



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Centro de Estudios de Postgrado

RIESGOS MICROBIOLÓGICOS EN LA INDUSTRIA CERVECERA. EL CASO DE *PECTINATUS*.

Alumno/a: Olid López, María del Collado

Tutor/a: Prof. D^a. Magdalena Martínez Cañamero

Dpto: Ciencias de la Salud

2019

ÍNDICE

Resumen	1
Abstract	2
1. Introducción	3
2. Objetivos	13
3. Resultados	
3.1.Deterioro microbiológico por <i>Pectinatus</i>	13
3.2.Proliferación en cervecería	16
3.3.Mecanismos de supervivencia de <i>Pectinatus</i>	20
3.4.Detección del microorganismo	22
3.5.¿Cómo se puede combatir contra <i>Pectinatus</i> ?	35
4. Discusión	45
5. Conclusiones	47
6. Referencias bibliográficas	49

Resumen

Hay un pequeño grupo de bacterias alterantes de la cerveza, no patógenas, que pueden sobrevivir, crecer y alterar la cerveza, y por el contrario, existe otro tipo de microorganismos que sí resultan patógenos y pueden instalarse en la industria cervecera hasta llegar a deteriorar el producto final.

Aunque son muy pocos los casos de deterioro reportados en los últimos años debido a los altos niveles de higiene, aún existe el riesgo y se ha incrementado por los avances tecnológicos. Debido a las regulaciones estrictas en materia de inocuidad de alimentos y bebidas y al deseo de mantener un buen prestigio e imagen de la marca, los microorganismos alterantes de la cerveza son causa de preocupación para las fábricas de cerveza de todo el mundo. Las bacterias alterantes de la cerveza, anaerobias estrictas, pertenecientes al género *Pectinatus* son en la actualidad la principal problemática que supone un riesgo microbiológico para el producto final, la cerveza.

Debido a esta problemática, existe la necesidad de trazar un plan que permita el aseguramiento de la calidad en las cervecerías donde se trata el producto, además de un método preventivo, el cual sea rápido y eficaz para evitar consecuencias no deseables en el producto terminado, teniendo el objetivo de poder detectarlo a tiempo. Basados en esta necesidad, se realiza una revisión del género *Pectinatus*, desde sus características hasta su influencia negativa en el mundo cervecero, incluyendo cómo prolifera en el medio, los posibles métodos de detección y cómo podría ser combatido, con la finalidad de eliminar este microorganismo alterante de la cerveza.

Abstract

There is a small group of beer-altering, non-pathogenic bacteria that can survive, grow and alter beer, and on the contrary, there are other types of microorganisms that are pathogenic and can be installed in the beer industry until they deteriorate the final product.

Although there are very few cases of deterioration reported in recent years due to high levels of hygiene, there is still the risk and it has been increased by technological advances. Due to strict regulations on food and beverage safety and the desire to maintain a good reputation and brand image, beer-altering microorganisms are a cause of concern for breweries around the world. The beer-altering bacteria, strict anaerobes, belonging to the genus *Pectinatus* today is the main problem that poses a microbiological risk for the final product, beer.

Due to this problem, there is a need to draw up a plan that allows quality assurance in the breweries where the product is treated, in addition to a preventive method, which is quick and effective, to avoid undesirable consequences on the finished product, having the objective of being able to detect it in time. Based on this need, a review of the *Pectinatus* genus is carried out, from its characteristics to its negative influence in the beer world, including how it proliferates in the environment, the possible detection methods and how it could be fought, in order to eliminate this beer-altering microorganism.

1. Introducción

Los orígenes de la cerveza se remontan a 4000 – 3500 a.C., con gran importancia para las primeras culturas, particularmente para los egipcios, quienes fabricaron y obtuvieron un producto de alta calidad, el cual era exportado con gran interés hasta otras civilizaciones (8).

La cerveza tiene un valor nutritivo que ha formado parte, durante siglos, en el contexto cultural de la dieta de la población. Su consumo como bebida alcohólica o estimulante es una constante a lo largo de la historia de la civilización, en tiempos de crecimiento de muchas poblaciones. Además cuando se produjo la contaminación del suministro de agua, consiguientemente se produjo un aumento del consumo de cerveza y vino a medida que las poblaciones fueron creciendo (8).

Por todo ello, la cerveza ha sido la bebida alcohólica más común y antigua, teniendo a través de la historia un importante consumo social, y considerándose un producto excelente en cuanto a fuente de calorías, que desde su origen complementaba muchas dietas generalmente pobres. Además no contenía agentes infecciosos como podía ser el caso del agua o la leche, debido a su fermentación, y se le atribuyen importantes usos medicinales: vasodilatadora, indicada en tratamientos para la anorexia y anemia, se metaboliza fácilmente, es un potente diurético (8).



Figura 1. Beneficios de la cerveza.

<https://www.alimentatubienestar.es/beneficios-de-la-cerveza-para-la-salud/>

La cerveza contiene un 90% de agua y una amplia variedad de especies químicas con distintas propiedades que permite obtener un producto con unas cualidades determinadas, proporcionándole un determinado amargor, color, formación de espuma, y en definitiva el aspecto del producto final.

En cuanto a su elaboración, tradicionalmente se ha llevado a cabo con cebada, aunque dependiendo de la localización geográfica que se considere puede elaborarse también con otras materias como arroz (Japón), mijo (África), maíz/chicha (América latina). Por lo general, actualmente el término “cerveza” es el nombre genérico que se da a toda bebida fermentada fabricada a base de malta, agua, lúpulo y levadura (8).



Figura 2. Componentes básicos de la cerveza.

<https://es.dreamstime.com/stock-de-ilustraci%C3%B3n-colecci%C3%B3n-de-los-componentes-de-la-cerveza-image48105168>

La malta: proviene de unas variedades de cebada especialmente cultivadas, las cuales se hacen germinar de forma artificial y posteriormente son secadas y tostadas. Dependiendo del tipo de tueste que se lleve a cabo, se obtendrá el tipo de cerveza, de manera que: si está poco tostada se obtiene cerveza rubia, y si tiene un nivel mayor de tueste se obtiene la cerveza negra. El color se debe a productos obtenidos durante el proceso del secado de la malta.

El lúpulo: se trata de un componente introducido en la elaboración de la cerveza por su cualidad de conservación del producto. Esta planta, *Humulus lupulus*, es cultivada para desecar sus flores y utilizarlas especialmente para la industria cervecera. Son empleados para aromatizar y conferir al producto su amargor característico. Sus componentes aromáticos dan lugar al amargor característico en la cerveza con los iso- α -ácidos, aceites esenciales del lúpulo utilizado, compuestos de azufre, levadura, etc.

La espuma depende también de sustancias amargas del lúpulo, además de la presencia de CO₂ y sustancias en superficie.

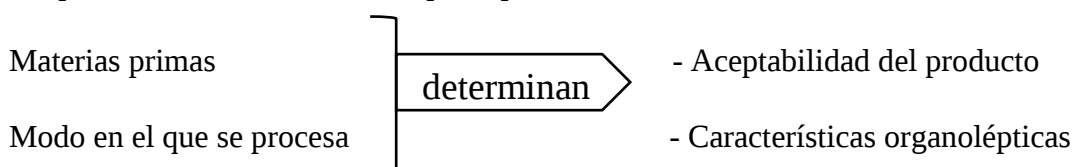
Los mencionados compuestos del lúpulo destacan por presentar además una actividad antibacteriana contra bacterias gram-positivas debido principalmente a sus iso- α -ácidos. Estos actúan como ionóforos que disipan el gradiente de pH a través de la membrana citoplasmática y reduce la fuerza motriz de protones (pmf). Debido a factores como estos, consecuentemente, la absorción de nutrientes se encuentra obstaculizada, y da lugar finalmente a la muerte celular, interfiriendo así en la vida de los microorganismos y por lo tanto en su presencia en el desarrollo del proceso industrial.

La levadura: se encuentra implicada en la transformación de los glúcidos y aminoácidos en alcohol y dióxido de carbono, destacándose por su habilidad para metabolizar azúcares. Durante el metabolismo de las levaduras se producen principalmente aldehídos, ésteres y alcoholes que son de gran importancia en las propiedades organolépticas de la cerveza. Las cepas de levadura más empleadas en la elaboración de cerveza son las correspondientes a la especie *Sacharomyces cerevisiae*.

Un proceso de vital importancia en la elaboración de la cerveza es la fermentación, por lo que esta debe ser desarrollada correctamente. Para ello tienen que darse unos factores importantes, donde la levadura actúa junto con unos nutrientes necesarios, como carbohidratos fermentables, aminoácidos, vitaminas, minerales y oxígeno

Los tipos de cervezas dependen de su nivel de fermentación: las elaboradas con levaduras de fermentación a temperaturas altas se denominan “Ale”, las de baja fermentación se denominan “Pilsener”, para la de fermentación inferior, más larga y fría, con un menor grado alcohólico, se utiliza el término “Lager” (“almacenar”), la cual es producida cuando la cerveza se almacena para que madure varias semanas antes de sacarla a la venta. Las cervezas de tipo sin alcohol constituyen un tipo especial, pudiendo ser elaboradas con levaduras especiales, eliminación de alcohol por destilación, reducción de contenido de mosto original, etc (8).

En general se puede tener una idea del complejo proceso que conlleva la elaboración de este producto, donde intervienen principalmente estos factores:



En general el proceso de fabricación de la cerveza podemos resumirlo en una serie de etapas (8):

- Molienda de la cebada malteada para formar harina basta.
- Remojado con agua caliente de la harina. Las enzimas de la malta son las encargadas de solubilizar el endospermo degradado de la malta molida.
- Separación del extracto acuoso (mosto dulce) de los sólidos agotados, pulverizando más agua caliente sobre la malta.
- Ebullición del mosto con el lúpulo, lo cual detiene la acción enzimática, esteriliza el mosto y coagula algunas proteína y taninos. En esta etapa pueden añadirse algunos elementos adjuntos la caldera de cocción del mosto.
- Clarificado, enfriado y aireado del mosto hasta convertirlo en un medio ideal para el desarrollo y fermentación de levaduras
- Fermentado del mosto con la levadura, hasta que la mayoría de los carbohidratos se hayan convertido en alcohol y anhídrido carbónico.
- Madurado y clarificado de la cerveza, modificando el sabor y el aroma, pero manteniendo siempre las cualidades suele ser la misma.
- Envasado de la cerveza. Normalmente tras pasteurizarse, aunque depende del tipo. De manera alternativa también se puede pasteurizar dentro del envase para envasar en botellas.



Figura 3. Proceso de elaboración de la cerveza

<http://www.cervezasinalcohol.es/blog/como-se-fabrica-la-cerveza-sin-alcohol/>

La cerveza y su industria han sido reconocidas como medios desfavorables para la proliferación de muchos microorganismos debido a que presentan una notable estabilidad microbiológica. Esta característica se atribuye principalmente a la presencia de compuestos como etanol, compuestos amargos de lúpulo, alto contenido de CO_2 , un contenido extremadamente reducido en oxígeno y la presencia solamente de trazas de sustancias nutritivas como la glucosa o maltosa. Estas últimas fuentes de carbono han sido sustratos para la elaboración de levadura durante el proceso de fermentación de la cerveza, mostrando un resultado de no crecimiento ni supervivencia de patógenos en la cerveza. Un factor muy importante en relación a la supervivencia de patógenos en la elaboración de la cerveza es el pH. La cerveza presenta un pH bajo (3.8 – 4.7), este factor facilita la entrada de ácidos orgánicos débiles en las células, llevando así a la acidificación intracelular y como consecuencia a la destrucción de los sistemas enzimáticos a la reducción en la absorción de nutrientes (13).

Sin embargo, a pesar de estas características que resultan desfavorables para patógenos, hay una determinada selección de microorganismos capaces de crecer en la cerveza. Dichos microorganismos deterioran este producto afectando negativamente a la calidad del producto final, y consecuentemente, a las ganancias económicas de las compañías cerveceras. Por lo tanto, en un medio como es la industria cervecera, un organismo dañino puede definirse como un organismo cualquiera, el cual no es deliberadamente introducido, y es capaz de sobrevivir y proliferar en dicho entorno (13).

Se ha demostrado que muchas cepas bacterianas son viables durante períodos prolongados en la cerveza, pero siempre que no puedan crecer en el producto y no sean dañinas no deben ser consideradas como organismos perjudiciales. Las bacterias que deterioran la cerveza han sido problemáticas en esta industria perjudicando al producto en su turbidez, acidez y la producción de olores desfavorables como diacetilo o sulfuro de hidrógeno (13).

Entre los microorganismos calificados como microorganismos dañinos en cerveza se encuentran tanto bacterias gram-positivas como gram-negativas. En el primer grupo nombrado se incluyen bacterias del ácido láctico, como es el caso de *Lactobacillus*, y en el segundo grupo se encuentra en caso que concretamente nos concierne en este proyecto: *Pectinatus* (4).

El papel de esta bacteria estrictamente anaerobia en el perjuicio de la cerveza ha incrementado desde las mejoras de la tecnología en la cervecería moderna e innovadora, donde se busca una significativa reducción del contenido de oxígeno en el producto final (1).

Para el control microbiológico es necesario un método que determina si el patógeno detectada es capaz de crecer en la cerveza o no, aplicando muchas técnicas biotecnológicas avanzadas, en lugar del método convencional y lento que en las últimas décadas se han llevado a cabo el desarrollo de métodos rápidos para la detección de organismos dañinos para la cerveza tales como: técnicas de bioluminiscencia, inmunoensayos, técnicas de filtro directo de epi-fluorescencia (DEFT), uso de la turbidimetría automatizada, medida de impedancia o conductancia, citometría de flujo, así como una serie de métodos que involucran tecnologías de ADN tales como técnicas de PCR (reacción en cadena de polimerasa) e hibridación de ADN (9).

De todas las nombradas anteriormente, a excepción de técnicas de bioluminiscencia, ninguna ha sido usada con resultado exitoso para el control y desinfección; por lo que estos métodos alternativos no parecen haber encontrado su vía en las cervecerías.

Microorganismo perjudicial: *Pectinatus*

La cerveza ha sido reconocida como una bebida con alta estabilidad microbiológica, de hecho sólo un número limitado de especies microbianas han sido capaces de alterarla, y una de ellas es el patógeno que supone un riesgo microbiológico en la industria cervecera: *Pectinatus* (13).

La bacteria del género *Pectinatus* irrumpió en los años setenta como contaminante y microorganismo dañino en el empaquetado de cerveza, gram negativa, mesofílica, de forma bacilar flagelada, no formadora de esporas, estrictamente anaeróbica, capaz de crecer en cerveza lupulada (13).

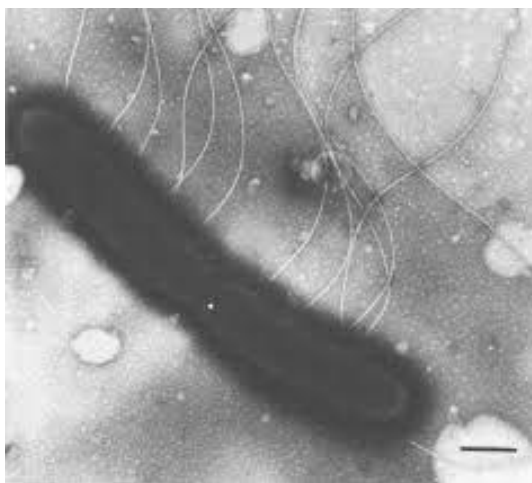


Figura 4. Imagen microscópica de *Pectinatus*

http://renati.sunedu.gob.pe/bitstream/sunedu/129405/3/Rodriguez_Saavedra_Magaly_M_URV.pdf

La figura 4 muestra a la bacteria *Pectinatus* en forma de bacilo con muchos flagelos, situados sólo a un lado de la célula bacteriana. El número de flagelos por célula depende del tamaño de la célula y su estado, pero oscila generalmente de 1 a 23 o más (13).

La emergencia de este género surgió simultáneamente en varios países como Alemania, Finlandia, E.E.U.U. estando vinculado a mejoras en las técnicas de llenado y embotellado representando estas mejoras una disminución en el oxígeno contenido en

las botellas, además de la tendencia hacia cervezas ligeras las cuales proporcionan un entorno de crecimiento más favorable (13).

Las cepas de *Pectinatus* fueron aisladas a partir de cerveza deteriorada, habiéndose encontrado desde su caracterización hasta la fecha aproximadamente 32 cepas de *Pectinatus* (1).

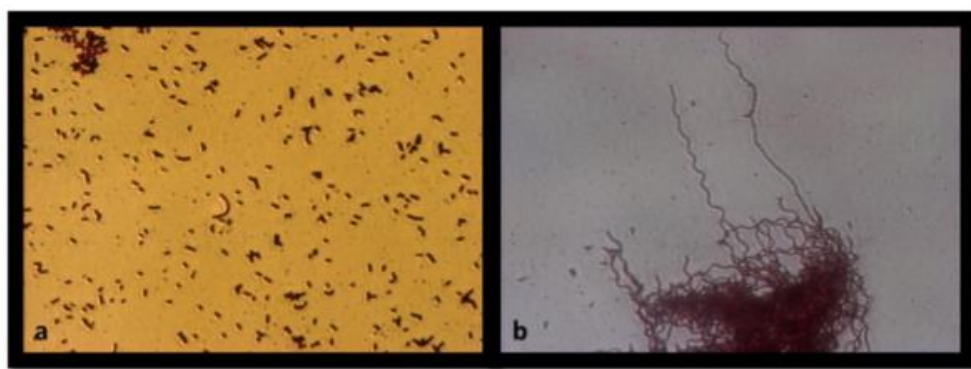


Figura 5. Morfología microscópica de cepa *Pectinatus*

a) cultivo fase exponencial a 40x

b) cultivo fase estacionaria a 40x

https://scholar.google.es/scholar?hl=es&as_sdt=0%2C5&q=%E2%80%9CDETECCIC3%93N+MOLECULAR+DE+Lactobacillus+spp.%2C+Pediococcus+spp.%2C+Pectinatus+spp.+Y+Megasphaera+spp.+EN+EL+PROCESO+DE+ELABORACI%C3%93N+DE+LA+CERVEZA%E2%80%9D&btnG=

El genoma básico propio de este género presenta diversas características de diferentes grupos de bacterias, teniendo bajo GC, propio de bacterias gram-positivas, y por otro lado tiene como propiedad fundamental de gram-negativas una membrana externa y lipopolisacáridos (LPS), los cuales tienen una amplia heterogeneidad ya que cada cepa de microorganismo produce varias moléculas de LPS macromolecular y estructuralmente distintas. En el caso de *Pectinatus*, el LPS ha mostrado un contenido en estructuras excepcionales de carbohidratos.

Su morfología, con características tanto de bacterias gram-negativas como gram-positivas, con la presencia de LPS (lipopolisacárido), como sello de distinción atribuido a las gram-negativas. Este LPS es el constituyente funcional de la membrana externa, encontrándose desprovistas las bacterias gram-positivas de dicha estructura.

El dilema en cuanto a la clasificación de *Pectinatus* según su estructura, debido a presencia de LPS en una bacteria con características de la clase de organismos gram-positivos, ha impulsado a estudios con el objetivo de clarificar la posición taxonómica. Han revelado la presencia de moléculas de LPS típicas en las cepas de *Pectinatus*, jugando un papel decisivo en la función de barrera de permeabilidad de la membrana externa contra las moléculas externas.

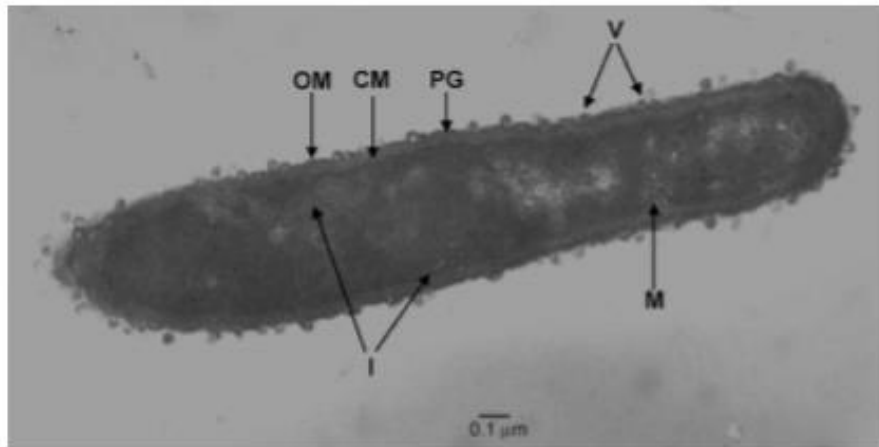


Figura 6. Imagen microscópica de la estructura de *Pectinatus*.

http://renati.sunedu.gob.pe/bitstream/sunedu/129405/3/Rodriguez_Saavedra_Magaly_M_URV.pdf

Las moléculas de LPS están compuestas de lípidos y polisacáridos con enlace covalente. La parte lipídica del lipopolisacárido es denominada lípido A, y esta funciona como el lípido anclado en la membrana externa, vinculado a la cadena de heteropolisacáridos por un azúcar especial: Kdo (ácido-3-deoxy-D-monano-2-ulosónico).

El oligosacárido central se divide en funcional y estructuralmente distintos núcleo "interno" (lípido A-proximal) y "externo". En muchas bacterias el oligosacárido central carga una cadena O-específica construido por unidades repetidas de polisacáridos en una estructura polimérica con un conjunto específico de longitudes de cadena.

A estas últimas se les atribuye el nombre de LPS de tipo liso o S-LPS, y también pueden mutar dando lugar a LPS de tipo rugoso o R-LPS.

La diversidad estructural de LPS entre distintos grupos bacterianos es más pequeña en la parte del lípido A y mayor en las cadenas específicas de O.

Un rasgo característico del LPS de *Pectinatus* es su naturaleza heterogénea con respecto a las estructuras de carbohidratos, como se detalla anteriormente. Más notablemente, el tipo de arquitectura LPS de "oligosacárido dual" no se ha encontrado entre otros géneros bacterianos, por lo que es interesante ver si dicha disposición del esqueleto del sacárido del LPS es compartida por otros géneros.

Aunque los diversos tipos de cepas de *Pectinatus* elaboran cadenas poliméricas específicas de O, otras cepas y muy probablemente la mayoría de los aislados de *Pectinatus*, poseen el LPS no repetitivo. Esto indica que la cadena específica de O no es esencial para la supervivencia de estas bacterias en la cerveza y en las cervecerías, sino que las bacterias pueden sobrevivir y proliferar con las formas truncadas de LPS, que tienen la parte distal del oligosacárido en lugar de la cadena específica de O.

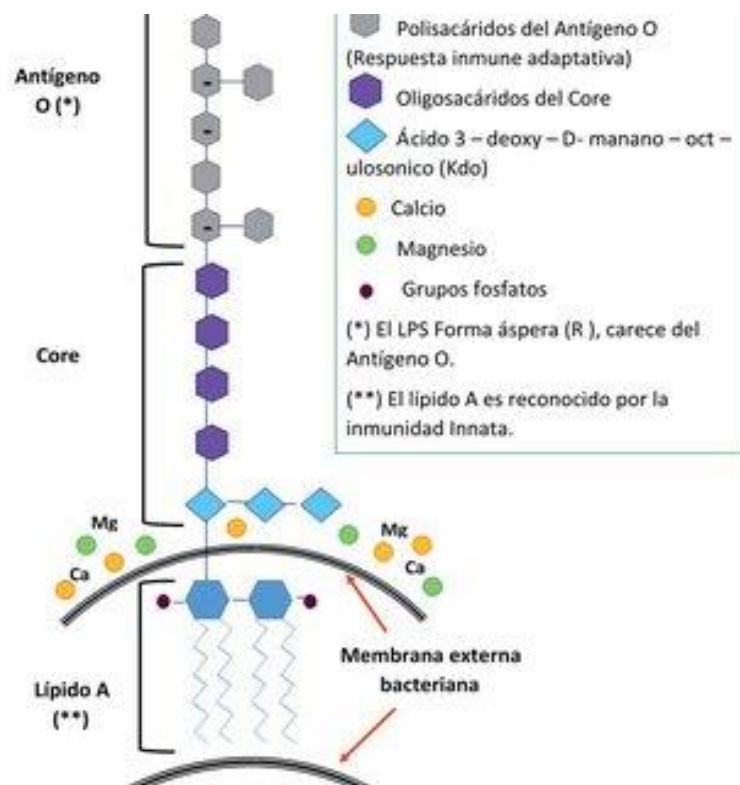


Figura 7. Esquema del LPS de *Pectinatus*.

https://www.researchgate.net/figure/FIGURA-1-Estructura-del-LPS-Fuente-Construida-por-los-autores-con-base-en-la-hallada-en_fig1_319972076

La estructura característica de esta bacteria es un punto clave que podría proporcionar pistas sobre el problema que nos preocupa en este trabajo, la capacidad de las bacterias *Pectinatus* para persistir en las cervecerías y crecer en la cerveza.

2. Objetivos

En el desarrollo de este trabajo tenemos como objetivos principales el conocimiento en profundidad del microorganismo que nos concierne, desde sus efectos en la industria cervecera hasta llegar a la detección de posibles métodos que nos permitan lidiar con el problema planteado.

Se han de llevar a cabo una serie de nociones básicas, permitiéndonos llegar a dicho objetivo final:

- Conocer el deterioro que produce *Pectinatus* en la cerveza.
- Conocer los motivos de su proliferación en este medio.
- Conocer los métodos que existen actualmente para su detección.
- Identificar posibles estrategias para combatir a tiempo a dicho microorganismo dañino para la industria cervecera.

3. Resultados

3.1. Deterioro microbiológico por *Pectinatus*

La supervivencia y el crecimiento de bacterias contaminantes en diferentes etapas del proceso de elaboración de la cerveza dependen principalmente de las propiedades específicas del entorno de la cerveza.

El producto en mal estado e imbebible se traduce en pérdidas económicas, siendo también es perjudicial para una marca de cerveza ya que se le atribuye potentes defectos sensoriales por el consumidor. La cerveza contaminada se vuelve turbia dentro en un periodo de entre 2-14 días dependiendo del número inicial de células y el tipo de las condiciones de almacenamiento de la cerveza. Las cervezas no pasteurizadas con un contenido de alcohol menor del 4,4% son particularmente susceptibles al deterioro por *Pectinatus*.

Entre las condiciones que influyen en la elaboración de la cerveza y desarrollo de los microorganismos que alteran al producto final con un notable potencial de deterioro sobre el producto se incluyen:

- La baja temperatura.
- Bajo pH.
- Presencia y concentración de lúpulo bacteriostático.
- Sustancias amargas.
- Baja disponibilidad de oxígeno.
- Alta concentración de dióxido de carbono, alcohol, SO₂, ácidos orgánicos, acetaldehídos y otros metabolitos como nutrientes.
- Temperatura de almacenamiento

Las bacterias anaerobias del género *Pectinatus* causan el deterioro de la cerveza al producir turbidez en esta, obteniendo productos de la fermentación de *Pectinatus* como son el ácido propiónico, el ácido acético, acetoína y H₂S. Dichas sustancias son producidas durante el crecimiento del microorganismo, dando lugar a la producción de sabores desagradables.

En procesos de detección de *Pectinatus* se ha hallado su presencia en aceites de lubricación mezclados con cerveza, en drenajes y en sistemas de tuberías de agua, en salas y máquinas de llenado, en el suelo de salas de llenado, en agua condensada en el techo, en lubricantes de cadenas y en malta remojada con agua antes de moler. Esto lleva al hecho de que a pesar de la naturaleza anaerobia de este microorganismo, puede sobrevivir en “aerosoles” y ser transferido por vía aérea, estando presente en diferentes partes de una cervecería.



Figura 8. Biopelículas en sistemas de drenaje de cervecerías.

https://www.google.com/url?sa=i&source=images&cd=&ved=2ahUKEwjBw46c44PIAhUfBGMBHTzOARYQjRx6BAgBEAQ&url=http%3A%2F%2Fnportal0.urv.cat%3A18080%2Ffourrepo%2Frest%2Faudit%2Fdigitalobjects%2FDS%3FobjectId%3DTFM%253A209%26datastreamId%3DPresentaci%25C3%25B3_en_dia_positives%26label%3DTFM%253A209%26mime%3Dapplication%2Fpdf%26language%3Des&psig=AOvVaw1PHnpDvZoG-8_s02QtNWf2&ust=1570318647667097

Las cepas contaminantes fueron habitantes permanentes en lugar de invasores ocasionales de la cervecería, formando “nichos” en la fábrica donde pueden sobrevivir y por lo tanto, no resulta sorprendente el hecho de que no se haya demostrado una fuente clara de contaminación fuera de la cervecería.

Esta bacteria incrementa la acidez de la cerveza, ya que entre las cervezas normales y las contaminadas se pueden comparar las cantidades de los ácidos orgánicos, encontrando las siguientes diferencias que delatan la influencia en el producto final (13).

Tabla 1. Ácidos orgánicos en cervezas normales y en cervezas contaminadas con *Pectinatus*.

Organic Acids in Normal and <i>Pectinatus</i>-Contaminated Beers^a		
Organic Acid	Normal Beer (mg/L)	Contaminated Beer (mg/L)
Gluconic acid	29 ^b	14
Pyroglutamic acid	115	96
Lactic acid	58	42
Acetic acid	90	221
Pyruvic acid	50	...
Malic acid	65	...
Propionic acid	22	933
Citric acid	104	...
Succinic acid	38	241

^a From Takahashi 1983 (24).
^b Final cell concentration approximated to be only 10⁵/ml.

El mínimo acceso de oxígeno es un avance de la tecnología cervecera destinado a mejorar la importante estabilidad química de la cerveza, aunque como consecuencia de ello, los anaerobios estrictos como es el caso de *Pectinatus*, son principalmente encontrados como notables contaminantes en cervecías modernas equipadas con efectiva tecnología de llenado.

Los productos finales del metabolismo de *Pectinatus* son extremadamente desagradables, y su crecimiento en la cerveza, incluso en conteo ($<10^6$ ufc/ml), hace que sea imposible beberla debido a los defectos sensoriales producidos, que hacen que el producto no sea apto para el consumo (13).

Tabla 2. Efectos alterantes y productos metabólicos de *Pectinatus*.

Ocurrencia en ambientes cerveceros	Off flavour/olor	Efectos dañinos visuales	Sabor	Productos Metabólicos
Cerveza con bajo alcohol o sin alcohol, cerveza no pasteurizada, área de llenadora, biolfim.	Olor que recuerda a huevos podridos, olor desagradable, olor fétido y a podrido.	Turbidez/ densa turbidez. Sedimentación gruesa y opalescencia.	Sabor ácido	Acidos: acético, propiónico, láctico, succínico, oxálico. H ₂ S, acetoína, metil mercaptano. Dimetil sulfuro - DMS

3.2.Proliferación de microorganismos patógenos en cervecería

A pesar de todos los medios preventivos establecidos para el buen estado del producto, existen unas pocas bacterias que pueden crecer en condiciones tan inhóspitas y pueden estropear la cerveza en las cuales se incluyen ambos tipos, tanto gram positivas como negativas. El papel de estas bacterias estrictamente anaerobias en el deterioro de la cerveza ha aumentado desde que la tecnología mejorada en las cervecerías modernas ha resultado en una reducción significativa del contenido de oxígeno en los productos finales (13).

Los productos potencialmente susceptibles a ser alterables por *Pectinatus* son aquellos en cuya producción existe una predisposición natural a la contaminación. Claros ejemplos de dicha situación pueden ser:

- Condiciones en determinados tipos de cervezas → según las condiciones que presenta el producto, como bajo lupulado, bajo alcohol, sin alcohol, o sin pasteurizar, dan lugar a una mayor susceptibilidad a contaminarse. La cerveza con bajo alcohol y sin alcohol: tienen un mayor riesgo de ser atacados por contaminantes secundarios
- Uso de pasteurización y esterilización → esta técnica, producida previo al llenado, y la esterilización en frío, incrementan el riesgo de contaminación secundaria de la cerveza.

- Deterioro producido "en envasado" → en esta etapa el producto está corriendo el riesgo de que la cerveza contaminada puede pasar al mercado antes que la presencia de *Pectinatus* sea detectada por métodos de cultivo convencionales.
- Contaminación según los métodos utilizados → la ausencia de pasteurización, donde las bacterias son contaminantes secundarios posterior a su envasado. *P. frisingensis* suele ser la más frecuente y responsable de los incidentes de deterioro de la cerveza en comparación con *P. cerevisiiphilus*.
- Contaminación por alterar el producto original → mixta de cerveza o cerveza "light", que normalmente se espera que tengan una susceptibilidad reducida a la descomposición precisamente a causa del muy bajo contenido de sustratos fermentables. Por el contrario, al realizar una disminución potencialmente alterante de la cerveza, centrándose especialmente en aquellas de tipo light (4% de alcohol, 10 IBU y pH 4).
- Situación térmica del ambiente → esto influye en la concentración de *Pectinatus* en el entorno de cervecería. Dicha concentración es mayor en los meses más calurosos, que en los meses más fríos del año, indicando que la fuente más común de contaminación es el embotellado y empaquetado en verano. También la persistencia de estos microorganismos en cervecería es favorecida por la alta humedad y alta temperatura, aproximándose a la temperatura de crecimiento óptima. El número de microorganismos en el aire se incrementa al aumentar la temperatura y la humedad.

Se conoce que *Pectinatus* es susceptible a la mayoría de los desinfectantes utilizados en las fábricas de cerveza y que son eficaces para su control, tales como yodo, cloro, ácido peracético y formaldehído, por lo que en principio esta bacteria puede ser fácil de controlar mediante tratamiento térmico y desinfectante oxidante. Sin embargo encontramos la problemática de que sobrevive en lugares como esquinas o en biopelículas, que son de difícil acceso para limpieza y desinfección, por lo que si la higiene de la planta se realiza de manera exhaustiva, debería reducir su incidencia en la fábrica de cerveza (13).

El tipo de distribución de la contaminación de la cerveza por *Pectinatus*, tiene características específicas (13):

- No contamina todo el lote, sólo algunas unidades al azar. La contaminación se produce principalmente a través del aerosol durante el envasado de la cerveza.

- El crecimiento de bacterias (turbidez) puede no ocurrir hasta varias semanas después de la contaminación, cuando la cerveza ya está en el mercado; en casos extremos puede conducir a una explosión debido a la acumulación de gas en la botella.
- Se estima que esta bacteria es causante entre 20-30% de las cervezas contaminadas.

Se puede encontrar en la cerveza contaminada 80, 13 y 290 µg/L de metilmercaptano, sulfuro de dimetilo y H₂S, respectivamente. Estos tres niveles son iguales o superiores a los umbrales de percepción. También se ha observado una gran cantidad de ácido propiónico, a menudo superior a 1000 mg/L en cerveza contaminada.

Sin embargo, las cantidades relativas de los productos finales mencionados son dependientes del sustrato utilizado. Los defectos sensoriales están relacionados principalmente con el propionato, H₂S y metilmercaptano.

Desde que la cerveza sale de la fábrica, queda fuera de control de los cerveceros y está sujeta a cualquier condición que impongan los distribuidores y consumidores. Los envases pueden estar expuestos a las fluctuaciones de temperatura, luz, y/o turbulencia, todos los cuales degradan la calidad del producto interior y promueven el crecimiento microbiano. Incluso en condiciones óptimas de almacenamiento, un importante volumen de cerveza puede pasar varios meses en el transporte y almacenamiento antes de su consumo, lo que aumenta la probabilidad de deterioro microbiano. La industria hace mucho abordó este tema a través de la estabilización del producto por medio de filtración, pasteurización, o alguna combinación de los mismos. Sin embargo, la creciente demanda de cervezas no pasteurizadas, y no filtrada (turbias), en los últimos años, ha aumentado la incidencia de contaminación microbiana en la cerveza envasada por microorganismos tales como *Pectinatus* (13).

Si observamos desde los inicios del proceso, el mosto es oxigenado antes de la inoculación de la levadura, para incrementar su biomasa. Este paso debería limitar la contaminación del mosto respecto a las bacterias anaeróbicas; sin embargo los últimos avances en tecnología cervecera conducen a obtener niveles muy bajos de oxígeno en el producto terminado, desde 0,4 hasta 0,8 mg/L, lo que hace posible el crecimiento y la proliferación de *Pectinatus* en la cerveza (13).

Es interesante notar que *Pectinatus* fue aislado por primera vez en cervecerías modernas donde esa clase de técnica es muy común (13).

Con la mejora e incorporación de nuevas tecnologías en la moderna industria cervecera, la importancia de diversos organismos perjudiciales específicos ha cambiado. El perfeccionamiento en la manipulación de cerveza y tecnología de embotellamiento ha tenido una significativa reducción del contenido en oxígeno durante el procesado y el empaquetado, el cual ha permitido el crecimiento de microorganismos estrictamente anaeróbicos. Esto se debe al contenido de oxígeno, el cual es un factor importante en el control de la microbiota que es capaz de crecer durante la producción y almacenamiento de la cerveza (2).

La cerveza es un ambiente pobre y bastante hostil para la mayoría de los microorganismos. Su concentración de etanol varía de 0.5% a 10% y generalmente en la cerveza estándar consumida se establece alrededor del 4%. La cerveza es un producto generalmente ácido, con un pH que oscila entre 3.8 y 4.7, el cual es más bajo que la media establecida para que la mayoría de las bacterias pueden llevar a cabo su crecimiento, por lo que se demuestra que la tolerancia del pH es dependiente de contenido de alcohol y de otras propiedades de la cerveza. Además, la alta concentración de dióxido de carbono y el contenido extremadamente bajo de oxígeno (<0.1 ppm) hace que la cerveza sea un medio casi anaeróbico. Por otro lado existe otro factor que hace de la cerveza un medio difícil para el desarrollo de microorganismos patógenos, que como se indica anteriormente en el apartado de “Introducción”, se trata de un compuesto fundamental y de vital importancia que contiene la cerveza: el lúpulo amargo. Entre los componentes de la cerveza, los compuestos de lúpulo han recibido mucha atención por sus valores conservantes y su amargor. En general, se creía que el lúpulo protege la cerveza de la infección para la mayoría de los organismos, aunque se determinó que los compuestos del lúpulo solo inhiben el crecimiento de bacterias gram-positivas y no de bacterias gram-negativas (13).

La química del lúpulo se ha desarrollado y la investigación se ha centrado especialmente en las propiedades antibacterianas de los compuestos del lúpulo y en las sustancias amargas derivadas del este, encontrándose presente en él con una cantidad aproximadamente de 17-55 ppm (2).

Un componente principal en el lúpulo son los llamados iso- α -ácidos, los cuales tienen la peculiaridad de ser tóxicos, especialmente para las bacterias gram-positivas. El grado de resistencia varía entre las bacterias. Se pensó que la resistencia al lúpulo era causada por la inmunidad adquirida debido al contacto prolongado con los compuestos del lúpulo en condiciones de preparación. Sin embargo, los organismos aislados de la cerveza en mal estado frecuentemente no crecen tras la reinoculación en la cerveza (2).

Por lo tanto, a pesar de todos estos mecanismos de barrera que podemos encontrar, se debe considerar que en el desarrollo de microorganismos patógenos en la cerveza existe un mecanismo capaz de evitar a estas barreras y permitir su proliferación.

3.3. Mecanismos de supervivencia de *Pectinatus*

La supervivencia de *Pectinatus* en ambientes aeróbicos de salas de llenado es posible debido a la formación de biopelículas y asociaciones simbióticas de microorganismos que sobreviven dentro de ellas, indicando esta supervivencia prolongada que el agua puede ser una posible fuente de contaminación. Su presencia en condiciones aeróbicas proporciona conocimientos básicos sobre la complejidad de estas biopelículas, ya que los colonizadores primarios de superficies (en cuestión de horas después del inicio de la producción) son microorganismos que producen sustancias poliméricas extracelulares (EPS). Dichos microorganismos pueden tratarse de bacterias Gram negativas (bacterias ácido acéticas: BAA) y levaduras, que proliferan los lugares donde se depositan los residuos de cerveza, agua u otros, de los procesos intermedios. Estos microorganismos consumen el oxígeno muy rápidamente por su intenso metabolismo aeróbico, creando condiciones anaerobias que apoyan el crecimiento de otros microorganismos, como es el caso del patógeno que nos atañe: *Pectinatus* (13).

Por otra parte, la muerte gradual de microorganismos aumenta el pH de las biopelículas, que a su vez también influye en el crecimiento de *Pectinatus*, promoviéndolo. Otros factores que aumentan a esta proliferación son los que se proporcionan por sustancias como el “limo”, sustancia resultante producido por estas biopelículas, el cual permite la protección de las bacterias contra la acción de agentes externos que pueden dar lugar a su degradación como: oxígeno, la desecación y agentes desinfectantes (13).

La formación de dichas biopelículas se apoya en la limpieza mecánica incompleta imperfecta antes de la desinfección química, convirtiéndose en una fuente permanente

de contaminación. La cerveza que entra en contacto con las biopelículas crea un ambiente ideal para la supervivencia y el desarrollo de microorganismos (13).



Figura 9. Biopelículas de *Pectinatus* en cervecerías.

https://www.google.com/url?sa=i&source=images&cd=&ved=2ahUKEwjBw46c44PIAhUfBGMBHTzOARYQjRx6BAgBEAQ&url=http%3A%2F%2Fnportal0.urv.cat%3A18080%2Ffourrepo%2Frest%2Faudit%2Fdigitalobjects%2FDS%3FobjectId%3DTFM%253A209%26datastreamId%3DPresentaci%25C3%25B3_en_dia_positives%26label%3DTFM%253A209%26mime%3Dapplication%2Fpdf%26lang%3Des&psig=AOvVaw1PHnpDvZoG-8_s02QtNWf2&ust=1570318647667097

El hecho de que estos microorganismos se encuentren generalmente en fábricas modernas grandes, no significa que no existan en cervecerías pequeñas. Aunque las condiciones en las fábricas de cerveza más pequeñas pueden ser menos ideales para la propagación de estos organismos debido a un mayor control del espacio por ser más reducido y a por ello más manejable (13).

Como aseguramiento de calidad, se debe tener en cuenta el aspecto preventivo en la planta, con las limpiezas periódicas que garanticen condiciones de trabajo higiénicas. Algunas fábricas de cerveza pueden sufrir gravemente de contaminantes secundarios sin ser previamente percibido en el producto terminado. Su aparición en ambientes aeróbicos indica problemas de saneamiento revela la presencia de biopelículas altamente establecida del microorganismo *Pectinatus* creando un problema potencialmente grave que puede llegar a ser muy perjudicial en un futuro.

Por ello un buen plan microbiológico debe enfocarse en controlar estos lugares de aparición primaria de *Pectinatus*, por lo que los esfuerzos, tanto en higiene,

mantenimiento y control microbiológico, deben centrarse en las superficies y a las biopelículas de la zona de envasado.



Figura 10. Aseguramiento de la calidad.

<https://www.aulafacil.com/cursos/administracion/gestion-de-la-calidad/proceso-de-realizar-el-aseguramiento-de-calidad-l35571>

Los diferentes métodos utilizados para el muestreo de biopelículas en las superficies externas e internas son: hisopado, enjuague, inundaciones con agar, agar de contacto. Usado como medida correctiva para su detección y posterior eliminación la aplicación de métodos físicos, químicos y medidas biológicas. Se ha sugerido el uso de agua de enjuague alcalina al final del procedimiento de limpieza (pH 12, con baja fuerza iónica), ya que en estas condiciones se disminuye la adhesión de las biopelículas a los materiales de construcción, tales como el acero inoxidable (13).

3.4. Detección del microorganismo

Las bacterias del género *Pectinatus* se aislaron por primera vez en la década de 1970, y hasta el momento ha sido detectado solamente en cerveza o en muestras obtenidas en ambientes de cervecerías, donde sus hábitats pueden ser desconocidos (3).

Aunque la mayoría de las especies de *Pectinatus* han sido aisladas en dicho entorno. Su origen y naturaleza como fuente de contaminación no se encuentran totalmente establecidos (3).

Un estudio de los lipopolisacáridos de *Pectinatus* sugiere que este género puede estar asociado originalmente con plantas. Esto se debe a cadenas-O, ricas en desoxiazúcares, que se observaron en algunas de las cepas de *Pectinatus*, que se encuentran a menudo asociadas a las bacterias saprofitas o patógenas de las plantas. Por lo que los autores plantearon la hipótesis de que *Pectinatus* podría haber llegado a las fábricas de cerveza con materiales vegetales, como los cereales, el arroz o el lúpulo (3).

Hay varios ambientes en cuanto a los lugares donde se han podido detectar:

-En bodegas: *P. cerevisiiphilus*, ha sido aislada en levadura para siembra, en muestras de agua de enjuague de línea colectoras y de recuperación de CO₂, que no son sometidos a regímenes de limpieza, debido a que esto implica un desmontaje intenso de los equipos, y por lo tanto, las bacterias pueden prevalecer en esta parte de la fábrica por mucho tiempo. *Pectinatus* se aisló ocasionalmente durante la maduración, en tanques de cerveza terminada antes de la filtración y en los canales de drenaje en el área de filtración de cerveza. Algo ocasional pero descriptivo es que se aisló del agua de remojo de la malta, antes de la molienda. El crecimiento de *Pectinatus* se ralentiza considerablemente a bajas temperaturas y por lo tanto rara vez se encuentran en bodegas cuando es de baja fermentación; pero puede estar presente en cervezas de alta fermentación, debido a las temperaturas más altas.

-En envasado: aunque suele ser poco probable una contaminación accidental con *Pectinatus*, cada vez habita más permanentemente en ciertos entornos en las cervecerías. Se ha encontrado cepas serológicamente idénticas en la misma fábrica con un intervalo de 4 años. A pesar de ser anaerobias su presencia en los aerosoles (por un período de tiempo) alrededor de las llenadoras, en el aire u otros aerosoles podrían ser una posible fuente de contaminación.

En general, los números más altos de microorganismos se encuentran en el aire, alrededor de la llenadora, al parecer debido a la aerosolización continua de la cerveza en esta ubicación. Por lo tanto *Pectinatus* puede ser transmitida a los materiales de llenado, y luego, a la cerveza a través de los aerosoles producidos durante el proceso de llenado y durante los procesos de limpieza.

Pectinatus se ha aislado a partir de aceite de lubricación mezclado con cerveza y agua, en grietas del sistema de drenaje, de aire y pisos de zonas de llenado, de agua condensada de los techos, baldosas sueltas y en suelos dañados, en general en áreas que a menudo son anaerobias. Una fuente de contaminación durante el llenado de cerveza pueden ser las cintas transportadoras, especialmente cuando no se incluyen en el proceso de limpieza de la línea. También se puede encontrar en biopelículas, sobre superficies rugosas en la sala de embotellado, en ruedas de estrellas que son altamente aeróbicas (13).

Tabla 3. Puntos de muestreo y zonas de detección positiva en 10 plantas cerveceras en el período de 3 años.

Sample area		Sampling sites	% of <i>Pectinatus</i> positive samples	Total number of samples	
Conveyor belt	Before monoblock	Surface of conveyor belt ^b	14.6	75	
		Side ledge of the conveyor belt cover ^{a,b}	58.5	65	
		Stainless steel conveyor belt cover – inside part ^{a,b}	26.7	56	
		Conveyor belt construction and brackets ^{a,b}	44.0	50	
		Driving rollers underneath the conveyor belt ^b	31.3	48	
		Bundles of cable lines underneath the conveyor belt ^{a,b,c}	27.7	36	
		Plastic sleeves ^{a,b}	23.7	38	
		Conveyor belt construction stand ^{a,b}	45.3	38	
	After monoblock	Conveyor belt surface ^a	50.9	110	
		Side ledge of conveyor belt cover ^{a,b}	69.2	65	
		Stainless steel conveyor belt cover – inside part ^{a,b}	72.1	86	
		Conveyor belt – from underneath ^a	36.4	44	
		Driving rollers underneath the conveyor belt ^b	48.4	62	
		Bundles of cable lines underneath the conveyor belt ^{a,b}	80.6	36	
		Plastic sleeves ^{a,b}	46.9	32	
		Conveyor belt construction stand ^{a,b}	70.0	40	
Monoblock	Construction	Monoblock bench ^b	40.3	139	
		Surface of piping below monoblock bench ^{a,b}	61.5	52	
		Monoblock construction struts ^{a,b}	45.8	48	
		Cable channel underneath the monoblock bench ^{a,b}	17.3	52	
		Brackets of piping and cables underneath the monoblock bench ^{a,b}	53.2	62	
		Engine cover ^{a,b}	54.8	42	
		Inside surface of stainless steel (or Plexiglas) side covers of monoblock ^b	0	26	
		—	—	—	
	Filler	Inlet star – stainless steel hub ^b	Inlet star – framework ^b	14.6	89
			Inlet star – shaft ^b	8.0	75
			Filling tubes ^b	2.2	46
			Centering bells ^b	0	56
			Filler frames ^b	0	42
			Filler pantographs ^b	0	35
			Outlet star – stainless steel hub ^b	0	29
			Outlet star – framework ^b	13.7	51
Outlet star – lateral frame struts ^b			8.2	49	
Outlet star – shaft ^b			0	36	
Crownner		Capping heads ^b	2.3	43	
		Crownner framework ^b	21.1	76	
		Bottle stands ^b	13.4	52	
		Crownner star ^b	23.2	82	
		Crownner shaft ^b	22.4	85	
		Floor underneath the monoblock and the conveyor belt ^{a,b,c}	12.5	48	
		Floor cracks ^{a,b,c}	44.6	65	
		Crumbling floor joints ^{a,b,c}	90.0	50	
Floor	Sewers – sewage system ^{a,b,c}	90.5	42		
		36.5	52		

^a Biofilm formation.

^b Beer/water residues.

^c Mechanical impurities.

La detección de *Pectinatus* por técnicas microbiológicas tradicionales lleva mucho tiempo y no es práctico como medida preventiva de control del producto y se complica por las estrictas condiciones anaeróbicas requeridas.

Los test utilizados en la mayoría de los laboratorios de cervecería se limitan a pruebas basadas en el desarrollo de la turbidez visual de la cerveza o en cerveza mezclada con un medio de enriquecimiento, realizando este seguimiento durante 4-6 semanas de incubación a 30 ° C, por lo que en consecuencia existe la necesidad de un método más rápido.

El control microbiológico en cervecería utiliza principalmente métodos clásicos de cultivo, combinados con una simple identificación fenotípica de aislamientos. Se basan generalmente en criterios bioquímicos, morfológicos y fisiológicos (asimilación de nutrientes, la microscopía y la tinción selectiva, respectivamente). El conteo en placa y enriquecimiento siguen siendo los principales métodos para la detección de contaminación microbiana en las fábricas de cerveza durante el proceso de elaboración de la cerveza y en producto final

La mayoría de los medios recomendados para anaerobios son líquidos y contienen sustancias reductoras del potencial redox del medio. La temperatura adecuada para el cultivo de *Pectinatus* es 28-32 ° C y el pH en el intervalo de 5,0 a 7,0. En los laboratorios de cervecería para la detección de *Pectinatus* en el producto terminado donde la cerveza está almacenada a temperatura ambiente durante hasta seis semanas, se observa mediante la formación de turbidez. *Pectinatus* también se pueden cultivar y mantener en el caldo MRS, (de Man Rogosa, Sharpe) cultivado con un mínimo de cámara de aire y con el uso de un inóculo abundante. Además existe una variante más rápida, la "prueba forzada", en la que se pone a prueba el desarrollo de turbidez en la cerveza o la cerveza mezclada con un medio de enriquecimiento, seguido de 4-6 semanas de incubación a 30 °C.

Gracias al desarrollo de métodos modificados como los nombrados, se ha logrado detectar *Pectinatus* en periodos de 1-3 semanas aproximadamente mediante la adición del medio MRS a la cerveza sospechosa reduciendo el período de incubación a pocas semanas mediante el uso del caldo NBB-C (13).

Tabla 4. Fórmula del medio MRS.

Fórmula (en gramos por litro)	
Proteosa peptona N° 3	10.0
Extracto de carne	8.0
Extracto de levadura	4.0
Glucosa	20.0
Monoleato de sorbitán	1 ml
Fosfato dipotásico	2.0
Acetato de sodio	5.0
Citrato de amonio	2.0
Sulfato de magnesio	0.2
Sulfato de manganeso	0.05

Sí se usan medios como los nombrados, con caldo MRS con una concentración convencional o modificada, estos son utilizados para la etapa de cultivo de *Pectinatus* previo a la identificación por PCR (13).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se aplica actualmente como una herramienta de diagnóstico para patógenos y contaminantes transmitidos por los alimentos (9).

En el presente procedimiento se presenta el aislamiento de ADN de la muestra de cerveza contaminada, utilizando la reacción en cadena de la polimerasa, la cual mediante la identificación electroforética de los productos de reacción podría ser realizado en un periodo aproximado de las 10 h para la detección en cerveza inoculada (9).

La técnica por lo tanto tiene un potencial en el control de rutina del producto.

Se han realizado ensayos trabajando con bacterias y en unas condiciones de cultivo determinadas que han permitido analizar cómo funciona este método.

Según un estudio realizado se llevó a cabo el siguiente ensayo, utilizando:

- Cinco cepas de *Pectinatus cerevisiiphilus* (VTT E-79103, VTT E-79105, VTT E-81132, VTT E-88329, VTT E-89371).
- Seis cepas de *Pectinatus jrisingensis* (VTT E-79100, VTT E-79104, VTT E-80121, VTT E-87307, VTT E-91350, VTT E-91471)

Un medio de crecimiento fue PYF modificado (peptona, 5 g; triptona, 5 g; extracto de levadura, 10 g; fructosa, 5 g; Na₂HPO₄, 2 g; Tween 80, 1 ml; cisteína-HCl, 0.5 g, en 1,000 ml de agua destilada) (16).

El tratamiento de las muestras de cerveza se realizó de manera que se pudiera probar la aplicabilidad de la PCR en muestras de cerveza reales, usando alícuotas de 1 ml de diluciones en serie de la bacteria, concretamente de *P. cerevisiophilus*. Del cultivo se mezclaron con 100 ml de cerveza comercial (alcohol contenido, <4.7%, vol). Los recuentos bacterianos fueron determinados por plaqueo en agar PYF (16).

Las bacterias fueron cosechadas por filtración usando una membrana de polycarbonato con un tamaño de poro 0.4-11m (Millipore), con el objetivo de utilizar el filtro, transfiriéndolo a un tubo Eppendorf. El ADN se aisló como antes pero usando volúmenes dobles de ambos Tris-EDTA tampón y la solución de lisozima-mutanolisina para asegurar total inmersión en membrana. Una extracción adicional de cloroformo para disolver la membrana de polycarbonato también se llevó a cabo antes del tratamiento con fenol (16).

Posteriormente, cerveza contaminada naturalmente por *Pectinatus* se sometió a la PCR. Diluciones seriadas fueron elaboradas en cerveza fresca de la misma marca y obtenidos de misma cervecería, haciendo aislamientos de ADN a partir de las diluciones.

Los cultivos estrictamente anaerobios se mantuvieron en un Whitley Anaerobic Gabinete MK. III en una atmósfera de N₂ (80%), CO₂ (10%) y H₂ (10%), y la temperatura de crecimiento fue de 30 ° C, utilizando un control de bacterias para evaluar la especificidad de PCR. Para el aislamiento de ADN, las células son recogidas de 1 ml de cultivo por centrifugación. Se lavan con tampón Tris 50 mM (pH 8,0) y se suspenden en 100 μ l de tampón Tris-EDTA 50 mM (pH 8.0). Lisozima (100 μ l, 20 mg /ml) y mutanolisina (8 μ l, 0.5 mg /ml) se añadieron a la mezcla (16).

Se incubó a una temperatura de 37 ° C durante 1 h, produciendo después la lisis de las células mediante la adición de 20 μ l de dodecil sulfato de sodio al 20% y 12 μ l de proteinasa K solución (14,6 mg / ml), volviendo a incubar durante 10 min a 65 ° C. El volumen se ajustó a 500 μ l con agua ultrapura estéril, y el lisado fue desproteinizado por extracción con un volumen de fenol saturado con Tris, y la fase acuosa se extrajo una vez más con un fenol: cloroformo (1: 1) (16).

Finalmente, el ADN se precipitó al agregar 0.1 volumen de acetato de sodio 3 M a la fase acuosa seguido de dos volúmenes de etanol al 94% e incubación en un baño de hielo durante 30 minutos, y se lava el sedimento de ADN con etanol al 70% disolviendo por último en 20 µl de agua ultrapura estéril (16).

En cuanto a los cebadores, las secuencias de ADNr 16S de las especies de *Pectinatus*, se usaron para el diseño del cebador, utilizándose para la comparación de homología entre el ADN de *Pectinatus* y otras especies y géneros.

El diseño final se llevó a cabo con la ayuda de un programa PCRPLAN, siendo los cebadores directos e inversos utilizados (enumerados de 5 'a 3'):

GCTTTTAGCTGTCGCTTGGA // TGCATCTCTGCATACGTCAA,

respectivamente, y se especificaron el fragmento de 815 pb entre posiciones 212 y 1027 en la secuencia de ADNr 16S.

La turbidez de la cerveza era visible; en consecuencia la cuenta celular se determina usando una cámara de conteo Thoma (16).

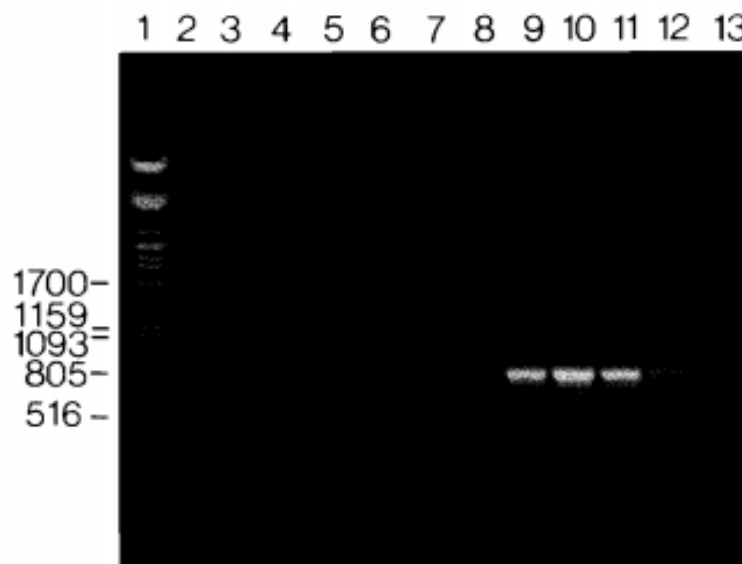


Figura 11. Productos de PCR obtenidos

En la figura se muestran los diferentes productos obtenidos, usando cebadores específicos de *Pectinatus*.

El ADN visto de izquierda a derecha:

- 1) Marcador de peso molecular (ADN digerido con pstI. ADN)
- 2) *Pediococcus damnosus*
- 3) *Leuconostoc mesenteroides*
- 4) *Pantoea agglomerans*
- 5) *Lactobacillus brevis*
- 6) *Megasphaera cerevisiae*
- 7) *Selenomonas lacticifex*
- 8) *Zymophilus raffinivorans*
- 9) *Pectinatus frisingensis*
- 10) *Pectinatus cerevisiiphilus*
- 11) *Pectinatus frisingensis*
- 12) *Pectinatus cerevisiiphilus*
- 13) control de reacción sin plantilla de ADN.

Como se ha mencionado anteriormente, un medio prometedor que se puede aplicar para el análisis de superficies y de biopelículas de los dispositivos de fábrica, en la zona de envasado, es el caldo MRS reducido, el cual es una composición modificada, llamada MRS-T, que contiene una mezcla de tetrahydro- α -ácidos y feniletanol para inhibir la microbiota bacteriana acompañante.

Este medio permite la detección de *Pectinatus* siendo adecuado tanto para el muestreo como para el cultivo. Contiene 0,2 % en peso de agar, lo que posibilita la ventaja de restringir su oxidación durante la manipulación y el transporte. La incubación se lleva a cabo a una temperatura de 28-30 °C y se controla la formación de turbidez (13).

Se puede detectar en el microscopio después de 24-48 horas de la inoculación el típico movimiento de serpiente de *Pectinatus*. Como ya se ha mencionado anteriormente, los diferentes métodos utilizados para el muestreo de biopelículas en las superficies externas e internas son: hisopado, enjuague, inundaciones con agar, agar de contacto, etc. Por la naturaleza anaeróbica de *Pectinatus*, por su practicidad y por no dejar residuo nutritivo, el método de muestreo más adecuado será el hisopado (13).

Para garantizar seguridad en la detección es un buen planteamiento optimizar el medio MRS-T, rapidez, selectividad, claridad de lectura, de fácil preparación y de bajo costo.

Para llevar a cabo el desarrollo de este medio, se realizó un ensayo con microorganismos de *Pectinatus*. Éste se cultivó en caldo MRS líquido que contiene 22 clorhidrato de cisteína y tioglicolato de sodio en una concentración de 0,25 g/L, (MRS-ct) con pH 5.6 a 5.8, por 48 horas a 28 °C (13).

Tabla 5. Fórmula del medio MRS-T

Component	Amount
MRS broth	According to the instructions of producer
Sodium thioglycolate	0.25 g
Cysteine hydrochloride	0.25 g
Tetrahydroiso- α -acids	50 mg
2-Phenylethanol	0.15%
Agar bacteriological	0.2%
Distilled water	1,000 mL
Final pH	6.5

El método de muestreo simulando la técnica de hisopado, un método muy antiguo y de los más utilizados en el análisis microbiológico de superficies, sobre todo de aparatos y utensilios. Está especialmente recomendado para estudiar superficies muy contaminadas, permitiendo realizar diluciones decimales de la muestra, y desarrollando el procedimiento a seguir del siguiente modo (13):

- Delimitar la superficie que se va a analizar mediante una plantilla de papel de aluminio estéril, con una abertura de dimensiones conocidas.
- Humedecer el hisopo estéril en un tubo de solución salina con 4.5 ml estéril y restregar varias veces por la superficie delimitada de la plantilla.
- Introducir de nuevo el hisopo en el tubo de solución salina y dejar en reposo el hisopo dentro del tubo entre 15-30 minutos de manera que los microorganismos se liberen del algodón al líquido.
- Sembrar 0.1 ml del líquido en una placa con medio TSA.
- Incubar la placa a 37 °C durante 24-48 h y realizar el recuento, expresándolo como UFC por unidad de superficie. Se utilizó agua de humectación para los hisopos, para lograr mejores resultados, previo a la toma de muestra por hisopado, resultando ventajoso humectar el hisopo con agua reducida estéril.

La modificación del medio MRS-T se basa en el uso del caldo MRS comercialmente disponible modificado por la adición de agar, compuestos reductores del potencial redox (tioglicolato de sodio y clorhidrato de cisteína), y los componentes selectivos de 2-feniletanol y THIAA. Adicionalmente a estos componentes se utilizó cicloheximida, azul de metileno y rojo de bromofenol. El medio se prepara mezclando todos los componentes, ajustado a un pH=7 +/- 0.1, dispensado en alícuotas de 12 mL en tubos de ensayo bacteriológico y se autoclava durante 15 min a 121 °C (16).

Tabla 6. Fórmula del medio modificado.

Composition of modified NBB medium	
Casein peptone	5.0 g
Yeast extract	5.0 g
Meat extract	2.0 g
Tween-80	0.5 ml
Potassium acetate	6.0 g
Sodium phosphate, dibasic	2.0 g
L-Cysteine monohydrochloride	0.2 g
Chlorophenolred	70 mg
Glucose	15 g
Maltose	15 g
L-Malic acid	0.5 g
Agar	15 g
Beer/distilled water (1:1), ad	1000 ml
Final pH	5.8
Kindraka, 1987.	

El medio MRS-T modificado se puede mantener en refrigeración y protegido de la luz por un máximo de 14 días. El desarrollo del medio implica probar diferentes opciones para conseguir mejoras (13).

Diferentes concentraciones de cicloheximida (Cy)→ para inhibir levaduras y aumentar su selectividad. Los microorganismos mencionados anteriormente, se cultivaron y 1 mL de cada microorganismo a concentración de 10⁸ ufc/mL (medido en una cámara de Neubauer) se coloca en un tubo de ensayo. En ese pool de microorganismos se sumerge el hisopo y se inocula en el medio MRS-T líquido recién preparado sin cicloheximida y con cicloheximida a concentraciones de 10, 20 y 30 mg/L. Se cultivó a 28 °C durante un máximo de 5 días. Se controló la formación de turbidez y sedimento cada 24 horas. La microscopía de las muestras se realizó con microscopio de luz convencional después de 24 h de cultivo (13).

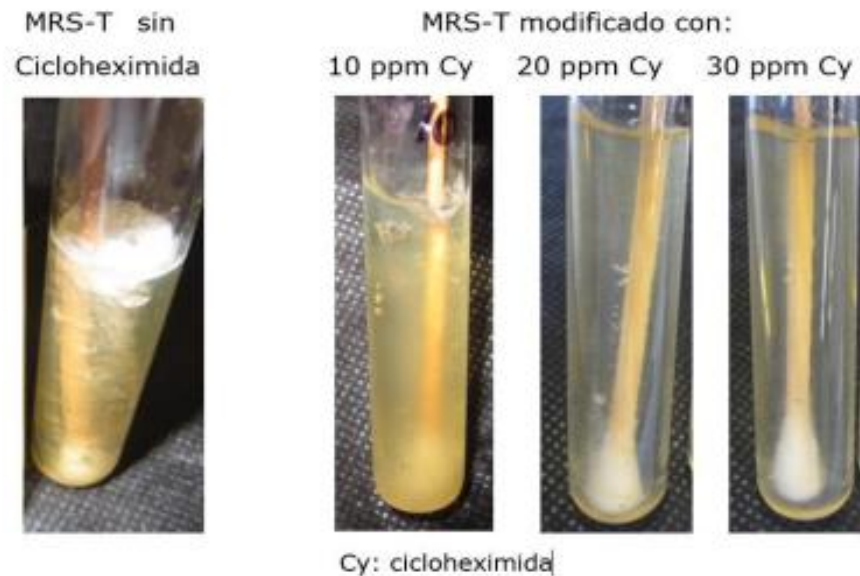


Figura 12. Medios con diferentes concentraciones de cicloheximida.

http://renati.sunedu.gob.pe/bitstream/sunedu/129405/3/Rodriguez_Saavedra_Magaly_M_URV.pdf

Probar diferentes concentraciones de rojo de bromofenol (RBF) como un indicador de color para facilitar la lectura de resultados. Prueba de Cambio de Color por uso de indicador de pH. Se preparó el medio MRS-T modificado con Cy (20 ppm) y se adicionó RBF a 75 ppm y se preparó otra similar con 25 ppm de RBF.

Cambio de color de rojo a amarillo por descenso de pH → este se comparó cada 24 horas; debido a la producción de ácidos por *Pectinatus*. Se incubó las cepas individualmente, para evaluar el aporte de ácidos en el medio por cada una de ellas. Se realizaron tres pruebas por cada concentración y por cada microorganismo (13).

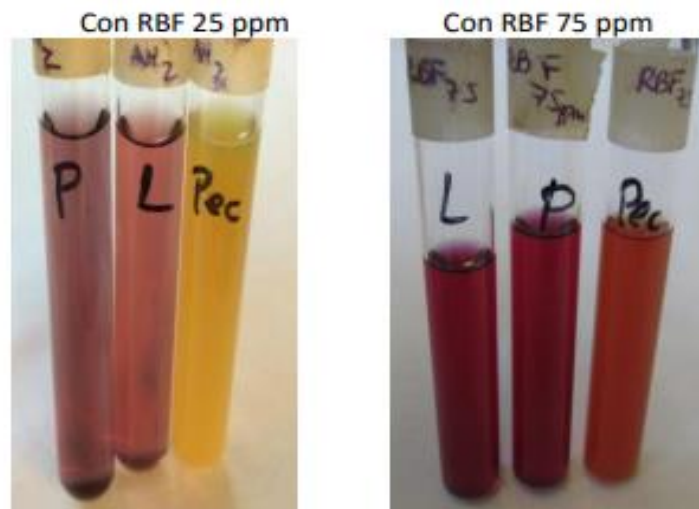
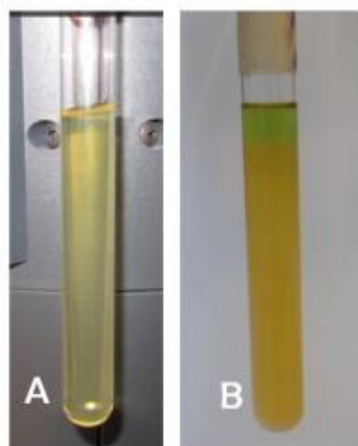


Figura 13. Resultados a diferentes concentraciones de rojo de bromofenol.

http://renati.sunedu.gob.pe/bitstream/sunedu/129405/3/Rodriguez_Saavedra_Magaly_M_URV.pdf

Prueba de oxidación del medio por uso de agente de óxido reducción → se aprecian los resultados obtenidos de esta prueba.



A) Medio inicial recién autoclavado y enfriado.

B) Medio MRS-T-con cicloheximida y azul de metileno, a las 48 horas de incubación con el cultivo mixto.

Se observa la coloración azul desarrollada por la oxidación de azul de metileno. En dicha zona no hay turbidez, lo que indica que en esa zona no se ha desarrollado *Pectinatus* por la presencia de oxígeno.

Figura 14. Resultados con el uso de azul de metileno como agente de óxido reducción.

http://renati.sunedu.gob.pe/bitstream/sunedu/129405/3/Rodriguez_Saavedra_Magaly_M_URV.pdf

Comprobación de la utilidad de uso de Agar al 0.2% → se aprecian los resultados obtenidos de esta prueba.



Figura 15. Resultados con el uso de azul de metileno como agente de óxido reducción

http://renati.sunedu.gob.pe/bitstream/sunedu/129405/3/Rodriguez_Saavedra_Magaly_M_URV.pdf

En su desarrollo *Pectinatus* produce metabolitos ácidos, por lo que baja el pH del medio. Esto se aprovechó con el uso de un agente indicador de pH. De las dos concentraciones de rojo de bromofenol analizadas en el medio, (25 y 75 ppm), la concentración de 25 ppm mostró una mejor variación de color. Esto facilita la lectura al analista, ya que cuando se realiza hisopados de superficie en los salones de envasado, se usa una gran cantidad de tubos y si la cervecera cuenta con varias zonas de envasado, esta cantidad se multiplica. Si únicamente se observara microscópicamente cada uno de los tubos, cada 24 horas, resultaría ser un método poco práctico, agotador y demandaría mucho tiempo. Así la utilidad del uso de un indicador de pH por cambio de color resulta muy práctico y ventajoso (13).

De esta manera sólo aquellos tubos en los que se tiene duda del cambio de coloración, podrían observarse al microscopio, aunque por análisis sensorial (producción de H_2S) los tubos positivos dudosos, podrían ser rápidamente diferenciados de los negativos (13).

El uso de un agente de protección del medio frente a la oxidación durante el transporte es de vital importancia. En las cervecerías, la distancia de transporte entre el laboratorio y zonas de envasado, las subidas y bajadas de la gradilla al momento de hisopar, la apertura y cierre de cada tubo y la introducción del hisopo, hacen que un medio líquido o caldo incorpore oxígeno del aire, oxidándolo. En estas condiciones *Pectinatus* no se podría desarrollar y si estuviese presente en la muestra, el resultado sería un falso negativo. Para remediar este contratiempo en el proceso, usar 0,2% de agar en el medio evita que el oxígeno ingrese al medio, incluso cuando se sumerge el hisopo (13).

Todos los componentes del medio son fáciles de adquirir, de bajo costo, de preparación simple y no requiere personal altamente especializado para la toma de muestra ni para la interpretación de resultados, por lo que facilita mucho el desarrollo y trabajo de este método.

3.5. ¿Cómo se puede combatir contra *Pectinatus*?

Debido a la capacidad de diversas especies bacterianas para tolerar ciertas condiciones inhóspitas presentes en ambientes de cervecería, se han llevado a cabo estudios para observar dicho potencial. La capacidad que tienen las bacterias para estropear la cerveza, persistir y replicarse en las duras condiciones ambientales experimentadas en la cervecería, asegura que una vez contaminada, es difícil controlar o rectificar el problema

El caso que nos concierne es el de bacterias gram-negativas como *Pectinatus frisingensis* y *Pectinatus cerevisiiphilus*, que han sido identificadas en dichos ambientes, concretamente en cerveza en mal estado.

Se han contemplado diversas opciones para combatir dichos incidentes:

- La adición de antibióticos sintéticos

Dicha adición se realizaría en los vasos de fermentación, aunque esta opción se considera antieconómica y censurada por el consumidor y, por lo tanto, no se ha llevado a cabo (8).

- Conos de lúpulo (*Humulus lupulus*) o sus extractos.

Dichas sustancias que en primer lugar son agregadas a la cerveza y a las fermentaciones de cerveza para obtener sabor, a su vez pueden actuar como agentes antimicrobianos naturales contra muchas bacterias Gram-positivas (8).

Esta propuesta está notablemente correcta, pero sin embargo, últimamente se ha observado resistencia a los compuestos del lúpulo en determinadas cepas bacterianas que impiden el uso de una barrera natural contra la contaminación (8).

Uno de los puntos en los que más hincapié se ha hecho, especialmente en las bacterias del ácido láctico, es la resistencia al lúpulo, que es crucial para la habilidad de crecer en cerveza. Los componentes del lúpulo, reciben mucha atención por sus valores conservadores y su amargura.

En general la creencia se basaba en que los lúpulos protegen a la cerveza de la infección por microorganismos, incluidos los patógenos, pero en el siglo XX se demuestra que los compuestos del lúpulo solo inhiben el crecimiento de bacterias gram-positivas y no de bacterias gram-negativas. Dicha afirmación tuvo un gran impacto porque muchos de los patógenos son bacterias gram-negativas, aunque entre las bacterias gram-positivas, algunas especies de bacterias del ácido láctico son menos sensibles a los compuestos del lúpulo y pueden crecer en la cerveza. Solo algunas bacterias son capaces de crecer bajo determinadas condiciones y dañar a la cerveza (tabla 7), incluyendo a ambos grupos, especies gram-positivas y negativas. Las bacterias gram-positivas son consideradas como las más dañinas para la industria cervecera y son la causa de la mayoría de los incidentes de deterioro bacteriano, siendo solo unas pocas bacterias gram-negativas las que causan deterioro de la cerveza (13).

Tabla 7. Bacterias perjudiciales para cerveza.

Beer spoilage bacteria		
	Rod-shaped	Cocci
Gram-positive bacteria	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Pediococcus</i> spp.
	<i>Lb. brevis</i>	<i>P. damnosus</i>
	<i>Lb. brevisimilis</i>	<i>P. dextrinicus</i>
	<i>Lb. buchneri</i>	<i>P. inopinatus</i>
	<i>Lb. casei</i>	
	<i>Lb. coryneformis</i>	<i>Micrococcus</i> sp.
	<i>Lb. curvatus</i>	<i>M. kristinae</i>
	<i>Lb. lindneri</i>	
	<i>Lb. malefermentans</i>	
	<i>Lb. parabuchneri</i>	
	<i>Lb. plantarum</i>	
Gram-negative bacteria	<i>Pectinatus</i> spp.	<i>Megasphaera</i> sp.
	<i>P. cerevisiophilus</i>	<i>M. cerevisiae</i>
	<i>P. frisingensis</i>	
	<i>P. sp. DSM20764</i>	
	<i>Selenomonas</i> sp.	<i>Zymomonas</i> sp.
	<i>S. lacticifex</i>	<i>Z. mobilis</i>
	<i>Zymophilus</i> sp.	
	<i>Z. raffinivorans</i>	

- Procesos posteriores a la elaboración de la cerveza: refrigeración, pasteurización, filtración y conservantes químicos.
- AMP: Al margen de los anteriores procesos mencionados, existe un modo alternativo que se debe de tener en cuenta a la hora de combatir a los microorganismos patógenos que estropean la cerveza, y son los llamados péptidos antimicrobianos (AMP). Estos compuestos son pequeñas proteínas (<50 aminoácidos aprox.), generalmente conformadas por moléculas hidrófobas cargadas positivamente, que exhiben actividad antimicrobiana contra una amplia gama de microorganismos. Estos péptidos antimicrobianos son producidos por una amplia variedad de microorganismos y macroorganismos como: bacterias, hongos, plantas y animales.

En eucariotas superiores, los AMP forman parte de la respuesta inmune innata, actuando como una primera línea de defensa contra cualquier bacteria invasora. En tales casos, las células entran en contacto con la bacteria, como puede ser en la piel, la cavidad bucal o la vía digestiva, dando lugar posteriormente a su producción (7).

Los AMP eucariotas tienen un amplio rango de susceptibilidad, siendo efectivos contra muchas bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, ciertos virus y hongos.

Han sido identificados poco más de 2000 péptidos únicos con actividad antimicrobiana, conservados evolutivamente, con la capacidad de producir agentes antimicrobianos por las células humanas, siendo denominados defensinas.

Las defensinas difieren en sus especificidades antimicrobianas, mostrando una amplia actividad antimicrobiana contra bacterias, algunos virus y hongos, por lo que es necesario una clasificación para poder ser distinguidas. Para ella se agrupan en tres clases (a, b y h) en función de sus propiedades; como puede ser el peso molecular (12).

Defensinas

- Se comportan como antibióticos naturales de amplio espectro
- Atacan la estructura o función de la de muchas bacterias y hongos
- Tienen actividades pro inflamatorias

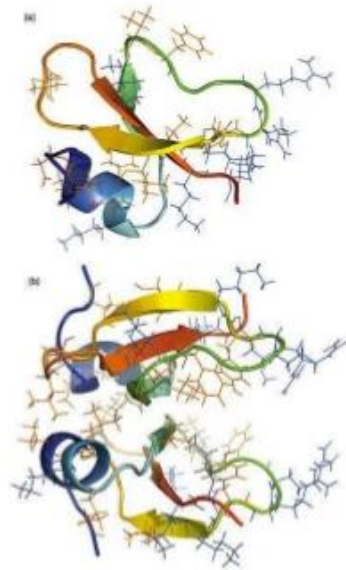


Figura 16. Características de las defensinas.

<https://es.slideshare.net/Xideral/curso-de-microbiologa-08-inmunologia-antimicrobiana>

El modo de acción de la defensinas, y en conjunto, de los AMP contra las bacterias es explicado en base a la mayoría de los modelos que indican la adsorción de los AMP en la superficie de la célula bacteriana a través de interacciones electrostáticas con fosfolípidos ácidos, haciendo que posteriormente se integren en la bicapa de fosfolípidos, lo que conduce a un adelgazamiento de la membrana delimitado su ruptura debido a la formación de poros transmembrana, llevando de este modo a la muerte o lisis celular.

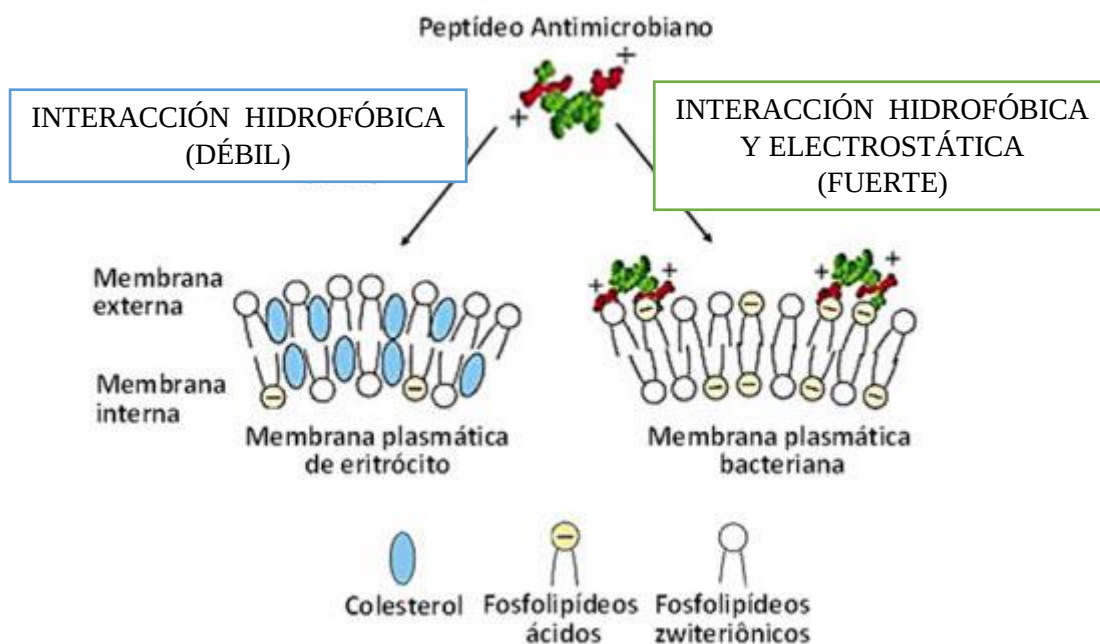


Figura 17. Esquema de actuación de AMP.

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422013000700017

Los AMP bacterianos son denominados bacteriocinas, sustancias activas contra otras bacterias, a menudo estrechamente relacionadas, ofreciendo una ventaja competitiva de crecimiento con un amplio potencial como conservadores para inhibir el crecimiento de otros microorganismos; reconociendo su uso para controlar las contaminaciones bacterianas en entornos industriales, y con gran importancia como sustituto de conservadores sintéticos en alimentos (7).

Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos heterogéneos, sintetizados por algunas bacterias que presentan un amplio potencial como conservantes para inhibir el crecimiento de otros microorganismos, con diferentes niveles y espectros de actividad, mecanismos de acción, peso molecular y propiedades fisicoquímicas. En la actualidad, las bacteriocinas son utilizadas en una amplia categoría de alimentos incluyendo desde cárnicos, vegetales, productos marinos hasta bebidas como cerveza y vino. Esto es debido fundamentalmente a sus características y modo de acción, que en la industria alimentaria hacen atractivo su uso en los alimentos como sustituto de los conservantes sintéticos en alimentos (14).

Estos agentes antimicrobianos naturales son una opción atractiva como conservantes naturales para el desarrollo de alimentos mínimamente procesados, con un alto potencial en su biopreservación, de manera que pueden ser la respuesta para cumplir el objetivo de disminuir los aditivos sintéticos para conservar alimentos, peligrosos para la salud. Presentan un amplio espectro de efectividad contra microorganismos, activas a bajas concentraciones (<10ppm) y sobre todo concretamente frente bacterias alterantes de alimentos, como es el problema presentado con *Pectinatus* ya que presentan características idóneas para tratar el problema (13):

- Son inocuos por lo que están presentes en todos los pasos de la elaboración del producto, desde etapa iniciales hasta finales, como es el embotellamiento.
- Cumplen parámetros de calidad y seguridad

En la industria alimentaria se ha desarrollado la aplicación de bacteriocinas, producto sintetizado por bacterias gram-positivas y gram-negativas, aunque sin embargo las producidas del metabolismo secundario de algunas bacterias del ácido láctico (BAL) han sido de gran interés por la industria alimentaria en la conservación de los alimentos debido principalmente a razones como su facilidad para encontrarlas comercializadas, son consideradas seguras para su consumo, no son tóxicas para las células eucariotas y presentan un espectro de inhibición más amplio en comparación con los espectros de las bacteriocinas sintetizadas por bacterias gram-negativas (12).

Las bacteriocinas se definen como péptidos de origen proteínico, que a bajas concentraciones presentan inhibición microbiológica efectiva, por lo que pueden ser utilizadas como conservadores biológicos puros, que en un momento dado podrían reemplazar a los conservadores sintéticos (12).

Su producción ocurre de forma natural durante la fase logarítmica del desarrollo bacteriano, destacando como característica principal ser estables en presencia de calor y a pH ácidos, presentando estabilidad a pH ácido o neutro, y son fácilmente destruidas a pH mayor a 10, encontrando ambas propiedades estrechamente relacionadas, debido a que un incremento de pH reduce la estabilidad al calor (12).

La alta termorresistencia en las bacteriocinas con peso molecular menor a 5 kDa, les permite mantener su actividad después de tratamientos térmicos equivalentes a la pasteurización, pero son parcialmente destruidas por arriba de los 100 °C.

Las bacteriocinas son inactivadas por proteasas, incluyendo las de origen pancreático y gástrico, por lo que su paso por el tracto gastrointestinal son inactivadas sin ser absorbidas, resultando así inocuas para el consumidor (12).

Las bacteriocinas deben cumplir con importantes criterios de regulación para su aplicación en alimentos:

- La cepa productora debe estar dentro de la clasificación GRAS, es decir, no estar asociada con proveer algún riesgo a la salud.
- Deben ser reconocidas y aceptadas para su uso en alimentos por una autoridad reguladora.
- Deben cumplir con un espectro de inhibición que puede incluir microorganismos patógenos o tener actividad contra uno en particular.
- Su adición en los productos debe de presentar efectos benéficos, tales como mejorar la seguridad, calidad y/o sabor.
- Alta actividad antimicrobiana a bajas concentraciones.

Se ha demostrado que la actividad bactericida se dirige principalmente contra bacterias gram-positivas, pero sin embargo existen numerosas bacteriocinas que presentan un amplio rango de acción. La alta actividad antimicrobiana se relaciona principalmente con el contenido de cistina, determinando a su vez el modo de acción (12):

- Espectro inhibitorio estrecho: sus productos inhiben microorganismos de la misma especie.
- Espectro inhibitorio intermedio: sus productos inhiben otros géneros y patógenos presentes en alimentos.
- Espectro inhibitorio amplio: actúan contra un gran número de bacterias gram-positivas.

La mayoría de las bacteriocinas son efectivas contra microorganismos patógenos importantes involucrados en enfermedades transmitidas por alimentos como: *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, aunque solamente una bacteriocina ha sido aprobada legalmente para su uso en alimentos por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA en inglés) en la categoría reconocida como seguras: la nisina (7).

En el caso concreto de la cerveza, se han desarrollado estudios sobre el efecto de esta bacteriocina que tiene un efecto en el desarrollo de la cerveza.

Dicha bacteriocina aumentó la estabilidad microbiana cuando se agrega a la cerveza no pasteurizada; sin embargo, ejerce un efecto nocivo sobre la viabilidad de la levadura de cerveza. La adición de nisina a la cerveza ha sido aprobada en Australia y Nueva Zelanda.

La nisina es la bacteriocina comercial más importante y la primera aprobada para su uso en la industria alimentaria. Es producida por *Lactococcus lactis*, y se trata de un péptido pequeño policíclico con un peso molecular de 3.4 kDa, formado por 34 aa. En 1969 fue reconocida por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura y la Organización Mundial de la Salud (FAO y WHO) como un preservativo en los alimentos, y en 1988 se aprobó su uso como aditivo. Su uso es permitido en productos enlatados y quesos fermentados para la inhibición del crecimiento de patógenos y en procesos de pasteurización, estableciendo un límite máximo de 250 ppm en el producto terminado. La nisina ha sido uno de los conservantes más utilizados en la industria alimentaria, además sus características la convierten en un aditivo adaptable a la naturaleza de los alimentos; aplicable en vino y cerveza, inhibiendo la fermentación de la levadura y evitando el deterioro del producto (7).

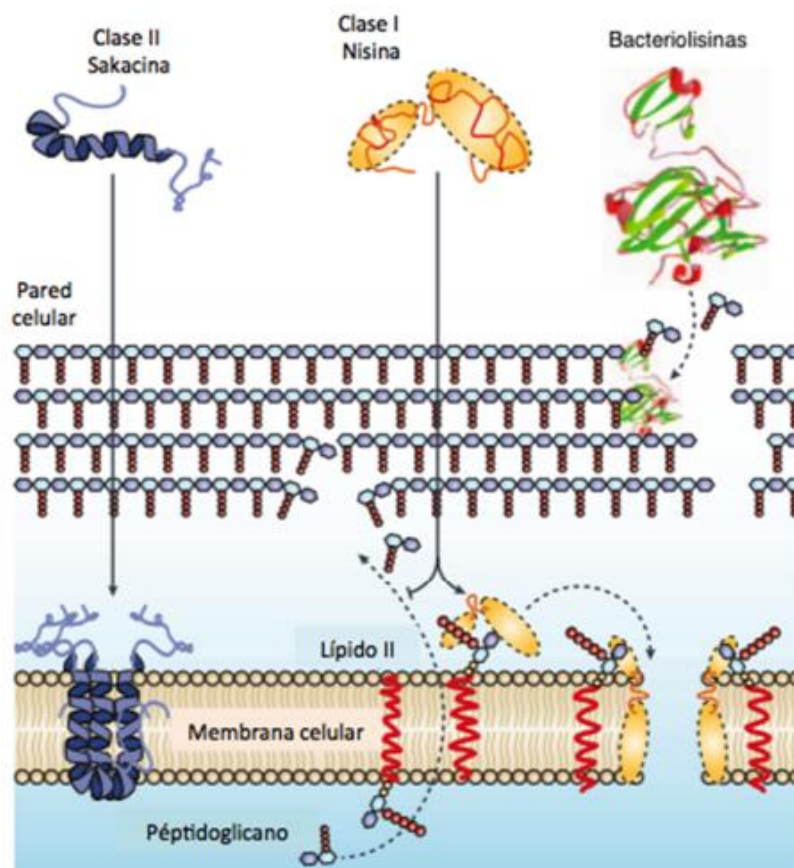


Figura 18. Modo de acción de bacteriocinas.

https://www.researchgate.net/figure/Modo-de-accion-de-las-bacteriocinas-Adaptado-de-Cotter-et-al-2005_fig1_280568781

El modo de acción de esta bacteriocina se basa en la desestabilización de las funciones de la membrana citoplasmática, debido a la formación de poros.

La estructura de los péptidos α -hélice o β -laminar, pueden formar dos caras, una hidrofílica y otra hidrofóbica creando oligómeros que pueden atravesar la membrana formando poros. El lado apolar de la molécula se situará próxima a los lípidos de la membrana y el lado polar al centro del poro. En consecuencia, se observa una pérdida de iones K^+ , ATP, aa y moléculas pequeñas. La pérdida de estas sustancias origina a su vez una pérdida del potencial de la membrana, consumo de reservas energéticas celulares, descenso de la síntesis de ADN, ARN y proteínas, originando la muerte celular (12).

En el caso de la nisina, se ha demostrado un modo de acción dual, de manera que se une a la pared celular mediante atracciones electrostáticas, lo cual se facilita debido a la carga positiva de este péptido y las cargas negativas de los componentes de la pared celular. Posteriormente la nisina se une al lípido II, el transportador principal de las subunidades de peptidoglicano desde el citoplasma a la pared celular, y por lo tanto previene la síntesis correcta de la pared celular, provocando la formación de un poro transmembranal permitiendo la salida de aminoácidos y ATP, lo que conduce a la muerte celular (7).

Tabla 8. Aplicación de la nisina en la industria alimentaria.

Alimento	Concentración	Microorganismo susceptible	Referencia
Cerveza	3 mg/L	<i>Lactobacillus brevis</i> CCT 3745	Franchi <i>et al.</i> , 2012
	>100 mg/L	<i>Acetobacter aceti</i> CCT 2565	
	0.8 mg/L	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ATCC 9649	
	>200 mg/L	<i>Schizosaccharomyces ludwigii</i> <i>Saccharomyces diastaticus</i>	
Leche y huevo líquido	250 mg	<i>L. monocytogenes</i> SCOTT A 724	Jin, 2010
Jugo de manzana y zanahoria	10 UI/ml	<i>Escherichia coli</i> K12	Pathanibul <i>et al.</i> , 2009
		<i>Listeria innocua</i> ATCC 51742	
Jugo de naranja	100 UI/ml	<i>Salmonella</i> Typhimurium	Liang <i>et al.</i> , 2002
Queso cheddar	300 UI/g	<i>Listeria innocua</i>	Benech <i>et al.</i> , 2002
	300 UI/g	<i>Listeria monocytogenes</i> V7	Zottola <i>et al.</i> , 1994
		<i>Staphylococcus aureus</i> 196 E <i>Clostridium sporogenes</i> PA 3679	

Considerando la amplia actividad antimicrobiana de las defensinas, se desarrolló un estudio con la idea de usarlas para llevar a cabo un ensayo determinado. De este modo, se estableció un objetivo en el estudio cuyo fin era examinar el uso de estos péptidos naturales en el control del deterioro bacteriano.

En dicho desarrollo trataron de demostrar que un determinado péptido, HBD3, muestra actividad bactericida contra bacterias comunes que estropean la cerveza in vitro. Para ello se estableció como el mejor modo de desarrollo el uso de una copia sintética de dicho gen.

Cuando se integra una copia sintética del gen, que codifica una forma secretable del péptido HBD3, en el genoma de una levadura industrial, se muestra que HBD3 es secretado por las células, y por lo tanto consecuentemente reduce efectivamente el crecimiento de bacterias sembradas en fermentaciones (7).

En el caso que nos concierne, de mayor interés, debido a la problemática causada por *Pectinatus* en el proceso de embotellamiento de la cerveza, cuando HBD3 es agregado y se encuentra presente en la cerveza embotellada, es un agente bactericida eficaz durante el almacenamiento a largo plazo (7).

4. Discusión

En apartados anteriores se ha valorado la gran importancia que tiene en la sociedad de consumidores un producto como es la cerveza, y en consecuencia se debe tener en cuenta el notable impacto que puede llegar a tener una alteración de dicho producto, por lo que es importante solucionar todos aquellos inconvenientes y riesgos que puedan suponer un problema para los consumidores.

Dichos problemas se concentran, como bien hemos indicado en apartados anteriores en la industria cervecera, por lo que es en este ámbito donde debe trabajar, aportando el mayor número de medidas y prevenciones contra aquellos organismos dañinos que alteran el producto que consumimos, la cerveza. Un organismo puede ser dañino, sin ser deliberadamente introducido, y puede sobrevivir y proliferar de manera desapercibida en la industria, siendo demasiado tarde cuando este es detectado.

Para evitar dichos sucesos, se debe de estudiar minuciosamente estos organismos, y en este caso el organismo que concretamente nos preocupa: *Pectinatus*. Este microorganismo es una bacteria con una morfología y características especiales, ya nombradas anteriormente, las cuales le permiten irrumpir en el ámbito cervecero suponiendo un riesgo potencialmente grave para el desarrollo de la cerveza. Además influyen que favorecen el desarrollo de esta bacteria, como el avance tecnológico en la industria cervecera que pretende reducir al mínimo el acceso de oxígeno, permitiendo este ambiente a *Pectinatus* proliferar como un agente emergente en esta industria. Además de las causas perjudiciales para el consumidor, existen las pérdidas económicas y la imagen perjudicial para la marca que comercializa el producto.

Su proliferación parece fácil de controlar en un principio, ya que es susceptible a diversos desinfectantes, pero tiene una gran problemática debido a unos potentes mecanismos de supervivencia. Esta bacteria sobrevive en lugares de difícil acceso formando biopelículas, dándole esta táctica una amplia ventaja para su resistencia en el entorno.

En general, la mayor concentración de microorganismos se encuentra en el aire del ambiente y alrededor de la maquinaria de llenado, por lo que se transmite fácilmente a la cerveza a través de los aerosoles producidos durante los procesos de llenado y limpieza.

Por la existencia de dichos riesgos existe la necesidad de métodos de detección que sean rápidos y a la vez de fácil accesibilidad para las cervecerías.

Ya existen medios recomendados que están enfocados en el análisis del producto terminado, aunque muchas veces no son métodos fiables o los resultados se obtienen cuando la cerveza ya se encuentra en el mercado; y también existen una gran cantidad de métodos que permiten llevar a cabo una manera preventiva para detectarlo.

En el control microbiológico en cervecería son usados métodos clásicos de cultivos que permitan detectar si existe contaminación microbiana en el entorno cervecero, durante el proceso de elaboración y si han sido capaces de llegar hasta el producto final.

Como alternativa con la que se obtienen buenos resultados en laboratorio es el uso de un medio: medio MRS-T modificado con cicloheximida. Este actúa con adición de azul de metileno como indicador visual de óxido-reducción y con adición de rojo de bromofenol como indicador de variación de pH. Haciendo uso del medio MRS-T modificado y concentrado se podría evaluarse la capacidad de detección de *Pectinatus* en un producto terminado, en este caso en la cerveza, previo a la identificación por PCR.

En su desarrollo *Pectinatus* produce metabolitos ácidos, por lo que baja el pH del medio. Esto se aprovechó con el uso de un agente indicador de pH. De las dos concentraciones de rojo de bromofenol analizadas en el medio, (25 y 75 ppm), la concentración de 25 ppm mostró una mejor variación de color. Esto facilita la lectura al analista, ya que cuando se realiza hisopados de superficie en zonas de envasado, se usa una gran cantidad de tubos por línea de envasado (entre 15-30) y si la cervecería cuenta con varias líneas de envasado, esta cantidad se multiplica. Si únicamente se observara microscópicamente cada uno de los tubos, cada 24 horas, resultaría ser un método impráctico, agotante y demandaría mucho tiempo. Así la utilidad del uso de un indicador de pH por cambio de color resulta muy práctico y ventajoso. Sólo aquellos tubos en los que se tiene duda del cambio de coloración, podrían observarse al microscopio.

Aunque por análisis sensorial (producción de H₂S) los tubos positivos dudosos, podrían ser rápidamente diferenciados de los negativos.

El medio se ajustó a pH=7 y no a pH de 6,5 según el medio original, debido a que su uso a pH=7 tuvo buenos resultados, en un estudio previo de detección de *Pectinatus* en biopelículas.

Por otro lado existe el objetivo de establecer una estrategia para combatir a este microorganismo, tarea difícil ya que esta bacteria es capaz de tolerar ciertas condiciones presentes en ambientes de cervecería. Las diversas opciones que se han planteado en el apartado anterior referente a cómo combatir *Pectinatus* llevan a la decisión final de establecer uno de los métodos como el de mayor posible eficacia: el uso de unas sustancias denominadas bacteriocinas.

Las bacteriocinas actúan sustancias activas contra bacterias que inhiben el crecimiento de microorganismos y pueden controlar las contaminaciones, presentando por tanto un alto potencial como conservantes biológicos naturales, como se ha demostrado en el caso del uso de defensinas como la nisina, y el péptido HBD3, que expresa actividad bactericida.

5. Conclusiones

A medida que las tecnologías de llenado en las fábricas de cerveza avanzan a nivel mundial, existe la necesidad de métodos de detección e identificación más rápidos, para evitar incidentes de deterioro por bacterias.

1.- La puesta en práctica de métodos que permiten realizar el análisis de biopelículas obtenidas en cervecerías, permite dar una visión de la practicidad, poder de identificación, recuperación y sobre todo permite detectar los focos de contaminación de esta bacteria, permitiendo tomar medidas que aseguren la calidad del producto.

2.- Con los resultados se podría establecer la relación de factores (tipo de pasteurización, tamaño de cervecería, capacidad/velocidad de línea, etc.) en su incidencia, y permitiría recopilar datos sobre la ocurrencia y distribución de las especies de esta bacteria en diferentes fábricas de cerveza.

3.- Los sitios de muestreo deben cubrir las áreas críticas como son la zona de llenado o la zona de entrada de botellas vacías a la llenadora. Con los resultados se podría establecer la relación de factores para su persistencia, lo que permitiría recopilar datos

sobre la incidencia y distribución de las especies de esta bacteria en diferentes fábricas de cerveza.

4.- El método más fácil, económico y eficaz que permitiría detectar el microorganismo perjudicial en el producto, sería establecer un sistema de trazabilidad y control de la calidad que asegure que se dará el menor riesgo posible de presencia de bacterias en el ambiente, evitando que prolifere en este. Además, se puede contar con medio como es el medio MRS-T modificado y concentrado, y se puede evaluar la capacidad de detección de *Pectinatus* en producto terminado, por incorporación a la cerveza, haciendo uso de este medio. De este modo se podría establecer el método adecuado, que sea eficaz y rápido para detectar a *Pectinatus* a tiempo, evitando que el producto final llegue al mercado en mal estado.

5.- Sería de gran interés investigar sustancias del tipo bacteriocinas como alternativa para combatir las bacterias invasoras perjudiciales en cerveza, una vez que dicho producto se encuentra en etapas avanzadas o finales de su elaboración. Esta nueva técnica evitaría el despilfarro del producto final y evitaría notables pérdidas económicas que puede llegar a producir el mal estado del producto final.

6. Referencias bibliográficas

- 1) Helander, I. M., Haikara, A., Sadovskaya, I., Vinogradov, E., & Salkinoja-Salonen, M. S. (2004). Lipopolysaccharides of Anaerobic Beer Spoilage Bacteria of the Genus *Pectinatus*—Lipopolysaccharides of a Gram-positive Genus. *FEMS Microbiology Reviews*, 28(5), 543-552.
- 2) Sakamoto, K., & Konings, W. N. (2003). Beer Spoilage Bacteria and Hop Resistance. *International Journal of Food Microbiology*, 89(2-3), 105-124.
- 3) Jespersen, L., & Jakobsen, M. (1996). Specific Spoilage Organisms in Breweries and Laboratory Media for Their Detection. *International Journal of Food Microbiology*, 33(1), 139-155.
- 4) García, J. H. G. (2012). Detección Molecular de *Lactobacillus spp.*, *Pediococcus spp.*, *Pectinatus spp.* y *Megasphaera spp.* En el Proceso de Elaboración de la Cerveza – (Doctoral Dissertation) Universidad Autónoma de León.
- 5) Ashtavinayak, P., & Elizabeth, H. A. (2016). Gram Negative Bacteria in Brewing. *Advances in Microbiology*, 6(03), 195.
- 6) Haikara, A. (1983). Immunological characterization of *Pectinatus cerevisiophilus* Strains. *Applied Environment Microbiology*., 46(5), 1054-1058.
- 7) James, T. C., Gallagher, L., Titze, J., Bourke, P., Kavanagh, J., Arendt, E., & Bond, U. (2014). In situ production of human β defensin- 3 in lager yeasts provides bactericidal activity against beer- spoiling bacteria under fermentation conditions. *Journal of Applied Microbiology*, 116(2), 368-379.
- 8) Suárez Díaz, M. (2013). “Cerveza: componentes y propiedades” (Julio 2013) Universidad de Oviedo, España.- Máster en Biotecnología Alimentaria.
- 9) Iijima, K., Asano, S., Suzuki, K., Ogata, T., & Kitagawa, Y. (2008). Modified multiplex PCR methods for comprehensive detection of *Pectinatus* and beer-spoilage cocci. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 72(10), 2764-2766.
- 10) Caldwell, J. M., Juvonen, R., Brown, J., & Breidt, F. (2013). *Pectinatus sottacetoni* sp. nov., isolated from a commercial pickle spoilage tank. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(10), 3609-3616.

- 11) Felsberg, J., Jelínková, M., Kubizniaková, P., & Matoulková, D. (2014). Development of a species- specific PCR assay for identification of the strictly anaerobic bacterium *S. lactificex* found in biofilm- covered surfaces in brewery bottling halls. *Journal of Applied Microbiology*, 117(5), 1328-1335.
- 12) Beristain-Bauza, S. C., Palou, E., & López-Malo, A. (2012). Bacteriocinas: Antimicrobianos Naturales y su Aplicación en los Alimentos. *Rev. Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 6(2), 64-78.
- 13) Saavedra, M. R. (2016) “Revisión del género *Pectinatus* spp. en cervecería y propuesta de un medio de detección en superficies. (Junio 2016) Universitat Rovira I Virgili, Tarragona – Máster en Bebidas Fermentadas.
- 14) Schleifer, K. H., Leuteritz, M., Weiss, N., Lüdwig, W., Kirchhof, G., & Seidel-Rüfer, H. E. L. G. A. (1990). “Taxonomic study of anaerobic, gram-negative, rod-shaped bacteria from breweries: emended description of *Pectinatus cerevisiiphilus* and description of *Pectinatus frisingensis* sp. nov., *Selenomonas lactificex* sp. nov., *Zymophilus raffinovorans* gen. nov., sp. nov., and *Zymophilus paucivorans* sp. nov.” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 40(1), 19-27.
- 15) Haikara, A., & Helander, I. (2006). *Pectinatus, Megasphaera and Zymophilus*. In, Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E, editors. *The Prokaryotes, a Handbook on the Biology of Bacteria. The Prokaryotes: Volume 4: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria*, 965-981.
- 16) Satokari, R., Juvonen, R., von Wright, A., & Haikara, A. (1997). Detection of *Pectinatus* Beer Spoilage Bacteria by Using the Polymerase Chain Reaction. *Journal of Food Protection*, 60(12), 1571-1573.

Imágenes

<https://www.alimentatubienestar.es/beneficios-de-la-cerveza-para-la-salud/>

<https://www.aulafacil.com/cursos/administracion/gestion-de-la-calidad/proceso-de-realizar-el-aseguramiento-de-calidad-l35571>

<https://es.slideshare.net/Xideral/curso-de-microbiologa-08-inmunologa-antimicrobiana>

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422013000700017

https://www.researchgate.net/figure/FIGURA-1-Estructura-del-LPS-Fuente-Construida-por-los-autores-con-base-en-la-hallada-en_fig1_319972076

https://www.researchgate.net/figure/Modo-de-accion-de-las-bacteriocinas-Adaptado-de-Cotter-et-al-2005_fig1_280568781

http://renati.sunedu.gob.pe/bitstream/sunedu/129405/3/Rodriguez_Saavedra_Magaly_M_URV.pdf

<https://es.dreamstime.com/stock-de-ilustraci%C3%B3n-colecci%C3%B3n-de-los-componentes-de-la-cerveza-image48105168>