveza artesanal en el año 2021 fue de 25 millones de litros, equivalente al 0.21% de la producción total de cerveza en el país.

El consumo de cervezas artesanales en México se encuentra al alza. Tan solo en el año 2013 el consumo de cervezas artesanales en el país tuvo un aumento del 25% (Gómez-Corona et al., 2016). Actualmente, la cerveza artesanal en México está a punto de llegar al 1% de consumo total, significando para la industria un incremento importante de ganancias (ACERMEX).

La gran variedad de sabores, cuerpos, estilos, colores y aromas de las cervezas artesanales, en comparación con las cervezas producidas en masa, son por mucho las características que los consumidores buscan en esta bebida (Gómez-Corona et al., 2016).

2.3 Características fisicoquímicas.

La cerveza es considerada un producto microbiológicamente estable debido a su composición química. Entre los principales compuestos encontrados en esta bebida que aportan esta estabilidad podemos destacar: etanol que va desde los 0.5 hasta 10% p/p de concentración, diversas sustancias derivadas del lúpulo como los iso alfa-ácidos, encontrados en concentraciones de 10 a 75 ppm y que además tienen acción antimicrobiana, la alta concentración de dióxido de carbono (0.5% p/p), la baja cantidad de oxígeno disponible que generalmente es de menos de 0.1 ppm y pH que puede ir desde 3.8 a 4.7, además la cantidad de sustancias nutritivas es casi nula (Sakamoto & Konings, 2003). Las concentraciones de estos compuestos varían en cada estilo de cerveza por las materias primas y procesos con las que son elaboradas, sin embargo, existen distintos parámetros generalmente dados por fabricantes del producto, los cuales proporcionan al consumidor información acerca de las características organolépticas de la cerveza.

2.4 Parámetros

2.4.1 IBU

El amargor característico de las cervezas está dado en mayor medida por el lúpulo. El nivel de amargor es medido a través de unidades internacionales de amargor o IBU por sus siglas en inglés, una escala que mide la cantidad de iso alfa-ácidos presentes en la cerveza. El lúpulo contiene alfa-ácidos,

compuestos que durante el proceso de cocción del mosto se isomerizan convirtiéndose en iso alfa-ácidos, responsables del amargor de la bebida. Cada IBU es equivalente a 1 mg de alfa ácidos isomerizados por cada litro de cerveza. En la actualidad se conocen alrededor de 80 especies diferentes de lúpulo, cada uno aporta un perfil de aroma y sabor diferente, además de concentraciones variadas de alfa ácidos.

2.4.2 SRM

Es una escala estandarizada expresada en valores de van del 2 al 40, que determina la coloración que posee una cerveza. Las tonalidades de cada estilo de cerveza son producto de las materias primas utilizadas, el tipo y grado de tostado de las maltas y el tipo de proceso utilizado para su elaboración. En la figura 2 se muestra esta escala.

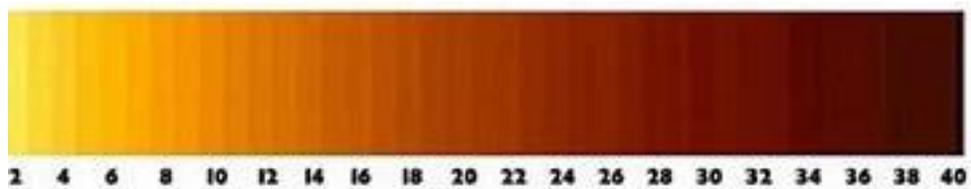


Figura 2 Escala SRM

2.4.3 ABV

El termino ABV es el acrónimo de Alcohol by Volume, el cual es una medida estándar que expresa la cantidad de alcohol presente en una bebida generalmente expresado en forma de porcentaje. El etanol presente es resultado del proceso de fermentación de los azúcares disponibles en el mosto por acción de la levadura. Por lo tanto, el contenido de alcohol dependerá de la cantidad de azúcares fermentables presentes, así como de la especie de levadura utilizada en el proceso.

2.5 Proceso de elaboración de cerveza.

La mayoría de las cervezas son elaboradas a partir de granos malteados. El proceso de malteado consiste en inducir el brote de los granos de cebada sumergiéndolos en agua, luego aplicarles un tratamiento de aire caliente para secarlos (Bokulich & Bamforth, 2013). Durante la germinación, se producen enzimas que actuarán sobre las moléculas de almidón de la malta, convirtiéndolas en azúcares fermentables durante el proceso de maceración. Una vez que el grano germina, se seca para detener la germinación, eliminando la humedad de las semillas. La malta obtenida se hornea a distintas temperaturas para así obtener diferentes grados de caramelización y tostado, lo cual le dará un perfil diferente en cuanto a color, aroma y sabor a cada cerveza en la que sean utilizadas.

Durante la maceración, los granos quebrados son remojados en agua caliente, provocando una serie de reacciones enzimáticas, de las cuales la principal es que las enzimas presentes en la malta actúen transformando el almidón en azúcares fermentables. Después el líquido resultante (ahora llamado mosto) es separado de los granos gastados y es hervido añadiendo lúpulo, el cual le conferirá aroma y amargor. Las proteínas coagulan en este paso, lo que favorece a la obtención de una cerveza más transparente. Finalizada la cocción, el mosto se enfría rápidamente y pasa de una temperatura de 100°C a 18-24°C para que la levadura pueda ser inoculada y comenzar el proceso de fermentación, en el cual los azúcares serán convertidos en etanol y dióxido de carbono. La fermentación requiere de 7 a 10 días aproximadamente. Luego de esto, la cerveza pasa por otros tratamientos, como la clarificación, la carbonatación y embotellado, enlatado o embarrilado (Bamforth, 2017). En la figura 3 se muestra el proceso general de elaboración de cerveza.

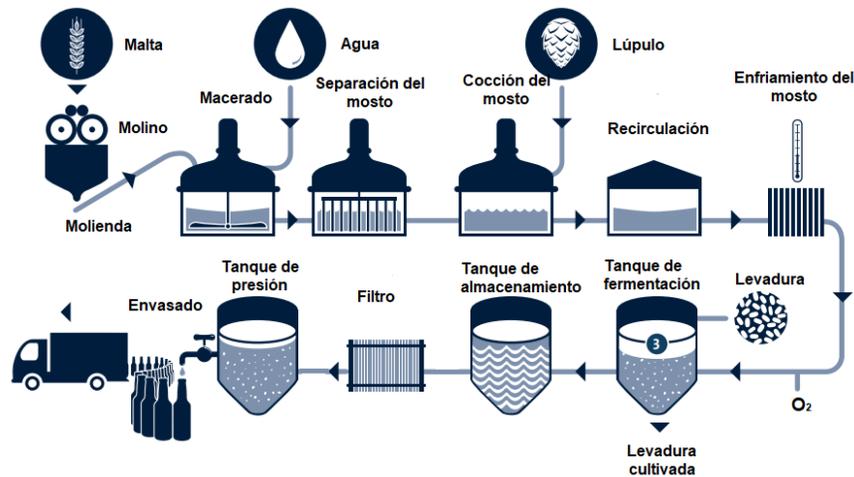


Figura 3 Proceso general de elaboración de cerveza. Imagen tomada y modificada de www.chromacademy.com

2.6 Bacterias ácido lácticas (BAL).

Las BAL son un grupo de microorganismos capaces de producir ácido láctico como primer o único metabolito de la fermentación de carbohidratos (Wang et al., 2021). Las BAL contribuyen con el sabor, aroma y textura de algunos alimentos fermentados, gracias a la hidrólisis de proteínas presentes, así como la producción de exopolisacáridos. Algunos alimentos también elevan su valor nutricional una vez ocurrido el proceso de fermentación, por lo que las BAL desempeñan un papel muy importante en la industria alimentaria (Goldammer, 2022).

Las bacterias ácido lácticas son generalmente cocos o bacilos Gram positivos, catalasa negativos, no esporuladas. Son aerotolerantes, sin embargo, también se han encontrado géneros anaerobios estrictos, incapaces de sintetizar

citocromos y llevar a cabo la fosforilación oxidativa. Son ácidotolerantes, soportando niveles de pH de 4.

A pesar de sus características, el crecimiento indeseado y descontrolado de distintas cepas de BAL representa un serio problema en la producción y manejo de algunos alimentos y bebidas a nivel mundial, sobre todo en la industria cervecera (Bergsveinson & Ziola, 2017).

2.7 Bacterias ácido lácticas deterioradoras.

La cerveza es un medio hostil para el desarrollo microbiano. A pesar de ello, algunos grupos de bacterias tienen la capacidad de desarrollarse en las condiciones que se presentan en este medio.

Los géneros más comunes de BAL encontradas en cerveza son *Lactobacillus* y *Pediococcus*, siendo las especies predominantes *L. brevis*, *L. linderni* y *P. damnosus* (Bergsveinson & Ziola, 2017). Solo algunas especies de bacterias Gram negativo tienen la capacidad de deteriorar cerveza. Debido a la implementación de nuevas tecnologías en las cerveceras modernas, el oxígeno presente en el producto final se ha visto reducido drásticamente, por lo que géneros de bacterias anaerobias estrictas como *Pectinatus spp* y *Megasphaera cereviceae* han comenzado a producir deterioro en cervezas, debido a la creación de ambientes favorables para su desarrollo (Sakamoto & Konings, 2003).

Entre algunos de los indicadores de deterioro de cerveza por microorganismos se encuentran el incremento de la turbidez, viscosidad, acidificación ya sea por ácido láctico o acético, aromas fenólicos, diacetil o a mantequilla. Otras características menos comunes son los aromas producidos por el sulfuro de hidrógeno, aromas afrutados producidos por ésteres o a "calcetas sudadas" producido por ácidos grasos de cadena corta (Schneiderbanger et al., 2020).

Los principales microorganismos deterioradores encontrados en cerveza son los siguientes:

- *Lactobacillus*

Lactobacillus representa la especie más prevalente en casos reportados de deterioro de cerveza, estimando un 60 - 70% de todos los casos (Goldammer, 2022). Es importante mencionar que solo un pequeño grupo de *Lactobacillus* son capaces de crecer y deteriorar este medio. *L. brevis* es el principal deteriorador de esta especie, siendo detectado frecuentemente tanto en cervezas como en equipos y utensilios dentro de las cervecerías. Generalmente es resistente a los componentes del lúpulo (Sakamoto & Konings, 2003).

L. lindneri es la segunda especie de lactobacilo más comúnmente aislado al cual se le adjudica el 25% de todos los incidentes de deterioro de producto. Todas las cepas de *L. lindneri* son capaces de producir deterioro de la cerveza, en comparación con otros lactobacilos que tienen cepas que lo causan y otras que no lo hacen. Crece de manera óptima a 19-23°C, además sobrevive a tratamientos de calor más altos que otras BAL (Sakamoto & Konings, 2003).

- *Pediococcus*

Bacteria homofermentativa encontrada en arreglos de pares o tétradas. Causa acidez y viscosidad en el producto, así como grandes cantidades de diacetil lo que ocasiona que adquiera un olor parecido a la mantequilla. Pueden encontrarse en distintas etapas del proceso de producción. *P. damnosus* es la especie más común dentro de los *Pediococcus* que puede causar deterioro de la cerveza. Es responsable del 90% de todos los casos de deterioro causados por este género (Goldammer, 2022; Schneiderbanger et al., 2020)

Como ya se mencionó anteriormente, la cerveza artesanal tiene alta susceptibilidad de sufrir contaminación por BAL deterioradoras, ya que la mayoría no cuenta con controles estrictos de pasteurización y/o filtración de sus productos como las cervezas industrializadas (Goodman et al., 2020). Hoy en día, no existe una Norma Mexicana que regule el proceso de producción de cerveza artesanal, así como tampoco que establezca las especificaciones fisicoquímicas y microbiológicas que deba cumplir el producto terminado. La contaminación microbiológica puede comprometer no solo la calidad del producto, sino también tener efectos negativos en su comercialización y gusto por los consumidores. Además, el deterioro del producto provoca a las cerveceras independientes importantes pérdidas económicas, por lo que dicha regularización ayudaría no solo a detonar la industria de las cervezas artesanales, sino también a la producción de bebidas de calidad superior.

2.8 Fuentes de contaminación.

La cerveza puede llegar a contaminarse a través de distintas fuentes y así perder su estabilidad microbiológica (Baiano, 2021). La contaminación del producto puede dividirse en dos tipos. La contaminación primaria, originada principalmente por el uso de materias primas en crudo, así como por la utilización de tanques u otros materiales e instrumentos que no fueron debidamente lavados y sanitizados, y la contaminación secundaria que ocurre una vez que el producto está terminado, durante las etapas de embotellado, enlatado o embarrilado o una vez que el producto es distribuido, ya sea por mal almacenamiento o durante la dispensación (Sakamoto & Konings, 2003). Según Zhenbo et al. (2020), más de la mitad de los problemas microbiológicos tanto de cerveza artesanal como de cerveza industrial son causados por contaminaciones secundarias, siendo *L. brevis* la especie deterioradora predominante en la mayoría de los casos.

2.8.1 Contaminación primaria de cerveza.

Durante el proceso de elaboración de la cerveza, es posible que las bacterias puedan llegar a contaminar el producto debido a que el contenido de azúcares, cereales y agua del mosto lo convierten en un ambiente muy nutritivo para los microorganismos (Bokulich & Bamforth, 2013). La malta, el lúpulo y otros cereales no malteados suelen traer consigo microorganismos causantes de esta contaminación. El mismo caso se presenta con el agua utilizada durante el

proceso de maceración, por lo que esta suele ser hervida antes para evitar una contaminación. En general los microorganismos presentes en estas materias primas no representan un gran problema, ya que una vez que el mosto entra en el proceso de cocción se esterilizará. Sin embargo, después de este paso, durante la etapa de enfriamiento y adición de la levadura, el mosto es muy vulnerable a microorganismos oportunistas que pueden añadirse junto con la levadura o por una mala desinfección de los equipos y materiales utilizados (Goldammer, 2022). Una vez que el mosto es convertido en cerveza por acción de la levadura, la probabilidad de una contaminación disminuye, sin embargo, bacterias ácido lácticas aún pueden causar una contaminación del producto durante el almacenamiento, trasvase, embotellado, llenado de barriles y dispensación del producto final. En la figura 4 se muestran los principales microorganismos encontrados en las distintas etapas del proceso de producción de cerveza.

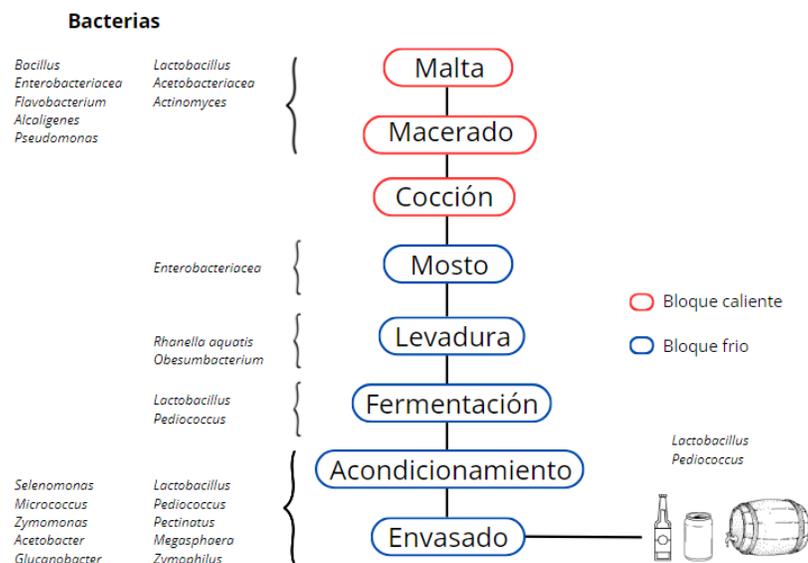


Figura 4 Principales géneros bacterianos involucrados en la contaminación de cerveza en distintas etapas de producción.

2.8.2 Contaminación secundaria de cerveza.

Buenas prácticas de higiene y una limpieza regular de las líneas son clave para garantizar la calidad del producto (Mallett & Quain, 2019).

Aumentos en la temperatura de almacenamiento, exposición a la luz, excesiva agitación y deficiente hermeticidad son algunos de los factores que pueden interferir en la calidad de la cerveza una vez que esta abandona el lugar de producción, promoviendo el desarrollo de microorganismos. Aún almacenado a óptimas condiciones, el tiempo que permanece el producto en almacén aumenta también la probabilidad de deterioro por microorganismos.

Inevitablemente toda la cerveza que es dispensada tiende a presentar contaminación microbiológica, aun así, la higiene de los sistemas de dispensación ha recibido muy poca atención a través de los años (Mallett & Quain, 2019a). Los sistemas de dispensación representan una amenaza para la estabilidad microbiológica del producto, ya que el sistema involucra la introducción de piezas dentro del barril, por lo que la calidad de la cerveza dependerá en gran medida de las condiciones de almacenamiento e higiene del sistema de dispensación (Bokulich & Bamforth, 2013). Al encontrarse en establecimientos como bares o restaurantes, los sistemas de dispensación pueden permitir la entrada de microorganismos presentes en el ambiente en momentos clave, al abrir las llaves del dispensador o al realizar los cambios de barriles y, debido a la presencia de concentraciones altas de oxígeno y temperaturas mayores en ciertos puntos del sistema, los microorganismos pueden lograr establecerse y desarrollarse (Quain, 2016). En muchas

ocasiones, los barriles de cerveza han demostrado estar libres de microorganismos contaminantes al ser entregados en los establecimientos. Sin embargo, después de estar acoplados al sistema de dispensación, comienzan a mostrar signos de deterioro (Bokulich & Bamforth, 2013; Storgårds, 2000). Los lugares en el sistema de dispensación donde generalmente se encuentra contaminación microbiana es en las "áreas muertas" como las tapas del barril, llaves dispensadoras y colectores; aunque la contaminación persistente siempre está asociada a la adhesión de microorganismos a superficies, por lo tanto, la línea de dispensación, al ser el área más grande del sistema, representa la principal superficie en la cual las bacterias pueden adherirse y formar biopelículas (Storgårds, 2000). Generalmente, los procedimientos de limpieza realizados rutinariamente no son suficientes para la alta carga microbiana presente en los sistemas de dispensación. Buenas prácticas de higiene y una limpieza regular y eficiente de las líneas de dispensación son clave para garantizar la calidad del producto (Mallett & Quain, 2019; Storgårds, 2000).

2.9 Formación de biopelículas en los sistemas de dispensación.

Las biopelículas son un consorcio funcional de microorganismos adheridos a una superficie. Representan una real amenaza para el proceso y la calidad del producto; su formación generalmente se da en las líneas de llenado, así como en los sistemas de dispensación de cerveza de barril. (Jevons & Quain, 2021; Quain, 2016). Las líneas de los sistemas de dispensación generalmente están

fabricadas de policloruro de vinilo (PVC), polietileno y nylon, materiales que tienden a favorecer la producción de biopelículas por microorganismos deterioradores (Storgårds, 2000). El control de estos microorganismos es logrado mediante la eliminación de las fuentes de contaminación. Requerir de limpiezas muy frecuentes indica que el sistema no ha sido completamente sanitizado, por lo cual, el recrecimiento de las biopelículas es inevitable. Los conectores, así como las líneas del sistema suelen ser fuentes de recrecimiento (Quain, 2016).

La matriz de biopelículas producidas por bacterias del género *Lactobacillus* no han sido lo suficientemente investigadas, sin embargo, han demostrado tener capacidad de resistencia a ciertos químicos que comúnmente son utilizados como desinfectantes y sanitizantes (Fernández Ramírez et al., 2015).

2.10 Productos sanitizantes.

El uso de productos sanitizantes es un paso esencial dentro de las prácticas de higiene de cualquier empresa dedicada al área de alimentos. Estos productos reducen la cantidad de microorganismos patógenos y deterioradores que pueden estar presentes tanto en utensilios como en equipos, minimizando la probabilidad de una contaminación microbiana. Entre los sanitizantes más utilizados en el área alimenticia podemos mencionar a los productos con base ácido y yodo.

2.10.1 Sanitizantes ácidos.

Los ácidos inorgánicos, así como algunos orgánicos son comúnmente utilizados en la industria de alimentos durante procesos de limpieza y sanitización de equipos y superficies. En el mercado existen formulaciones de ácido fosfórico en conjunto con ácidos orgánicos efectivos en la eliminación de biopelículas de microorganismos, así como en la remoción de residuos minerales. Suelen ser utilizados en concentraciones de 500 ppm.

El ácido fosfórico actúa desnaturalizando proteínas presentes en la membrana celular y en otras estructuras microbianas, haciendo que estas pierdan su actividad. También provoca una disminución drástica del pH del medio, condición en que la mayoría de los microorganismos no puede sobrevivir. Con respecto al EPS presente en las biopelículas, el ácido fosfórico provoca que los polisacáridos se desestabilicen, la biopelícula pierda cohesión y finalmente sea eliminada.

2.10.2 Sanitizantes base yodo.

Comercialmente existen tres formas de sanitizantes a base de yodo: Lugol, soluciones alcohólicas de yodo y yodóforos, siendo estos últimos los más utilizados y efectivos. Los sanitizantes a base de yodo actúan en contra de la mayoría de las bacterias, hongos y levaduras cuando es utilizado a concentraciones de 25 ppm. Un dato importante es que los yodóforos actúan efectivamente en un rango muy amplio de pH que va desde 2 hasta 10, además de ser menos corrosivos en comparación con el cloro.

El yodo actúa penetrando a treves de la membrana celular e interfiriendo en la síntesis de proteínas bacterianas, además al ser un compuesto oxidante puede causar cambios irreversibles en distintas biomoléculas dentro de la célula. En cuanto a los EPS que conforman las biopelículas, el yodo puede adentrarse en esta matriz e interaccionar con los polisacáridos haciendo que las uniones entre estos se debiliten y sea más susceptible la degradación.

Al ser utilizados adecuadamente, estos compuestos son muy efectivos, sin embargo, algunas de las desventajas que presentan este tipo de productos es su costo, ya que suelen ser mucho más costosos que el cloro. Así mismo, los compuestos a base de yodo suelen manchar los equipos y utensilios de un color amarillo ocre.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Puntos de muestreo.

Se realizó una búsqueda exhaustiva de los establecimientos dentro de la ZMM que cuentan con venta de cerveza artesanal dispensada de barril. Dicho listado está basado en establecimientos operando hasta octubre del año 2023. Los negocios fueron monitoreados por un periodo de 6 meses para observar cuales de ellos se mantenían trabajando de manera continua, así como el movimiento de los estilos de cervezas dispensadas en el mercado.

3.2 Elaboración de base de datos.

Se elaboró una base de datos de las cervezas artesanales encontradas en establecimientos dentro de la ZMM que cuentan con dispensación de barril. Toda la información fue obtenida mediante visitas a establecimientos, páginas web y redes sociales de estos. La base de datos se dividió en dos partes. La primera muestra las cervezas artesanales disponibles en cada establecimiento y la segunda detalla el estilo de cerveza, así como los parámetros IBU, SRM y ABV de cada una de ellas.

3.3 Selección de muestras.

Analizando la información obtenida en la base de datos, fueron seleccionadas las cervezas artesanales que mejor se adaptaban a los requerimientos de esta investigación. Se tomaron en cuenta distintos criterios para hacer dicha elección:

- Cervezas de estilos diferentes que presentaran valores de parámetros IBU, ABV y SRM distintos.
- Cervezas de línea, que no fueran de temporada y se pudieran encontrar en cualquier época del año.
- Cervezas encontradas en al menos dos establecimientos diferentes, esto para realizar una comparativa de la calidad del mismo producto en diferentes sistemas de dispensación.

Las muestras de cerveza artesanal fueron recolectadas durante los meses de agosto, septiembre y octubre del 2023. Cada estilo de cerveza fue muestreado en dos diferentes establecimientos, se realizaron tres rondas de muestreos dejando alrededor de tres semanas entre cada ronda. El número total de muestras analizadas fue de 42.

3.4 Toma de muestras

Para realizar la toma de muestras se utilizaron jeringas estériles y vasos para muestra estériles. Las muestras fueron tomadas directamente del vaso en que la cerveza fue dispensada y se transportaron en una hielera manteniéndose a una temperatura de 4°C hasta el momento de ser procesadas.

3.5 Aislamiento e identificación de microorganismos

Para el aislamiento de las cepas de BAL deterioradoras de cerveza presentes en las muestras se realizó una combinación entre las metodologías descritas por Mallett et al. (2018) y Goodman et al. (2020). Se realizó un método de forzado, el cual fue diseñado para amplificar el estado microbiológico de la cerveza al momento de la dispensación y que refleja la calidad de limpieza del sistema de dispensación en su totalidad. Este método se realizó tomando 50mL de cada muestra, se colocaron en tubos estériles de fondo cónico y se incubaron a 30°C por 4 días. Luego se sembró en placas de agar MRS que fue modificado añadiendo 100 mg/L de cicloheximida y ajustando el pH a 5

utilizando ácido tartárico al 10%. Las muestras fueron incubadas a 30°C en condiciones anaeróbicas por aproximadamente 5 días. Se hizo tinción Gram a las colonias resultantes. Las colonias Gram positivo fueron resembradas en agar MRS+ hasta la obtención de cultivos puros.

Una vez que se obtuvieron cepas puras, se realizaron pruebas bioquímicas para identificar las especies aisladas. Se realizó prueba de catalasa a todas las cepas. Para la prueba de fermentación de azúcares fue utilizado caldo rojo de fenol y los azúcares: maltosa, rafinosa, celobiosa, lactosa, galactosa, manitol, D-arabinosa, xilosa, sacarosa y manosa. Las muestras positivas mostraron un viraje en la coloración del medio, de rojo a amarillo. Para identificar las especies aisladas fue utilizado el software ABIS. ABIS es una base de datos online que puede ser una herramienta útil en la identificación de especies bacterianas basándose en la morfología, características bioquímicas, características macroscópicas y microscópicas de los cultivos. El software hace recomendaciones de las mejores pruebas bioquímicas a realizar. La calidad de los resultados dependerá del número de pruebas realizadas, siendo requeridas al menos 8 pruebas para que el programa de un resultado confiable. Una vez realizadas las pruebas bioquímicas, los resultados se descargaron en el software, el cual proporcionó el género y especie de las bacterias que tenían una mayor coincidencia con las presentes en la base de datos.

3.6 Capacidad de las BAL para producir biopelículas

La determinación de la capacidad para formar biopelículas se realizó con base en la metodología descrita por Jevons & Quain (2021). Se prepararon tubos con 5mL de caldo *Lactobacillus* y se inocularon cada una de las cepas aisladas. Los tubos se incubaron a 30°C por 48 horas. La absorbancia de todos los cultivos fue ajustada con la ayuda de un espectrofotómetro a $A_{660}=0.2$ para tener una concentración de microorganismos de aproximadamente 3×10^8 UFC/mL.

En una microplaca de 98 pocillos se añadieron 20µL del cultivo que contenía la cepa aislada y 180µL de cada cerveza. La cerveza utilizada como medio de cultivo fue previamente filtrada al vacío usando membranas de 0.45µm. El volumen total fue de 200µL en todos los pocillos. Como control negativo se utilizaron 20µL de caldo sin inocular y 180µL de cerveza filtrada. Cada muestra se sembró por sextuplicado.

Las microplacas fueron incubadas en condiciones anaerobias a 30°C por 7 días. Después, cada pocillo se lavó utilizando agua destilada y la placa se dejó secar a temperatura ambiente. Se agregaron 180µL de cristal violeta a cada uno de los pocillos y se dejó actuar por 45 minutos. Los pocillos se lavaron con agua destilada y se dejaron secar a temperatura ambiente. Una vez que las biopelículas fueron teñidas, a cada pocillo se le agregaron 180µL de etanol al 96% por 45 minutos para extraer el cristal violeta retenido, luego con la ayuda de una micropipeta se mezcló el contenido de los pocillos y se transfirió a una microplaca nueva. La concentración de cristal violeta extraído es proporcional a la cantidad de biopelícula formada, es decir, una mayor absorbancia

corresponde a una cantidad mayor de biopelícula producida por las bacterias presentes en la muestra.

Para cuantificar la concentración de cristal violeta retenido por las biopelículas, la absorbancia fue medida a una longitud de onda de 570nm en un lector de microplacas.

3.7 Análisis estadístico

Para determinar la correlación entre la presencia de bacterias ácido lácticas y los parámetros de cada marca de cerveza se realizó un análisis de correlación biserial puntual. Para determinar la relación entre la producción de biopelícula y los valores IBU, ABV y SRM de cada estilo de cerveza se realizó un análisis de correlación de Pearson.

3.8 Efectividad de sanitizantes

La determinación de efectividad de sanitizantes se basó en la metodología descrita por Jevons & Quain (2021). Se hicieron crecer biopelículas de cada cepa de *Lactobacillus* identificado por periodos de 7, 14 y 21 días usando microplacas de 96 pocillos usando cerveza Lager light como medio de cultivo. Se probaron los tres productos más utilizados para sanitizar los sistemas de dispensación de barril imitando el proceso de sanitización de acuerdo con el tiempo y concentración recomendados por los fabricantes de los productos.

Los ingredientes activos de los productos analizados son: 1) yodo (Iod-star), 2) ácido fosfórico con ácido dodecilbenceno sulfónico (Starsan) y 3) ácido fosfórico con ácido oléico sulfonado (Saniclean).

Para el ensayo con el producto de yodo se prepararon soluciones de 25 y 50 ppm (0.078 y 0.156mL de producto en 50mL de agua destilada). Se retiró el contenido de la microplaca y se realizó un lavado suave con agua destilada para retirar por completo cualquier resto de medio de cultivo. Se hizo un pre-enjuague con la solución de 50 ppm, luego se retiró de nuevo el contenido y se añadieron 180 µL de la solución de 25 ppm dejándolo actuar por dos minutos. Pasado el tiempo se retiró el producto y se dejó secar a temperatura ambiente.

Para la prueba con Starsan se preparó una solución de 780 ppm de H₃PO₄ en agua destilada. Se retiró el contenido de la placa, se realizó un lavado suave con agua destilada para retirar las células sésiles y se dejó secar a temperatura ambiente. Luego se añadieron 180 µL de la solución de ácido fosfórico y se dejó actuar por un minuto. Pasado el tiempo se retiró el producto y se dejó secar a temperatura ambiente.

Por último, para probar la eficiencia de Saniclean se preparó una solución de 130µL de producto en 50mL de agua destilada. Se retiró el contenido de la microplaca, se lavó suavemente con agua destilada, luego se añadieron 180µL de la solución sanitizante y se dejó actuar por tres minutos. Después el contenido se retiró y se dejó secar a temperatura ambiente.

Una vez que las placas secaron, se agregaron 200µL de caldo *Lactobacillus* a cada pocillo y las microplacas se incubaron por 7 días a 30°C en condiciones anaerobias. Después de este periodo de incubación, el contenido de cada pocillo se recombino con la ayuda de una micropipeta, luego se midió la absorbancia utilizando un lector de microplacas a una longitud de onda de 660nm para determinar el nivel de recrecimiento bacteriano y por lo tanto la efectividad de los productos para eliminar las biopelículas formadas.

3.9 Disposición de residuos

La disposición de residuos generados se llevó a cabo siguiendo los lineamientos establecidos por la Facultad de Ciencias Químicas (PR-CLB-SRR/002) utilizando el sistema de identificación y disposición en contenedores asignados para cada uno de los reactivos utilizados y/o generados. Estos siendo principalmente la neutralización de ácidos y esterilización de material con residuos celulares.

4 RESULTADOS

4.1 Selección de muestras

La figura 5 muestra los establecimientos dentro de la ZMM que hasta octubre del año 2023 contaban con venta de cerveza artesanal dispensada de barril.

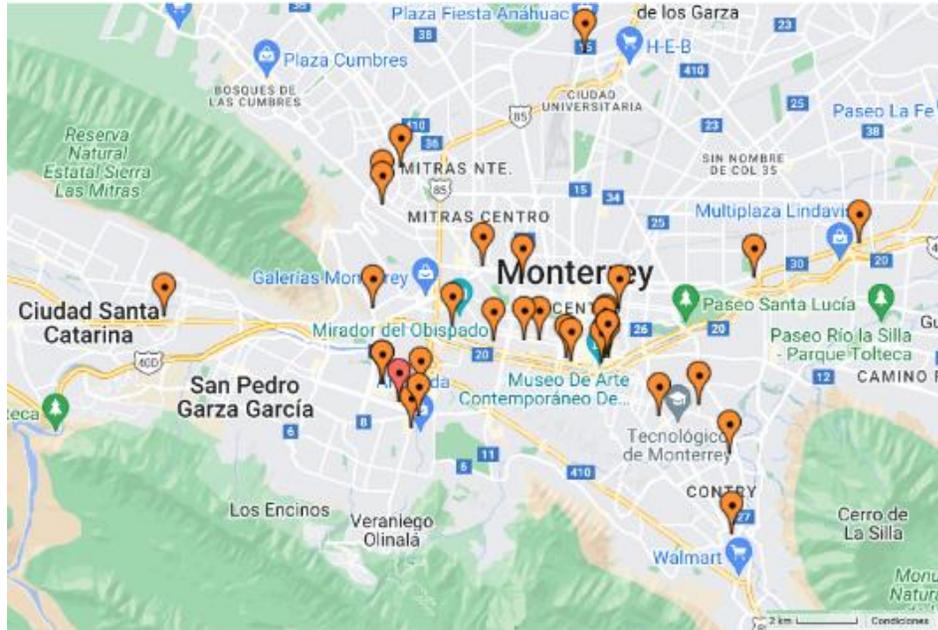


Figura 4 Establecimientos que cuentan con cerveza dispensada de barril.
Elaborado en: www.zeemaps.com

Los marcadores color naranja muestran la ubicación de estos establecimientos.

La base de datos completa puede encontrarse en el Apéndice A.

A partir del análisis de la información recabada, identificamos siete cervezas con las características necesarias para llevar a cabo este proyecto de investigación.

Las marcas de cervezas, así como los nombres de los establecimientos fueron omitidos por cuestiones de confidencialidad, en su lugar se utilizaron claves para identificar cada muestra. Los datos de cada cerveza utilizada en esta investigación se encuentran en la tabla 1.

TABLA 1

CERVEZAS SELECCIONADAS EN EL PROYECTO. SE MUESTRAN LOS PARÁMETROS IBU, ABV Y SRM DE CADA CERVEZA.

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

4.2 Identificación de BAL.

Se tomaron en total 42 muestras de cerveza artesanal, de las cuales 31 presentaron bacilos Gram positivos. Cada cerveza se muestreó en dos establecimientos diferentes, identificados como A y B. La tabla 2 muestra el total de cervezas analizadas, las rondas de muestreo en cada establecimiento y la presencia o ausencia de BAL en cada muestra.

TABLA 2

RESULTADOS DE LA PRESENCIA DE BAL EN LOS MUESTREOS REALIZADOS.

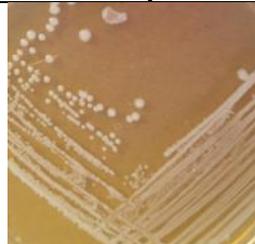
Estilo/ Establecimiento	Primer muestreo		Segundo muestreo		Tercer muestreo	
	A	B	A	B	A	B
Lager light	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Witbier	✓	x	x	x	✓	x
Brown ale	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Stout	✓	✓	✓	✓	✓	✓
IPA	x	✓	✓	✓	x	✓
WC IPA	✓	✓	✓	x	✓	x
IPA imperial	✓	✓	x	x	✓	x

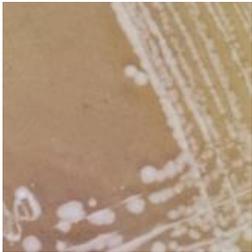
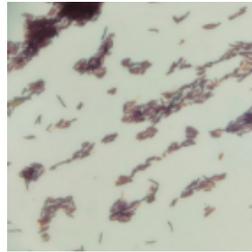
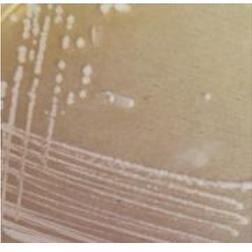
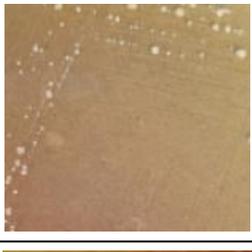
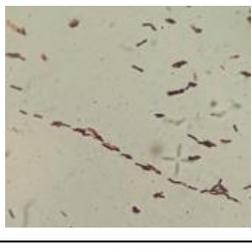
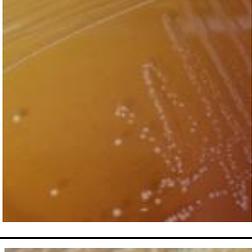
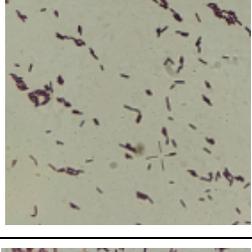
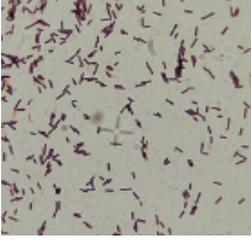
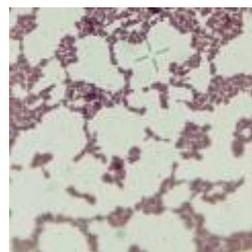
Presencia (✓), ausencia (x).

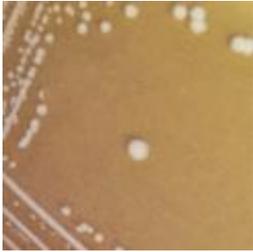
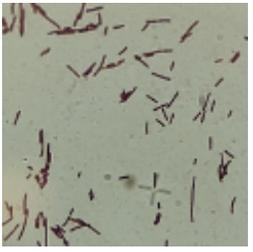
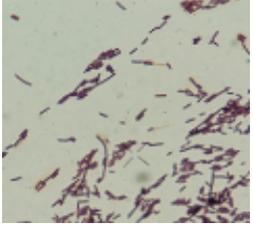
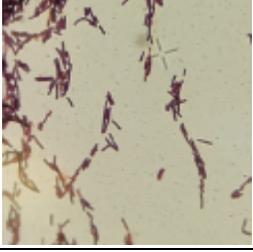
La primera ronda de muestreos fue realizada durante el mes de agosto de 2023. De las 14 muestras analizadas, 12 tuvieron presencia de BAL. Las cepas aisladas se muestran en la tabla 3.

TABLA 3

CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS Y MICROSCÓPICAS DE LAS CEPAS AISLADAS EN EL PRIMER MUESTREO.

Morfología macroscópica	Morfología microscópica	Observaciones
		Lager light. Establecimiento A Morfología macroscópica: Colonias blancas, medianas, redondas, cremosas Morfología microscópica: Bacilos cortos Gram+

		Lager light. Establecimiento B Morfología macroscópica: Colonias blancas, medianas, redondas, cremosas Morfología microscópica: Bacilos Gram+
		Witbier. Establecimiento A Morfología macroscópica: Colonias blancas, pequeñas, redondas, cremosas Morfología microscópica: Bacilos Gram+
		IPA. Establecimiento B Morfología macroscópica: Colonias blancas, pequeñas, redondas, cremosas Morfología microscópica: Bacilos Gram+
		Brown ale. Establecimiento A Morfología macroscópica: Colonias blanquecinas, pequeñas, redondas, cremosas Morfología microscópica: Bacilos Gram+
		Brown ale. Establecimiento B. Morfología macroscópica: Colonias blancas, medianas, redondas, cremosas Morfología microscópica: Bacilos Gram+
		Stout. Establecimiento A Morfología macroscópica: Colonias blancas, pequeñas, redondas, cremosas Morfología microscópica: Bacilos cortos Gram+

		Stout. Establecimiento B. Morfología macroscópica: Colonias blancas, medianas, redondas, cremosas Morfología microscópica: Bacilos largos Gram+
		WC IPA Establecimiento A Morfología macroscópica: Colonias blancas, medianas, redondas, cremosas Morfología microscópica: Bacilos largos Gram+
		WC IPA. Establecimiento B Morfología macroscópica: Colonias blanquecinas, pequeñas, redondas, cremosas Morfología microscópica: Bacilos largos Gram+
		IPA imperial. Establecimiento A Morfología macroscópica: Colonias blancas, medianas, redondas, cremosas Morfología microscópica: Bacilos largos Gram+
		IPA imperial. Establecimiento B Morfología macroscópica: Colonias blancas, pequeñas, redondas, cremosas Morfología microscópica: Bacilos Gram+

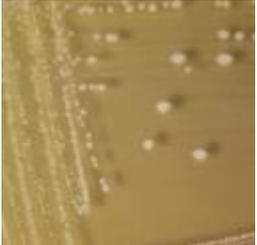
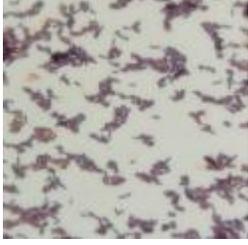
Macroscópicamente se observaron colonias blancas, ligeramente translúcidas, pequeñas o medianas, cremosas, redondas y algunas irregulares. Microscópicamente se encontraron bacilos Gram positivos individuales o formando cadenas cortas. En las muestras Stout B, WC IPA A e IPA imperial A los bacilos se observaban más delgados y alargados en comparación a los

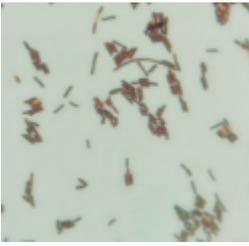
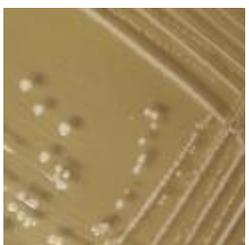
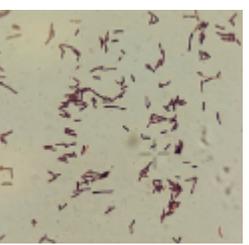
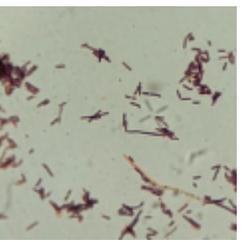
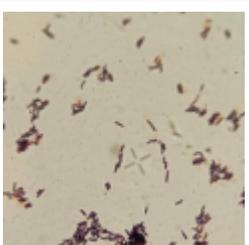
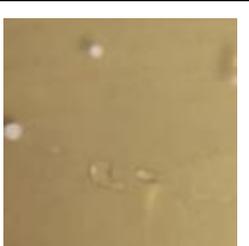
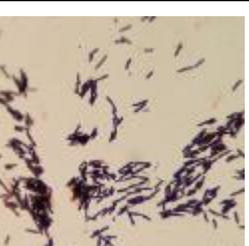
encontrados en las muestras de Lager light A y Stout A que eran más cortos y redondeados.

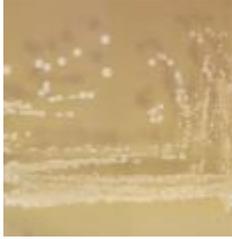
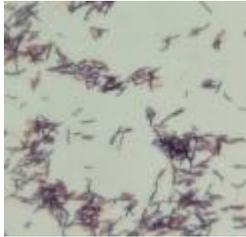
Durante la segunda ronda de muestreo, realizada en el mes de septiembre del 2023, 9 de las 14 muestras tuvieron presencia de bacilos Gram positivos. Se observaron colonias blancas, pequeñas o medianas, redondas o de forma irregular y de consistencia cremosa. En cuanto a la morfología microscópica se encontraron bacilos Gram positivos, individuales y formando cadenas cortas. En la tabla 4 se muestra la morfología macroscópica y microscópica de las cepas aisladas.

TABLA 4

CEPAS AISLADAS DEL SEGUNDO MUESTREO. EN LA COLUMNA IZQUIERDA SE MUESTRAN LAS COLONIAS EN AGAR MRS+ Y ENSEGUIDA SE MUESTRA LA MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA OBSERVADA A 100X USANDO TINCIÓN GRAM.

Morfología macroscópica	Morfología microscópica	Observaciones
		<p>Lager light. Establecimiento A Morfología macroscópica: Colonias blanquecinas, medianas, redondas, cremosas Morfología microscópica: Bacilos cortos Gram+</p>
		<p>Lager light. Establecimiento B Morfología macroscópica: Colonias blancas, pequeñas, redondas, cremosas Morfología microscópica: Bacilos Gram+</p>

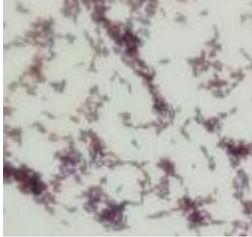
		Brown ale. Establecimiento A Morfología macroscópica: Colonias blancas, pequeñas, redondas, cremosas Morfología microscópica: Bacilos Gram+
		Brown ale. Establecimiento B Morfología macroscópica: Colonias blancas, medianas, redondas, cremosas Morfología microscópica: Bacilos largos Gram+
		Stout. Establecimiento A Morfología macroscópica: Colonias blancas, medianas, redondas, cremosas Morfología microscópica: Bacilos Gram+
		Stout. Establecimiento B Morfología macroscópica: Colonias blancas, medianas, redondas, cremosas Morfología microscópica: Bacilos largos Gram+
		IPA. Establecimiento A Morfología macroscópica: Colonias ligeramente blanquecinas, pequeñas, redondas, cremosas Morfología microscópica: Bacilos Gram+
		IPA. Establecimiento B Morfología macroscópica: Colonias blancas, medianas, redondas, cremosas Morfología microscópica: Bacilos largos Gram+

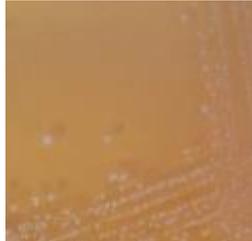
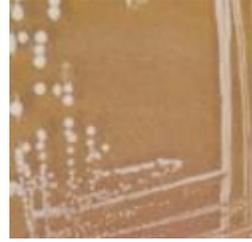
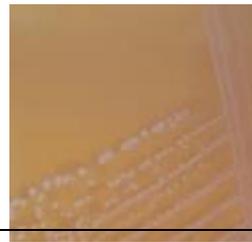
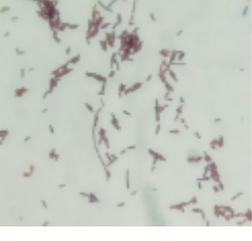
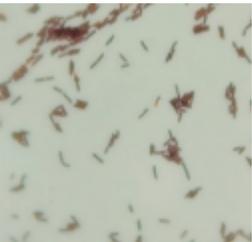
		<p>WC IPA. Establecimiento A Morfología macroscópica: Colonias blancas, pequeñas, redondas, cremosas Morfología microscópica: Bacilos largos Gram+</p>
---	---	--

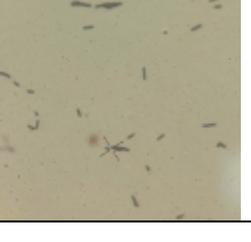
El último muestreo fue realizado durante el mes de octubre del año 2023. De las 14 muestras que fueron recolectadas, 10 mostraron presencia de bacilos Gram positivos. Las cepas aisladas formaron colonias blancas o ligeramente rosadas, redondas o irregulares y de consistencia cremosa. Microscópicamente se encontraron bacilos individuales y formando cadenas cortas. En la tabla 5 se muestran las características macroscópicas y microscópicas de las cepas presentes en las muestras.

TABLA 5

CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS Y MICROSCÓPICAS DE LAS CEPAS AISLADAS DURANTE EL TERCER MUESTREO. SE DESCRIBEN CARACTERÍSTICAS COLONIALES EN AGAR MRS+ Y OBSERVACIÓN AL MICROSCOPIO 100X TINCIÓN GRAM.

Morfología macroscópica	Morfología microscópica	Observaciones
		<p>Lager light. Establecimiento A Morfología macroscópica: Colonias blancas, medianas, redondas, cremosas Morfología microscópica: Bacilos cortos Gram+</p>

		Lager light. Establecimiento B Morfología macroscópica: Colonias blancas, medianas, redondas, cremosas Morfología microscópica: Bacilos Gram+
		Brown ale. Establecimiento A Morfología macroscópica: Colonias ligeramente rosadas, medianas, redondas, cremosas Morfología microscópica: Bacilos Gram+
		Brown ale. Establecimiento B Morfología macroscópica: Colonias blancas, medianas, redondas, cremosas Morfología microscópica: Bacilos cortos Gram+
		Stout. Establecimiento A Morfología macroscópica: Colonias ligeramente rosadas, medianas, redondas, cremosas Morfología microscópica: Bacilos Gram+
		Stout. Establecimiento B Morfología macroscópica: Colonias blancas, medianas, redondas, cremosas Morfología microscópica: Bacilos largos Gram+
		IPA. Establecimiento B Morfología macroscópica: Colonias blancas, pequeñas redondas, cremosas Morfología microscópica: Bacilos largos Gram+

		WC IPA. Establecimiento A Morfología macroscópica: Colonias blancas, pequeñas, irregulares, cremosas Morfología microscópica: Bacilos largos Gram+
		IPA imperial. Establecimiento A Morfología macroscópica: Colonias blancas, medianas, redondas, cremosas Morfología microscópica: Bacilos Gram+
		Witbier. Establecimiento A Morfología macroscópica: Colonias blanquecinas, medianas, irregulares, cremosas Morfología microscópica: Bacilos cortos Gram+

Las características macro y microscópicas de las cepas coincidieron con las descritas por la literatura, además de las observadas en la cepa de *Lactobacillus casei* utilizada como referencia (Fig. 6)



Figura 6 Morfología macroscópica y microscópica de *Lactobacillus casei*. Se observan colonias blancas, redondas, medianas y cremosas en agar MRS+. Microscópicamente se observan bacilos Gram+. Tinción Gram 100X

Una vez que se obtuvieron cultivos puros, se realizaron pruebas de catalasa y fermentación de azúcares. Se utilizó el software ABIS (Advance Bacterial Identification Software) para conocer la identidad de las cepas aisladas. Luego

de introducir al programa los datos obtenidos de las pruebas de catalasa y fermentación realizadas, este proporcionó el género y especie del microorganismo que mejor coincidía con los resultados almacenados en su base de datos. Conforme a estos resultados, se encontraron altas coincidencias con seis cepas de diferentes especies del género *Lactobacillus*, siendo *L. parabrevis* la especie más recurrente con una presencia del 64.5% de las muestras, seguido de *L. brevis* el cual representó al 19.1% del total de muestras positivas. En la tabla 6 se muestran los resultados de las pruebas bioquímicas, así como el género y especie de cada cepa, además del porcentaje de coincidencia con los géneros presentes en la base de datos ABIS.

TABLA 6

RESULTADOS DE PRUEBAS BIOQUÍMICAS REALIZADAS A LAS CEPAS AISLADAS. SE OBSERVA LA PRESENCIA DE 6 DIFERENTES ESPECIES DE *LACTOBACILLUS*.

Muestra	Gal	Ara	Xil	Manit	Cel	Raf	Lac	Sac	Man	Mal	Cat	Especie
Brown ale A1	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>L. parabrevis</i> 92%
Brown ale A2	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>L. parabrevis</i> 92%
Brown ale A3	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>L. parabrevis</i> 92%
Brown ale B1	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	<i>L. senioris</i> 83.9%
Brown ale B2	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	<i>L. brevis</i> 81.5%
Brown ale B3	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>L. parabrevis</i> 92%
IPA A2	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	<i>L. brevis</i> 80.2%
IPA B1	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	<i>L. brevis</i> 81.5%
IPA B2	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	<i>L. brevis</i> 81.5%
IPA B3	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	<i>L. kisonensis</i> 92%
IPA imp A1	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	<i>L. fuyuanensis</i> 90.8%

IPA imp A3	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>L. parabrevis</i> 92%
IPA imp B 1	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>L. parabrevis</i> 92%
Lager light A1	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>L. parabrevis</i> 92%
Lager light A2	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>L. parabrevis</i> 92%
Lager light A3	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>L. parabrevis</i> 92%
Lager light B1	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>L. parabrevis</i> 92%
Lager light B2	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>L. parabrevis</i> 92%
Lager light B3	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>L. parabrevis</i> 92%
Stout A1	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	<i>L. fermentum</i> 82.7%
Stout A2	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>L. parabrevis</i> 92%
Stout A3	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	<i>L. fermentum</i> 82.7%
Stout B1	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>L. parabrevis</i> 92%
Stout B2	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	<i>L. brevis</i> 81.5%
Stout B3	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	<i>L. brevis</i> 87.2%
WC IPA A1	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>L. parabrevis</i> 92%
WC IPA A2	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>L. parabrevis</i> 92%
WC IPA A3	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>L. parabrevis</i> 92%
WC IPA B1	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>L. parabrevis</i> 92%
Witbier A1	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>L. parabrevis</i> 92%
Witbier A3	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	<i>L. parabrevis</i> 92%
Control (<i>L. casei</i>)	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	<i>L. paracasei</i> 92%

Positivo (+), Negativo (-).

Para determinar el grado de correlación entre la presencia de BAL y los parámetros de cada cerveza se realizó un análisis biserial puntual, análisis estadístico útil para verificar la correlación existente entre una variable dicotómica (en este caso presencia/ausencia de BAL) y una variable continua (parámetros IBU, ABV y SRM). La tabla 7 muestra los resultados de dicho análisis. Se observa que los valores del coeficiente de correlación para los parámetros IBU, ABV y SRM son: -0.10, -0.09 y 0.09 respectivamente.

TABLA 7

CORRELACIÓN ENTRE LA PRESENCIA DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS Y LOS PARÁMETROS IBU, ABV Y SRM

Parámetros	Presencia de BAL
IBU	Valor R: -0.1041
ABV	Valor R: -0.0992
SRM	Valor R: 0.0941

4.3 Producción de biopelículas.

El cristal violeta extraído de las biopelículas teñidas fue cuantificado con el uso de un lector de microplacas. Las cepas aisladas de cerveza Lager light produjeron la mayor cantidad de biopelícula con valores de absorbancia entre 1.5 y 1.19. Las cervezas Witbier, WC IPA e IPA tuvieron valores de entre 1.2 y 0.3. Por último, las muestras de IPA imperial, Stout y Brown ale mostraron la menor producción de biopelícula con valores de absorbancia menores a 0.27.

Las biopelículas producidas por las distintas cepas aisladas de *Lactobacillus* se muestran en las figuras 7, 8 y 9.

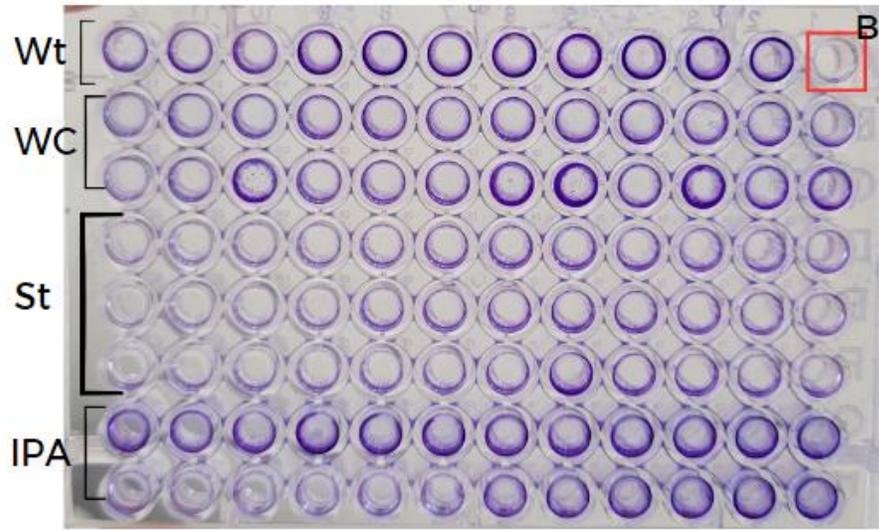


Figura 7 Biopelículas producidas por cepas aisladas de Witbier (Wt), West Coast IPA (WC), Stout (St) e IPA. Blanco (B).

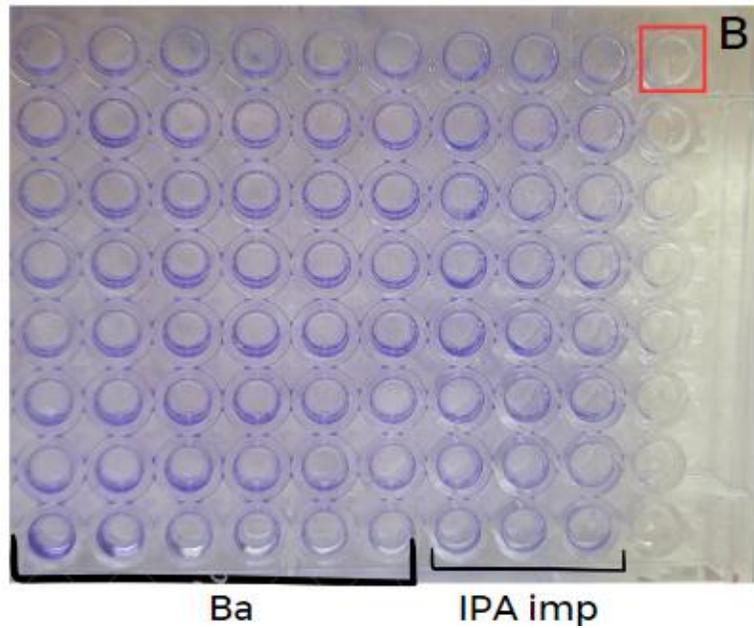


Figura 8 Biopelículas producidas por cepas aisladas de Brown ale (Ba), IPA imperial (IPA imp). Blanco (B).

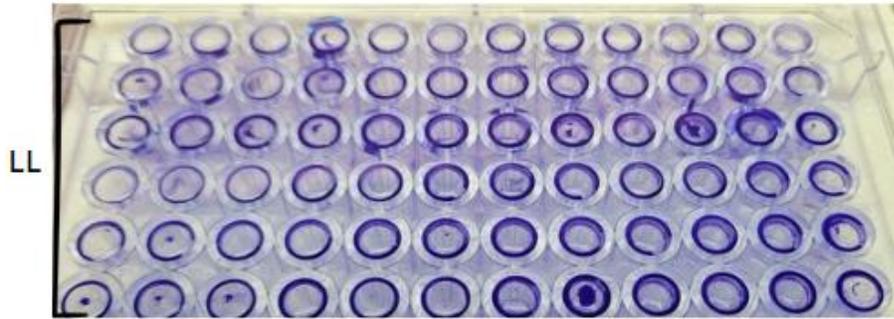


Figura 9 Biopelículas producidas por cepas aisladas de Lager light (LL).

La comparación de las absorbancias obtenidas de cada estilo de cerveza es mostrada en la figura 10.

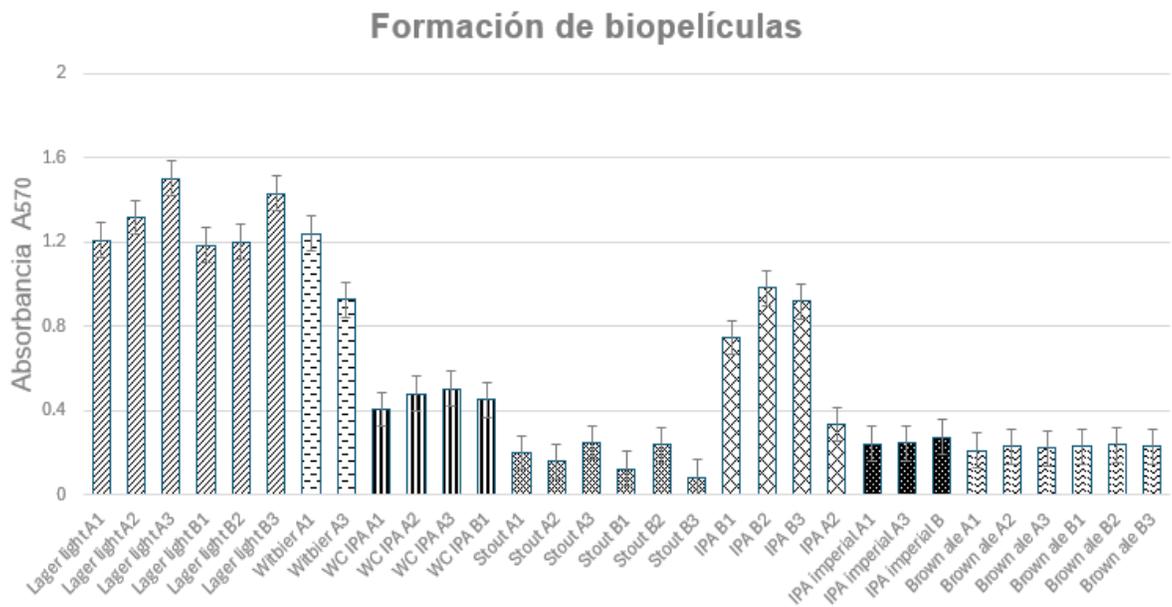


Figura 10 Comparación de la producción de biopelícula de los distintos estilos de cerveza.

Para probar la existencia de relación entre la producción de biopelículas y los parámetros IBU, SRM y ABV de cada estilo de cerveza analizada en este proyecto se realizó un análisis de correlación de Pearson. La tabla 8 muestra los resultados del análisis estadístico.

TABLA 8
CORRELACIÓN ENTRE LA PRODUCCIÓN DE BIOPELÍCULA Y PARÁMETROS IBU, ABV Y SRM.

Variable		BIOFILM	SRM	IBU	ABV
1. BIOFILM	Pearson's r	—			
	p-value	—			
2. SRM	Pearson's r	-0.768	—		
	p-value	< .001	—		
3. IBU	Pearson's r	-0.471	-0.036	—	
	p-value	0.008	0.851	—	
4. ABV	Pearson's r	-0.451	-0.147	0.844	—
	p-value	0.011	0.439	< .001	—

Se muestran también las gráficas de dispersión (figuras 11, 12 y 13) donde se observa gráficamente la relación entre la producción de biopelícula y los diferentes parámetros de las cervezas. Con respecto a la relación entre la concentración de cristal violeta y el porcentaje de etanol, se obtuvo un valor de coeficiente R de -0.451, lo que señala la existencia de una correlación negativa moderada. El valor P fue de 0.011 por lo que se considera que la correlación es estadísticamente significativa.

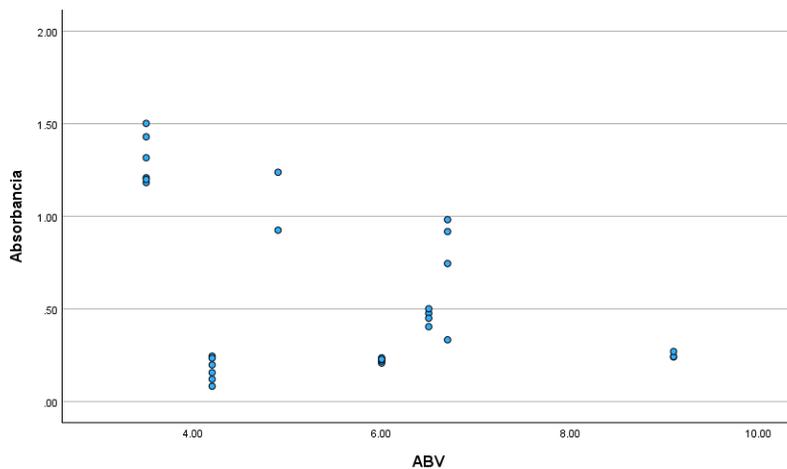


Figura 11 Relación entre la concentración de cristal violeta y la concentración de etanol de cada estilo de cerveza.

Para la concentración de iso alfa-ácidos o parámetro IBU, el valor del coeficiente R arrojado por el programa estadístico fue de -0.471 lo que indica que, al igual que el caso anterior, si bien no hay una correlación directa entre ambas variables, si existe una relación negativa moderada. El valor P para este

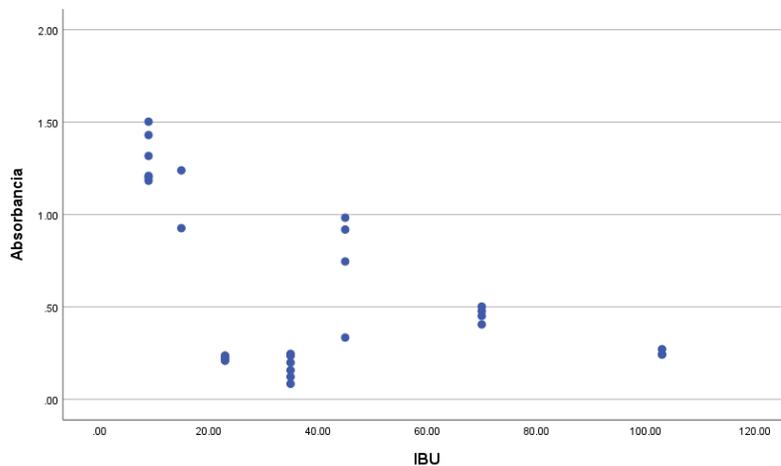


Figura 12 Relación entre absorbancia de cristal violeta y la concentración de iso alfa-ácidos de cada estilo de cerveza.

análisis fue de 0.008 por lo tanto la correlación es estadísticamente significativa.

Por último, la relación entre el parámetro SRM y la presencia de biopelículas mostró un valor de coeficiente R de -0.768 y un valor P de <0.001, lo que indica la existencia de una correlación negativa fuerte entre estas dos variables, además de una alta y confiable significancia estadística.

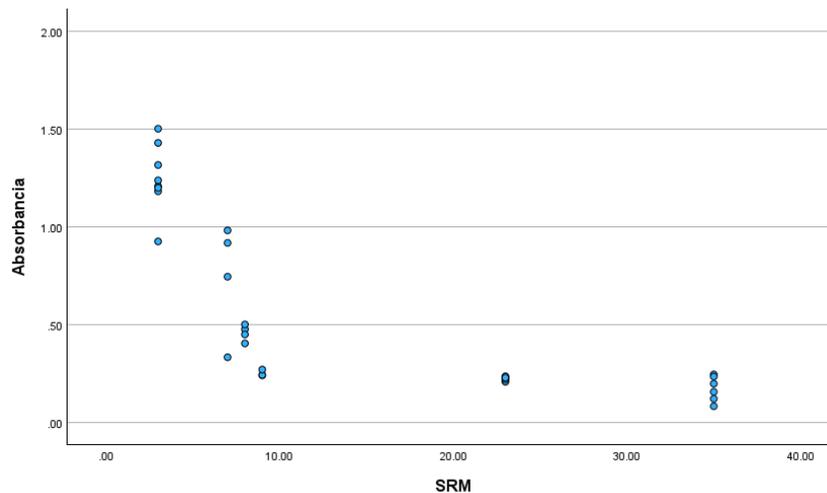


Figura 13 Relación entre concentración de cristal violeta y el parámetro SRM de cada estilo de cerveza

4.4 Efectividad de sanitizantes

El crecimiento en las placas fue medido utilizando un lector de microplacas y los resultados fueron graficados para visualizar el comportamiento de los sanitizantes contra biopelículas de 7, 14 y 21 días de crecimiento producidas por las 6 cepas de *Lactobacillus* aisladas. Las figuras 14, 15 y 16 muestran el comportamiento de los tres productos analizados.

En el caso del producto a base de yodo, se presentó la eliminación casi total de las biopelículas de 7 días de crecimiento de todas las cepas. Para las biopelículas de 14 y 21 días, el recrecimiento varió entre las diferentes cepas (fig. 14), sin embargo, en todos los casos se presentó un incremento considerable de recrecimiento bacteriano conforme aumentaron los días de crecimiento de la biopelícula inicial.

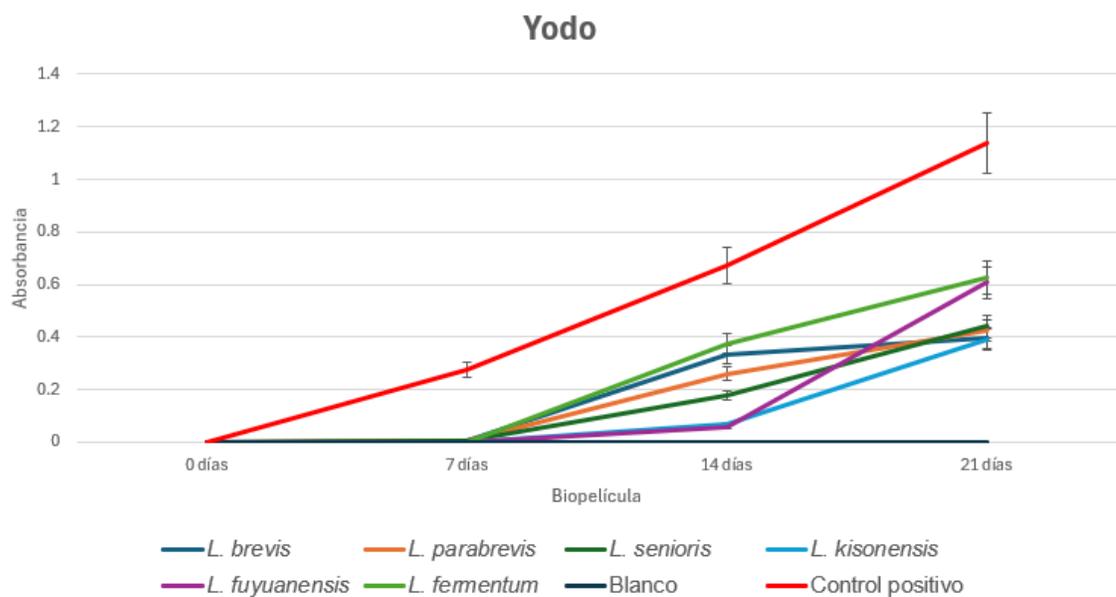


Figura 14. Recrecimiento de biopelículas de 7, 14 y 21 días después de la sanitización realizada con el producto a base de yodo.

Los productos elaborados con base en ácido fosfórico mostraron un comportamiento muy similar al observado con el producto de base yodo. En el caso de Starsan (Fig. 15), la eliminación de las biopelículas de 7 días de crecimiento fue casi completa, pero el recrecimiento fue evidente para el día 14, aumentando aún más cuando el producto se probó contra películas de 21 días de crecimiento.

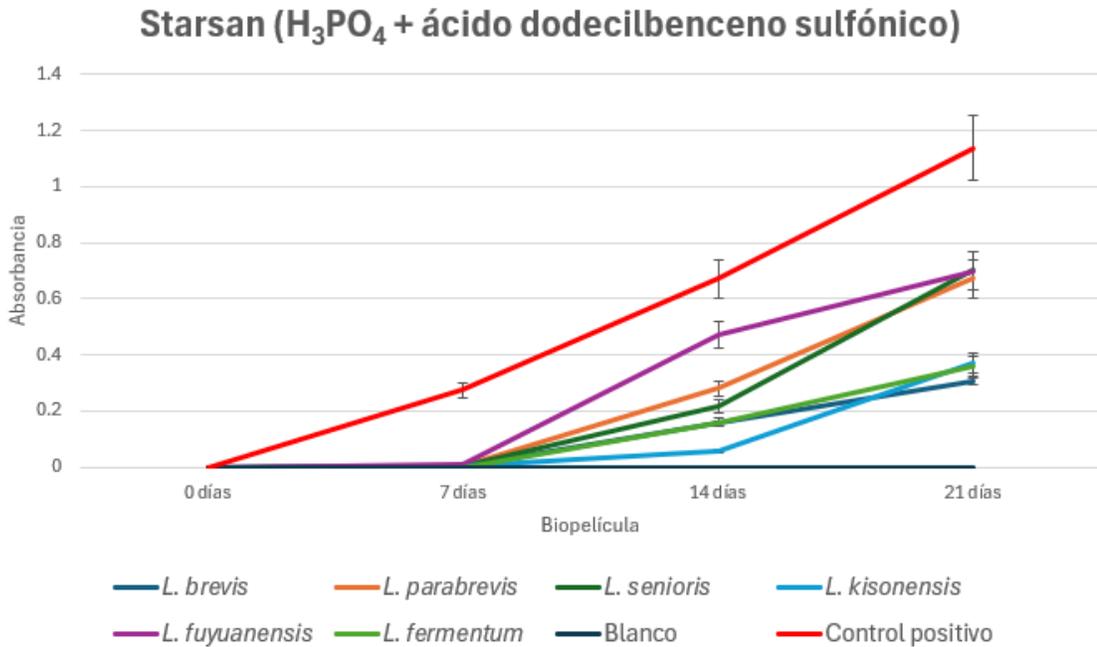


Figura 15. Efectividad del producto a base de ácido fosfórico y ácido dodecilbenceno sulfónico contra biopelículas de 7, 14 y 21 días.

En las muestras tratadas con Saniclean, las películas de 7 días de crecimiento formadas por la cepa de *L. fermentum* tuvieron un recrecimiento ligeramente mayor al observado en el resto de las muestras las cuales mostraron una eliminación casi total. Para las muestras de 14 y 21 días de crecimiento el comportamiento fue similar al observado con los productos de yodo y ácido fosfórico + ácido dodecilbenceno sulfónico, donde el recrecimiento aumentó conforme aumentaron los días de crecimiento de la película inicial (Fig. 16).

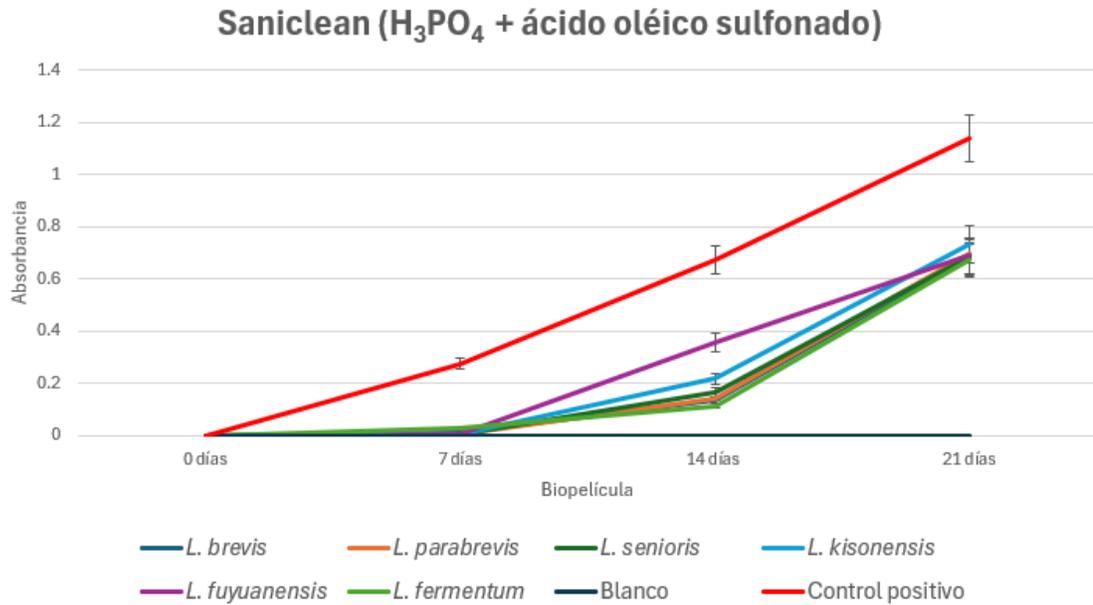


Figura 16. Efectividad del producto a base de ácido fosfórico y ácido oleico sulfonado contra biopelículas de 7, 14 y 21 días de crecimiento.

4.5 Propuesta del plan de sanitización

De acuerdo con los resultados obtenidos en este proyecto y las referencias consultadas, se recapitularon los puntos clave para implementar un proceso de sanitización efectivo, capaz de minimizar la carga microbiana presente en las líneas de dispensación de cervezas artesanales en barril. Con esta información se elaboró un procedimiento estandarizado que puede ser implementado en establecimientos que utilicen estos sistemas de dispensación. Este documento se encuentra en el Apéndice B.

5 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.1 Identificación de bacterias ácido lácticas (BAL)

La detección de bacterias ácido lácticas deterioradoras presentes en las muestras recolectadas se realizó utilizando agar MRS+. De las 42 muestras, 31 mostraron presencia de bacterias Gram positivas, lo cual representa el 73.8%. Investigaciones realizadas por Goodman et al. (2020) y Menz et al. (2010) mostraron la presencia de BAL en el 44 y 30% de las muestras de cervezas embotelladas analizadas, respectivamente. Esta diferencia tan significativa puede atribuirse a la falta de higiene en los sistemas de dispensación.

Las colonias observadas en placas de agar MRS+ son características del género *Lactobacillus* según lo descrito en la bibliografía. Bajo el microscopio la morfología observada concuerda también con lo descrito por Menz et al. (2010) así como con las características de la cepa control utilizada, *Lactobacillus casei*.

Se realizaron las pruebas bioquímicas a las cepas aisladas y con la ayuda del software ABIS, se logró encontrar una alta coincidencia con 6 especies diferentes de bacterias del género *Lactobacillus*: *L. parabrevis*, que fue la especie predominante, aislada en el 64.5% de las muestras, *L. brevis* (19.1%), *L. fermentum* (6.5%), *L. kisonensis* (3.2 %), *L. fuyuanensis* (3.2%) y *L. senioris* (3.2%). *L. brevis* es el microorganismo con más reportes de aislamiento en problemas de contaminación y deterioro de producto en la industria cervecera a nivel mundial. Koob et al. (2020) también reportan casos de deterioro de cerveza causado por *L. parabrevis* y *L. fermentum*.

Actualmente no existen reportes de deterioro causado por *L. senioris*, *L. fuyuanensis* y *L. kisonensis*, sin embargo, Koob *et al.* (2020) también menciona que actualmente nuevas especies de *Lactobacillus* se han adaptado a las características de las cervezas a las que se exponen, lo que ha llevado a un aumento en el número de bacterias capaces de deteriorar producto.

Para probar la correlación entre la presencia de BAL y los parámetros IBU, ABV y SRM de cada cerveza analizada se realizó una prueba de correlación biserial puntual dando como resultados valores de coeficiente R por debajo de 0.1 para cada uno de los parámetros indicando que no existe una relación entre estos valores y la presencia de bacterias ácido lácticas. Esto concuerda con las investigaciones realizadas por Goodman *et al.* (2020) donde al aislar bacterias ácido lácticas de cervezas artesanales con diferentes parámetros no encontraron una relación significativa entre la presencia/ausencia de estos microorganismos y los valores IBU, ABV y pH de cada cerveza.

5.2 Producción de biopelículas.

La cuantificación de cristal violeta mostró que las cepas aisladas de cerveza Lager light fueron las que produjeron una mayor cantidad de biopelícula, seguido de las muestras de cerveza Witbier. Estos resultados coinciden con lo descrito por Çobo *et al.* (2023), quienes mencionan que las cervezas sin alcohol o con bajas graduaciones de este son particularmente susceptibles a problemas de contaminación por BAL. La cerveza Lager light seleccionada para esta

investigación tenía la concentración de iso alfa-ácidos y etanol más bajos de todo el grupo de cervezas analizadas; por lo tanto, era esperado que la cantidad de biopelícula generada en esta cerveza fuera la mayor. De igual manera, la cerveza Witbier es una bebida de baja graduación alcohólica y baja concentración de iso alfa-ácidos; por lo tanto, los resultados obtenidos fueron muy similares a los encontrados en la cerveza Lager light.

Las cervezas de los estilos Brown ale, Stout e IPA imperial fueron las muestras con menor producción de biopelículas con valores de absorbancia menores a 0.27. La cerveza IPA imperial fue la bebida con los valores de alcohol e IBU más altos de todo el grupo de cervezas analizadas. Si bien estas características minimizan las probabilidades de contaminación por BAL, no se garantiza que la presencia de microorganismos deterioradores sea nula. Los resultados obtenidos muestran que, aunque estas bacterias pueden estar presentes y desarrollarse en cervezas con estos parámetros, la cantidad de biopelícula que son capaces de producir es mínima.

Por otra parte, las cervezas Brown ale y Stout fueron las únicas bebidas con valores SRM superiores a 20. A pesar de no tener el mayor contenido de alcohol ni de iso alfa-ácidos, estas muestras mostraron una menor producción de biopelícula.

Las cervezas oscuras difieren de las claras en su composición química. Investigaciones realizadas por Zhang et al., (2023) y Martinez-Gomez et al., (2020) señalan que algunas moléculas como las melanoidinas, compuestos fenólicos, flavonoides y otros antioxidantes se encuentran en mayor

concentración en bebidas con valores SRM mayores de 20. Las melanoidinas son el producto final de la reacción de Maillard y tienen una fuerte relación con la coloración, sabor y cuerpo de una cerveza. Estas moléculas son conocidas por sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas (Martinez-Gomez et al., 2020; Zhang et al., 2023). Por otro lado, los compuestos fenólicos como los flavonoides y el ácido ferúlico poseen actividad antioxidante y antibacteriana. Estudios realizados por Ong et al. (2018) indican que los antioxidantes tanto liposolubles como hidrosolubles tienen la capacidad de reducir y prevenir la formación de biopelículas. Por lo tanto, la baja cantidad de biopelículas producidas en cervezas oscuras pudiera atribuirse a las propiedades de estas moléculas.

La relación entre la producción de biopelículas y cada uno de los parámetros se realizó mediante la prueba de correlación de Pearson.

Con respecto a la correlación entre la producción de biopelículas y el parámetro SRM, el valor del coeficiente R indica la existencia de una relación negativa fuerte, es decir, a medida que el valor del parámetro SRM aumenta, la producción de biopelícula se ve disminuida.

En el caso de la relación entre la producción de biopelículas y la concentración de iso alfa-ácidos y etanol (parámetros IBU y ABV), los valores del coeficiente R muestran que, si bien existe una relación negativa, esta no es tan fuerte como en el caso del parámetro SRM.

5.3 Eficiencia de sanitizantes

Los 3 productos más vendidos para realizar la sanitización de las líneas del sistema de dispensación se probaron imitando un procedimiento de sanitización estática según las instrucciones dadas por los fabricantes. Dicho procedimiento se realizó con el fin de verificar la eficacia de los productos y determinar el tiempo óptimo entre cada sanitización que asegure la eliminación o reducción máxima de las películas existentes en las líneas del sistema de dispensación.

Los tres productos fueron eficaces contra biopelículas de 7 días de crecimiento de todas las cepas de *Lactobacillus* aisladas, las cuales mostraron un recrecimiento prácticamente nulo.

Los productos a base de yodo han demostrado tener actividad en contra de diferentes tipos de microorganismos, adhiriéndose a las membranas celulares e inhibiendo las funciones celulares y por lo tanto la viabilidad microbiana (Chen et al., 2023; Holah, 2014). Sin embargo, se ha observado que, al entrar en contacto con películas bacterianas, como en la investigación realizada por Petchphayaprai et al. (2023), el yodo presenta un mayor efecto sobre las bacterias planctónicas y las presentes solo en la superficie de la biopelícula y aunque el yodo actúa ralentizando el recrecimiento de las bacterias, no la elimina por completo. Esto puede explicar el comportamiento del sanitizante en este análisis, ya que, al presentarse una biopelícula más delgada y menos desarrollada a los 7 días de crecimiento, el yodo fue capaz de eliminarla casi por completo. Sin embargo, al enfrentarse a películas más desarrolladas, con 14 y 21 días de crecimiento, el sanitizante no alcanzó el nivel de eficacia deseada para eliminar en su totalidad estas biopelículas.

Los sanitizantes ácidos utilizados en la industria alimentaria son formulados generalmente con surfactantes aniónicos, ácido fosfórico y ácidos orgánicos (Holah, 2014). Comúnmente son utilizados como desincrustantes en procedimientos de limpieza y sanitización de líneas de dispensación de distintas bebidas (Mallett & Quain, 2019b). Los ácidos han mostrado la capacidad de eliminar microorganismos debido a la desnaturalización de las proteínas de membrana y en el caso de las biopelículas, actúan disolviendo la matriz de EPS, debilitándola y posteriormente eliminándola (Artasensi et al., 2021; PRADO et al., 2015), y como un problema que generalmente se presenta en los sistemas de dispensación es la presencia de biopelículas y de incrustaciones, el uso de productos ácidos pueden ayudar en la solución de ambas problemáticas (Habschied et al., 2023; Wagner et al., 2021). Sin embargo, en investigaciones como la de Jan et al., se ha observado que la acción antimicrobiana de ácidos inorgánicos es menor en comparación con ácidos orgánicos, aunque las combinaciones de ácidos orgánicos e inorgánicos suelen tener mejor actividad antibacteriana que el uso de productos cuyo ingrediente activo es un solo ácido.

Las biopelículas de 7 días de crecimiento fueron eliminadas casi en su totalidad al ser expuestas a los dos productos de ácido fosfórico por el tiempo y concentración indicada, mostrando un recrecimiento mínimo de microorganismos. Sin embargo, al igual que lo ocurrido con el producto de yodo, los sanitizantes ácidos no mostraron suficiente eficacia frente a películas maduras de 14 y 21 días de crecimiento. Esto podría deberse a que los ácidos inorgánicos tienen menor actividad antimicrobiana en comparación con ácidos

orgánicos, como se mostró en los estudios realizados por Jan et al., donde el ácido fosfórico fue el compuesto que presentó una menor reducción de UFC en soluciones de distintas cepas bacterianas conocidas. Al tener una película menos desarrollada a los 7 días de crecimiento, el ácido fosfórico podría tener la capacidad de actuar con eficacia eliminando en su mayoría las biopelículas formadas en la microplaca. Sin embargo, al probarse en contra de películas más desarrolladas, los productos ácidos no tuvieron la capacidad de eliminar por completo las biopelículas; por lo tanto, se observó un recrecimiento significativo de microorganismos en las muestras de 14 y 21 días de desarrollo. Esto pudiera deberse a que la carga microbiana presente en estas muestras fue superior a la capacidad de los productos y, por lo tanto, la efectividad de estos se vio limitada.

Comparando las gráficas de la eficacia de los sanitizantes analizados se aprecia que los tres productos tuvieron un comportamiento similar frente a las películas de distintos días de crecimiento. Por lo tanto, la elección del producto adecuado para la sanitización en cada establecimiento puede tomarse comparando ventajas y desventajas ofrecidas por cada ingrediente activo.

Los productos formulados con yodo tienen la ventaja de ser efectivos contra un gran número de bacterias y levaduras. El tiempo de acción de estos productos es muy bajo además de no requerir enjuague por lo que puede reducir significativamente los tiempos de limpieza. El yodo es efectivo en concentraciones tan bajas como 25 ppm (Artasensi et al., 2021), por lo que al requerir una cantidad muy pequeña de producto para la preparación de las

soluciones de sanitización los costos se ven considerablemente reducidos. Sin embargo, la principal desventaja del uso continuo de este tipo de productos es la aparición de manchas color ocre en las distintas partes del sistema, lo que le puede dar a las líneas un aspecto sucio y descuidado (Petchphayaprai et al., 2023).

Los productos formulados con ácido fosfórico analizados en esta investigación son productos especialmente diseñados para la sanitización de utensilios y equipos utilizados en la industria cervecera, siendo uno de ellos específicamente formulado para su uso en sistemas de dispensación de barril, por lo que esta es su principal ventaja. Estos productos tienen actividad antimicrobiana de amplio espectro, además el ácido fosfórico ayuda en la eliminación de incrustaciones que pudieran estar presentes en el sistema (Mallett & Quain, 2019b). Al tratarse de productos especializados, los costos son elevados en comparación con otros grupos de sanitizantes utilizados en la industria alimentaria.

6. CONCLUSIONES

Se detectó la presencia de BAL en más del 70% de las muestras analizadas. Este porcentaje tan alto puede atribuirse a la mala higiene practicada durante los procesos de limpieza y sanitización de los sistemas de dispensación en los establecimientos donde la cerveza es vendida.

Se llevó a cabo la identificación bioquímica de las cepas aisladas y se sugiere la posible presencia de 6 especies del género *Lactobacillus*: *L. parabrevis*, *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. fuyuanensis*, *L. senioris* y *L. kisonensis*. Actualmente no hay reportes de problemas de deterioro de producto ocasionado por *L. fuyuanensis*, *L. senioris* y *L. kisonensis*.

La correlación entre la presencia de BAL y los parámetros IBU, ABV y SRM de cada estilo de cerveza mostraron coeficientes R menores a 0.1, lo que indica que no existe una relación significativa entre estos datos. En el caso de la producción de biopelículas, se observó una correlación negativa fuerte con el parámetro SRM con un valor del coeficiente R de -0.768. Los parámetros IBU y ABV mostraron valores del coeficiente de -0.471 y -0.451 respectivamente, lo que indica que la relación entre estas variables es moderadamente fuerte. Por lo tanto, la hipótesis fue parcialmente aceptada.

Los productos analizados fueron efectivos al ser empleados de la manera recomendada por el proveedor frente a las biopelículas de las 6 cepas aisladas de 7 días de crecimiento observando un recrecimiento nulo de microorganismos.

Los tres productos no mostraron la eficacia deseada en contra de biopelículas más desarrolladas, de 14 y 21 días, observando un aumento en el recrecimiento conforme más días de crecimiento tenían las películas.

El procedimiento estandarizado que fue diseñado podrá ser adoptado por establecimientos con el fin de minimizar los casos de contaminación microbiana del producto.

7. PERSPECTIVAS DEL TRABAJO

A lo largo de la investigación quedaron en duda algunos puntos que no pudieron ser confirmados. El primero de ellos fue la identidad molecular de las cepas aisladas, ya que si bien, se ha demostrado que el uso del software ABIS es bastante confiable, no se puede confirmar al cien por ciento la identidad de las especies de *Lactobacillus* encontradas en las muestras.

También sería interesante realizar un análisis cuantitativo y no solo cualitativo en las diferentes muestras de cerveza, que diera información más precisa acerca de las condiciones de calidad de las cervezas dispensadas en los distintos establecimientos en las que son ofrecidas.

Además, este proyecto puede complementarse con el aislamiento e identificación de bacterias Gram negativas que también tienen la capacidad de causar deterioro, con lo cual se tendría un panorama bastante amplio acerca de los microorganismos involucrados en este problema que se ha presentado en la región.

Por otro lado, los resultados de esta investigación pueden servir como base para el desarrollo de un producto sanitizante con diferente formulación a los existentes en el mercado mexicano, que ofrezca una mayor eficacia contra biopelículas producidas por BAL en el ambiente cervecero.

También, los datos obtenidos pueden contribuir en la elaboración de una Norma Oficial Mexicana que ayude en la regulación de los procesos de elaboración de cervezas artesanales, así como en el manejo del producto terminado y los requerimientos necesarios en establecimientos para mantener la calidad de las cervezas hasta el momento de ser servidas a los consumidores.

8. LITERATURA CITADA

Artasensi, A., Mazzotta, S., & Fumagalli, L. (2021). Back to Basics: Choosing the Appropriate Surface Disinfectant. *Antibiotics*, *10*(6), 613. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10060613>

Baiano, A. (2021). Craft beer: An overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *20*(2), 1829–1856. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12693>

Bamforth, C. W. (2017). Progress in Brewing Science and Beer Production. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, *8*(1), 161–176. <https://doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-060816-101450>

Bergsveinson, J., & Ziola, B. (2017). Investigation of Beer-Spoilage Lactic Acid Bacteria using Omic Approaches. In *Brewing Microbiology: Current Research, Omics and Microbial Ecology* (pp. 245–266). Caister Academic Press. <https://doi.org/10.21775/9781910190616.09>

- Bokulich, N. A., & Bamforth, C. W. (2013). The Microbiology of Malting and Brewing. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77(2), 157–172. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00060-12>
- Chen, S., Jiang, Y., Wang, W., Chen, J., & Zhu, J. (2023). The effect and mechanism of iodophors on the adhesion and virulence of *Staphylococcus aureus* biofilms attached to artificial joint materials. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, 18(1), 756. <https://doi.org/10.1186/s13018-023-04246-x>
- Çobo, M., Charles-Vegdahl, A., Kirkpatrick, K., & Worobo, R. (2023). Survival of Foodborne Pathogens in Low and Nonalcoholic Craft Beer. *Journal of Food Protection*, 86(12), 100183. <https://doi.org/10.1016/j.jfp.2023.100183>
- Fernández Ramírez, M. D., Smid, E. J., Abee, T., & Nierop Groot, M. N. (2015). Characterisation of biofilms formed by *Lactobacillus plantarum* WCFS1 and food spoilage isolates. *International Journal of Food Microbiology*, 207, 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.030>
- Goldammer, T. (2022). *The brewer's handbook. The complete book to brewing beer* (3ra edición). Apex Publishers.
- Gómez-Corona, C., Escalona-Buendía, H. B., García, M., Chollet, S., & Valentin, D. (2016). Craft vs. industrial: Habits, attitudes and motivations towards beer consumption in Mexico. *Appetite*, 96, 358–367. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2015.10.002>
- Goodman, M., Neal, J. A., Corsi, A., & Sirsat, S. A. (2020). Isolation of Beer-Spoiling Bacteria from Texas Craft Breweries. *Journal of Culinary Science & Technology*, 18(2), 116–123. <https://doi.org/10.1080/15428052.2018.1509754>
- Habschied, K., Keleković, S., Domaćinović, A., Pavetić, T. M., & Mastanjević, K. (2023). *Draught Beer—Maintaining the Quality Through Hygienic Measures* (pp. 176–185). https://doi.org/10.1007/978-3-031-21429-5_17
- Holah, J. T. (2014). Cleaning and disinfection practices in food processing. In *Hygiene in Food Processing* (pp. 259–304). Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9780857098634.3.259>
- Jan, Shyh., Wang, Yu., & Thammasena, Rommanee. (2020). Antibacterial abilities of spray sanitizer solutions formulated with chitosan and acid complexes at pH 3 on broiler carcass surfaces inoculated with selected pathogenic bacteria before refrigeration. *African Journal of Microbiology Research*, 14, 667–677.
- Jevons, A. L., & Quain, D. E. (2021). Draught beer hygiene: use of microplates to assess biofilm formation, growth and removal. *Journal of the Institute of Brewing*, 127(2), 176–188. <https://doi.org/10.1002/jib.637>
- Mallett, J. R., & Quain, D. E. (2019a). Draught beer hygiene: a survey of on-trade quality. *Journal of the Institute of Brewing*, 125(2), 261–267. <https://doi.org/10.1002/jib.551>

- Mallett, J. R., & Quain, D. E. (2019b). Draught beer hygiene: a survey of on-trade quality. *Journal of the Institute of Brewing*, 125(2), 261–267.
<https://doi.org/10.1002/jib.551>
- Mallett, J. R., Stuart, M. S., & Quain, D. E. (2018). Draught beer hygiene: a forcing test to assess quality. *Journal of the Institute of Brewing*, 124(1), 31–37.
<https://doi.org/10.1002/jib.470>
- Martinez-Gomez, A., Caballero, I., & Blanco, C. A. (2020). Phenols and Melanoidins as Natural Antioxidants in Beer. Structure, Reactivity and Antioxidant Activity. *Biomolecules*, 10(3), 400.
<https://doi.org/10.3390/biom10030400>
- Menz, G., Andrighetto, C., Lombardi, A., Corich, V., Aldred, P., & Vriesekoop, F. (2010). Isolation, Identification, and Characterisation of Beer-Spoilage Lactic Acid Bacteria from Microbrewed Beer from Victoria, Australia. *Journal of the Institute of Brewing*, 116.
- Ong, K. S., Mawang, C. I., Daniel-Jambun, D., Lim, Y. Y., & Lee, S. M. (2018). Current anti-biofilm strategies and potential of antioxidants in biofilm control. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 16(11), 855–864.
<https://doi.org/10.1080/14787210.2018.1535898>
- Petchphayaprai, C., Chotipan, C., Sa-ngiampak, P., Thotsaporn, K., & Ampornaramveth, R. S. (2023). Effectiveness of iodine for continuous decontamination of dental unit waterline. *BDJ Open*, 9(1), 34.
<https://doi.org/10.1038/s41405-023-00160-w>
- PRADO, M., SILVA, E. J. N. L. da, DUQUE, T. M., ZAIA, A. A., FERRAZ, C. C. R., ALMEIDA, J. F. A. de, & GOMES, B. P. F. de A. (2015). Antimicrobial and cytotoxic effects of phosphoric acid solution compared to other root canal irrigants. *Journal of Applied Oral Science*, 23(2), 158–163.
<https://doi.org/10.1590/1678-775720130691>
- Quain, D. E. (2016). Draught beer hygiene: cleaning of dispense tap nozzles. *Journal of the Institute of Brewing*, 122(3), 388–396.
<https://doi.org/10.1002/jib.335>
- Sakamoto, K., & Konings, W. N. (2003). Beer spoilage bacteria and hop resistance. *International Journal of Food Microbiology*, 89(2–3), 105–124.
[https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00153-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00153-3)
- Schneiderbanger, J., Jacob, F., & Hutzler, M. (2020). Mini-Review: The current role of lactic acid bacteria in beer spoilage. *Brewing Science*, 73.
- Sohrabvandi, S., Mortazavian, A. M., & Rezaei, K. (2020). Advanced analytical methods for the analysis of chemical and microbiological properties of beer. *Journal of Food and Drug Analysis*, 19(2). <https://doi.org/10.38212/2224-6614.2228>
- Storgårds, E. (2000). *Process hygiene control in beer production and dispensing*.

- Wagner, E. M., Thalgut, S., Wagner, M., & Rychli, K. (2021). Presence of Microbial Contamination and Biofilms at a Beer Can Filling Production Line. *Journal of Food Protection*, 84(5), 896–902. <https://doi.org/10.4315/JFP-20-368>
- Wang, Y., Wu, J., Lv, M., Shao, Z., Hungwe, M., Wang, J., Bai, X., Xie, J., Wang, Y., & Geng, W. (2021). Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and the Expanding Applications in Food Industry. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.612285>
- Zhang, Q., Chen, M., Emilia Coldea, T., Yang, H., & Zhao, H. (2023). Structure, chemical stability and antioxidant activity of melanoidins extracted from dark beer by acetone precipitation and macroporous resin adsorption. *Food Research International*, 164, 112045. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.112045>
- Zhenbo, X., Yuting, L., Yuzhu, M., Ruixin, P., Jinxuan, C., Thanapop, S., Caiying, B., Ling, C., Yi, L., Jianyu, S., Kan, W., & Junyan, L. (2020). Spoilage lactic acid bacteria in the brewing industry. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 995–961.

APÉNDICES

APÉNDICE A
BASE DE DATOS DE CERVEZAS ARTESANALES DISPONIBLES
POR ESTABLECIMIENTO.

Establecimientos	Sierra madre								Metabrews co.											Monterreina				La regia				El potrero chico				Santa Lucia	
	Saison	Dry stout	California common	Bock	APA	Kolsch	English PA	American lager	Session IPA	American wheat ale	Stout	IPA	Brown ale	Porter	NEIPA	German IPA	Dark Lager	German marzen	Lager	Dark lager	British brown ale	IPA	American wheat	Munich helles	Blonde ale spiced	American wheat ale	Hazy pale ale	Mexican lager	Munich dunkel				
Sierra madre																																	
Beer for us																																	
Metapatio																																	
Obelisco																																	
Duarte gastropub																																	
Fausto																																	
The british pub																																	
The beer company																																	
La taberna																																	
Albur																																	
Saufenhaus																																	
La grange tap																																	
Oveja negra																																	
Metabrews Co.																																	
Del barril																																	
Pinto bar																																	
Principia taproom																																	
Bracino																																	
Lúpulo																																	
Reserva																																	
Almacén 42																																	
Cuadro coyote																																	
El aguaje huerca																																	
Punto base																																	
Ficha (Cerrado remodelac																																	
Vernáculo																																	
Cervecería La Regia (Arbez																																	
Laszlo Loszla																																	
Butcher's universe																																	
Casa cerveza																																	
Chevecraft																																	

APÉNDICE B

PROCEDIMIENTO ESTANDARIZADO DE SANITIZACIÓN DEL SISTEMA DE DISPENSACIÓN DE CERVEZA DE BARRIL.

APÉNDICE B

PROCEDIMIENTO ESTANDARIZADO DE SANITIZACIÓN DEL SISTEMA DE DISPENSACIÓN DE CERVEZA DE BARRIL.

	Limpieza y sanitización del sistema de dispensación de barril				
Clave: XXXX	Versión: XX	Fecha de aplicación: XX/XX/20XX	Próxima revisión: XX/XX/20XX	Sustituye a: N/A	Página: 01

1. Objetivo

Describir el proceso de limpieza y sanitización del sistema de dispensación de cerveza de barril dentro del establecimiento para garantizar la calidad del producto.

2. Alcance

Este procedimiento aplica a los empleados cuyas funciones son el mantenimiento, limpieza y sanitización del sistema de dispensación de cerveza de barril en el establecimiento.

3. Responsabilidades

Encargado del establecimiento. Supervisar la implementación de este procedimiento, así como capacitar al personal para la correcta realización del protocolo de limpieza y sanitización del sistema de dispensación.

Personal del establecimiento. Realizar la limpieza y sanitización del sistema de dispensación de acuerdo con las instrucciones de este procedimiento.

4. Frecuencia

- 4.1 La limpieza y sanitización del sistema de dispensación se llevará a cabo de forma semanal.

	Limpieza y sanitización del sistema de dispensación de barril				
Clave: xxxx	Versión: 01	Fecha de aplicación: XX/XXX/20XX	Próxima revisión: XX/XXX/20XX	Sustituye a: N/A	Página: 02

4.2 Se debe realizar una limpieza y sanitización adicional siempre que se presenten problemas con algún producto, mal funcionamiento del sistema o cuando se observe cualquier indicio de contaminación del producto.

5. Desarrollo del proceso

5.1 Pasos preliminares.

5.1.1 Desconectar los barriles del sistema de dispensación y drenar las líneas para retirar la cerveza contenida a lo largo del sistema.

5.1.2 Realizar un enjuague utilizando agua potable tibia.

5.1.3 Desarmar las piezas del sistema que sea posible desmontar como los conectores de los barriles y grifos.

5.2 Inspección visual.

5.2.1 Verificar las condiciones del sistema de dispensación, identificando áreas que requieran mayor atención durante el proceso de limpieza o componentes que necesiten ser reemplazados.

5.3 Limpieza del sistema de dispensación.

5.3.1 Preparar la solución de limpieza de acuerdo con las indicaciones dadas por el fabricante del producto.

5.3.2 Llenar las líneas del sistema con la solución de limpieza y dejar actuar el tiempo indicado por el fabricante del producto. Utilizar una bomba de limpieza en caso de ser necesario.

5.3.3 Cepillar manualmente las llaves dispensadoras, conectores y otros componentes que fueron desmontados. Utilizar cepillos especiales para realizar este paso.

	Limpieza y sanitización del sistema de dispensación de barril				
Clave: XXXX	Versión: XX	Fecha de aplicación: XX/XX/20XX	Próxima revisión: XX/XX/20XX	Sustituye a: N/A	Página: 03

5.3.4 Limpiar las superficies externas del sistema de dispensación utilizando un trapo limpio y detergente.

5.3.5 Enjuagar con agua potable todas las líneas y componentes hasta eliminar cualquier rastro de detergente.

5.4 Sanitización del sistema de dispensación.

5.4.1 Preparar la solución sanitizante de acuerdo con las indicaciones descritas por el fabricante.

5.4.2 Llenar las líneas del sistema de dispensación con la solución sanitizante. Sumergir en la solución sanitizante los componentes desmontables.

5.4.3 Dejar actuar la solución sanitizante el tiempo indicado en las instrucciones dadas por el fabricante del producto.

5.4.4 Enjuagar con agua en caso de que las instrucciones del producto sanitizante así lo indiquen.

5.4.5 Dejar secar a temperatura ambiente todas las partes del sistema. Una vez secas, el sistema puede ser armado de nuevo.

5.4.6 Conectar los barriles de cerveza y realizar una prueba de dispensación para asegurar el buen funcionamiento del sistema.

5.5 Registros y revisiones.

5.5.1 Registrar en una bitácora la fecha, hora y nombre del personal responsable de cada limpieza realizada.

5.5.2 Revisar y actualizar este procedimiento anualmente o cuando sean necesarios cambios significativos en procedimientos, productos o equipos.