

Desarrollo de una herramienta para la calificación de la susceptibilidad a la contaminación microbiana en cervezas artesanales

Karla Estefanía Pérez Revelo

Máster en Nuevos Alimentos



MÁSTERES
DE LA UAM
2018 - 2019

Facultad de Ciencias

Máster en

Nuevos Alimentos

**Desarrollo de una herramienta para la
calificación de la susceptibilidad a la
contaminación microbiana en
cervezas artesanales**

Karla Estefanía Pérez Revelo

Director: Dolores González de Llano / Magaly Rodríguez Saavedra

Tutor académico: Susana Santoyo Díez

Lugar de realización: Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL) / Dpto. Biotecnología y Microbiología de Alimentos

AGRADECIMIENTOS

Al culminar el presente trabajo, en primer lugar, me gustaría agradecer a Dios por haberme permitido cumplir este sueño y por cada una de las bendiciones que puso en mi camino.

Cumplir esta meta no hubiese sido posible, sin el apoyo de mis padres. A pesar de la distancia los sentí más cerca que nunca, sin duda fueron el mejor impulso para no rendirme y superarme día a día.

Es importante agradecer a las Dras. Victoria Moreno Arribas y Dolores González de Llano, por permitirme formar parte de su equipo de investigación y por cada uno de los consejos que me permitieron culminar con éxito el presente trabajo. A la Mg. Sc Magaly Rodríguez por su guía y apoyo, ya que con su pasión por la investigación de la cerveza me ayudó a cumplir los objetivos de este trabajo de investigación.

De igual manera al Instituto en Ciencias de la Alimentación CIAL (CSIC-UAM), por todas las facilidades brindadas para realizar esta investigación. En especial al grupo de Biotecnología Enológica Aplicada (BEA), del que he sido parte, gracias por su ayuda y buen ambiente para trabajar.

Un agradecimiento especial a Mishell, Evelyn y a toda mi familia por su apoyo incondicional y demostrarme que el amor de la familia perdura a pesar de la distancia. De igual forma no puedo dejar de agradecer a mis amigos Jonathan, Juanito, Katherine, Kevin, Paty, Sebastián, Tannya y Xavier que siempre se hicieron presentes, aunque estemos a un océano de distancia.

La realización del Máster en Nuevos Alimentos y el presente Trabajo de Fin de Máster ha sido posible gracias al programa de becas “Convocatoria Abierta 2017” financiado por la Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT) de Ecuador. Gracias por creer en los jóvenes investigadores.

ÍNDICE

	PÁGINA
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Cerveza artesanal	1
1.2. Estilos cerveceros	2
1.3. Factores que provocan deterioro en las cervezas artesanales	4
1.3.1. Factores intrínsecos	4
1.3.2. Factores extrínsecos	8
1.4. Microorganismos causantes de deterioro en cerveza	9
1.4.1. Bacterias	9
1.4.1.1. Bacterias Gram positivas	9
1.4.1.2. Bacterias Gram negativas	11
1.4.2. Levaduras salvajes	11
1.4.3. Hongos	12
2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	13
3. MATERIALES Y MÉTODOS	15
3.1. Acondicionamiento de los microorganismos al crecimiento en cerveza y determinación de su fase estacionaria temprana	15
3.1.1. Bacterias ácido-lácticas y levaduras	15
3.1.2. Acondicionamiento de los microorganismos al crecimiento en cerveza	15
3.1.3. Fase estacionaria temprana de las curvas de crecimiento	16
3.2. Evaluación de las características fisicoquímicas y microbiológicas de cervezas artesanales de diferentes estilos	17
3.2.1. Selección de cervezas	17
3.2.2. Caracterización fisicoquímica	17
3.2.3. Análisis microbiológicos	18
3.2.4. Análisis estadístico	19
3.3. Evaluación de la influencia de los parámetros intrínsecos de cerveza artesanal	

en el crecimiento de microorganismos causantes de su deterioro a través de un modelo logístico binomial	20
3.3.1. Preparación de sustratos a base de cerveza con diferentes valores de los parámetros fisicoquímicos	20
3.3.2. Inoculación y análisis del crecimiento de los microorganismos	21
3.3.3. Análisis estadístico	22
3.3.4. Validación de los modelos probabilísticos que determinan la susceptibilidad de crecimiento de microorganismos en cervezas artesanales	23
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
4.1. Acondicionamiento de los microorganismos al crecimiento en cerveza y determinación de su fase estacionaria temprana	24
4.1.1. Selección y acondicionamiento de microorganismos	24
4.1.2. Determinación del tiempo de incubación necesario para que las BAL alcancen su fase estacionaria temprana	25
4.1.3. Determinación de tiempo de incubación necesario para que <i>Dekkera bruxellensis</i> alcance su fase estacionaria temprana	28
4.2. Evaluación de las características fisicoquímicas y microbiológicas de cervezas artesanales de diferentes estilos	29
4.2.1. Caracterización fisicoquímica	29
4.2.2. Análisis microbiológicos	34
4.3. Evaluación de la influencia de los parámetros intrínsecos de cerveza artesanal en el crecimiento de microorganismos causantes de su deterioro a través de un modelo logístico binomial	36
4.3.1. Casos de supervivencia en sustratos a base de cerveza con diferentes valores de los parámetros fisicoquímicos	36
4.3.2. Casos de supervivencia en cervezas artesanales comerciales	37
4.3.3. Estado de multicolinealidad entre variables independientes	38
4.3.4. Estimación del modelo logístico binario	39
4.3.5. Validación de los modelos probabilísticos que determinan la susceptibilidad de crecimiento de microorganismos en cervezas artesanales	43
5. CONCLUSIONES	46
6. BIBLIOGRAFÍA	47

RESUMEN

La cerveza se considera una bebida estable microbiológicamente debido a la presencia de etanol y ácidos procedentes del lúpulo, a los bajos valores de pH, a un alto contenido de dióxido de carbono y reducido de oxígeno, sin embargo, existen microorganismos resistentes a estas condiciones adversas que pueden producir turbidez y sabores y olores desagradables que deterioran la calidad del producto final.

En este proyecto se desarrolló una herramienta para predecir la susceptibilidad a la contaminación microbiana de la cerveza artesanal a partir de sus parámetros físico-químicos. Para ello, se seleccionaron ocho cepas de bacterias ácido-lácticas (BAL): *Lactobacillus brevis* (CIAL-BL1; CIAL-BD1; CECT 216) *L. plantarum*, *L. paracasei*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *L. citreum*, *Pediococcus pentosaceus* y una cepa de levadura *Dekkera bruxellensis*, que se adaptaron de forma secuencial en medios líquidos similares a la cerveza y se determinó su fase estacionaria temprana de crecimiento para inocularlos en dos tipos de sustratos para diseñar tres modelos de regresión logística binaria.

El primer modelo predictivo se realizó inoculando sustratos a base de cerveza en los cuales se modificó en diferentes niveles el pH, amargor, alcohol y porcentaje de extracto fermentable por levaduras, para abarcar los rangos establecidos previamente en la evaluación físico-química y microbiológica de 2 cervezas artesanales de 10 estilos diferentes. En el segundo modelo se emplearon los datos de 17 cervezas comerciales inoculadas artificialmente con los 9 microorganismos y en el tercer modelo se combinaron los resultados de los dos casos.

Tras la validación de los tres modelos estadísticos en 10 cervezas comerciales se seleccionó el tercer modelo cuya función logística es: $P(y) = \frac{1}{1+e^{-y}}$; $Y = -9,608 - 0,346 \% ABV - 0,042 BU + 3,161 pH$, que presentaba una sensibilidad del 87 % y una especificidad del 71 % para predecir la susceptibilidad a la contaminación de cervezas.

ABSTRACT

Beer is a microbiologically stable drink due to the presence of ethanol, hop acids, low pH values, high carbon dioxide and reduced oxygen contents, dioxide contents. However, there are some resistant microorganisms to these adverse conditions that can produce turbidity, flavors and unpleasant odors impairing the quality of the final product.

In this project a rating tool to predict beer susceptibility to microbial contamination from its physico-chemical parameters was developed. For this, eight strains of acid-lactic bacteria (BAL): *Lactobacillus brevis* (CIAL-BL1; CIAL-BD1; CECT 216) *L. plantarum* (CIAL-BF1), *L. paracasei* (CIAL-B6), *Leuconostoc pseudomesenteroides* (CIAL-B2), *L. citreum* (CIAL-B1), *Pediococcus pentosaceus* (CIAL-BF2) and a yeast strain *Dekkera bruxellensis* (CIAL-H2) were selected. They were adapted sequentially into liquid media similar to beer, their early stationary growth phase was determined to inoculate them into two substrates types to design three binary logistic regression models.

The first predictive model was made with beer-based substrates in which one of its physicochemical parameters, pH, bitterness, alcohol and percentage of fermentable extract by yeasts, were modified at different levels: to cover the established ranges in the previous physico-chemical and microbial evaluation of 20 commercial craft beers (2 for each style: Strong Ale, Brown Ale, Pale Ale, Amber Ale, Bock, Wheat Beer, Indian Pale Ale, Porter, Alcohol-Free and Stout). In the second model, data of 17 commercial beers inoculated artificially with above microorganisms were used, and the third model combined both results.

After predictive models validation in ten artisan beers, the third model which logistic function is: $P(y) = \frac{1}{1+e^{-y}}$; $Y = -9,608 - 0,346 \% ABV - 0,042 BU + 3,161 pH$ was selected as it allows to determine the beer susceptibility to contamination, with a sensitivity of 87% and a specificity of 71%.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. CERVEZA ARTESANAL

El Real Decreto 678/2016, de 16 de diciembre (BOE 17 de diciembre de 2016), por el que se aprueba la norma de calidad de cerveza y de las bebidas de malta, define como cerveza al alimento resultante de la fermentación, mediante levaduras seleccionadas, de un mosto cervecero elaborado a partir de materias primas naturales. La cerveza artesanal se diferencia de otras bebidas de malta por su fabricación ya que se realiza una segunda fermentación en botella, para así producir una gasificación extra, no contempla filtrado ni pasteurización por lo que no se destruyen levaduras y proteínas de la cerveza, además se garantiza la conservación de los aromas y sabores de los ingredientes originales.

La Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición, (AESAN) no establece criterios microbiológicos para los microorganismos, ni tampoco las normas que deberían cumplir los productores de cerveza. Por esta razón cada cervecería artesanal se rige por sus propios estándares, lo que hace que este producto, probablemente por tratarse de un sector relativamente joven, esté amparado por una normativa más laxa en comparación con otras bebidas fermentadas (por ej. vino), sometido a una de las reglamentaciones más estrictas dentro de los productos agroalimentarios.

La producción de cerveza artesanal en España, de acuerdo con Garavaglia y Castro (2018), se originó por tres factores principales: en primer lugar por la globalización que a través de la integración económica y movimientos migratorios hacia Alemania, Reino Unido, Francia e Italia, acompañados del turismo impulsaron el desarrollo e innovación del sector cervecero. Por otro lado, la idea prevalente de la *caña* en los consumidores permitió y facilitó abrir este segmento de mercado; y por último la difusión de la cultura cervecera y el interés de los consumidores acerca de este nuevo nicho de mercado cumplieron un papel importante en el nacimiento y la difusión de las cervezas artesanales.

El sector de la elaboración de cerveza en España ostenta una posición destacada tanto en el ámbito europeo como mundial (cuarto y undécimo puesto, respectivamente). En el año 2018 su producción de cerveza artesanal se incrementó en un 33 % respecto al año 2017, y alcanzó un volumen de producción de aproximadamente 240 000 hL (Informa D&B, 2019). De igual manera, las empresas registradas en comparación al año 2016 aumentaron en un 15 %, hasta alcanzar en el año 2018 unas 522 cervecerías artesanales inscritas (Informa D&B, 2019;

Cerveceros de España, 2019). Los principales centros de producción están ubicados en Cataluña, Andalucía y Castilla de León, con 111, 85 y 10 cervecerías, respectivamente; y en menor proporción en Galicia, Valencia, Castilla-La Mancha, Madrid, Aragón, País Vasco, Islas Baleares, Murcia, Cantabria, Extremadura, Asturias, Navarra, Islas Canarias y La Rioja (Garavaglia y Castro, 2018).

La situación del sector cervecero está cambiando continuamente incluso ha despertado el interés de empresas multinacionales que, para posicionarse en este tipo de mercado, en la actualidad, han adquirido microempresas de producción artesanal. Por lo cual, para cumplir con estándares de calidad en un mercado tan competitivo, los pequeños y medianos productores también deben efectuar un manejo apropiado del sistema de seguridad alimentaria con el fin de conservar la inocuidad y evitar el deterioro o pérdida de estabilidad física y sensorial del producto, que en la mayoría de los casos están ligados a la presencia de microorganismos indeseables en las zonas de producción.

Una herramienta útil para determinar la capacidad de un alimento para facilitar el crecimiento y desarrollo de microorganismos causantes de su deterioro o descomposición, son las pruebas de desafío microbiológico (Busta y col. , 2003), su aplicación y uso en cervecerías artesanales permitiría tomar las precauciones adecuadas en aquellos estilos que presentan factores intrínsecos que aumentarían la probabilidad de contaminación.

1.2. ESTILOS CERVECEROS

En las cervecerías la categorización básica de sus productos se realiza fundamentalmente en base al tipo de fermentación a la que es sometida la cerveza: alta (estilo ale) y baja (estilo lager). Las cervezas tipo ale se elaboran a una temperatura de fermentación en un rango de 15 – 24 °C con levadura de fermentación superior hidrofóbica, principalmente cepas de la especie *Saccharomyces cerevisiae*. Además, presentan cualidades organolépticas de sabor y aroma frutales que están relacionadas con la presencia de ésteres y productos secundarios (Li y col. , 2017).

Por otro lado, las cervezas lager que dominan el mercado de la cerveza, a diferencia de la cerveza Ale, se caracterizan por temperaturas de fermentación y almacenamiento inferiores (0 - 4 °C) y la levadura que emplean es un híbrido de *Saccharomyces* sp., que se hunde en el fondo de la cerveza para su fermentación. Debido a estas diferencias la cerveza lager se caracteriza, entre otras propiedades, por el olor a malta y la carencia de olores frutales (Li y col. , 2017).

En la actualidad, hay distintas formas de tipificar la cerveza en función de otros factores: características de la materia prima, procesos de producción, entre otros. Por este motivo, se han generado los estilos cerveceros como pautas para que se elaboren cervezas originales y con características específicas. Existen dos organizaciones dedicadas a definir estilos de cervezas artesanales tradicionales: el Programa de Certificación de Juez de Cerveza (BJCP) que además de cumplir con esa función, también organiza competiciones de elaboración de cerveza; y Brewers Association, que aprueba y define estilos para el ‘Great American Beer Festival’ (GABF). De acuerdo con el Programa de (BJCP) (2015), los estilos de cervezas se pueden clasificar según su intensidad, color, tipo de fermentación, familia, época y región de origen, como se observa en la Figura 1.

INTENSIDAD	COLOR	FERMENTACIÓN
Baja <4% ABV Estándar 4-6% ABV Alta 6-9% ABV Muy alta >9% ABV	Pálido Amarillo pajizo a dorado Ámbar Ámbar a marrón-cobrizo Oscuro Marrón oscuro a negro	Alta Baja Salvaje Envejecida Refrigerada
ORIGEN	ÉPOCA	AROMA/SABOR
Islas británicas Europa occidental Europa central América del norte Pacífico	Artesanal Tradicional Histórico	Madera Frutal Maltosa Balanceada Lúpulo Tostada Ahumada Especies Agria Amarga Dulce
FAMILIA		
IPA Brown ale Pale ale Pale lager	Pilsner Amber ale Amber lager Dark lager	Porter Stout Bock Strong ale Wheat beer Specialty beer

Figura 1. Categorías de clasificación de estilos de cervezas

Fuente: BJCP (2015)

En la Tabla 1, se detallan las características físico-químicas de los estilos clasificados por familia según la BJCP (2015).

Tabla 1. Valores del amargor, alcohol y densidad final de estilos de cerveza según la familia

Estilos	Amargor (BU)		Alcohol (%ABV)		Densidad final	
	Min	Máx	Min	Máx	Min	Máx
Pale lager	8	35	2,4	6,3	1,004	1,015
Pilsner	22	45	4,2	6	1,008	1,017
Amber lager	8	45	4,4	6,3	1,008	1,017
Dark lager	8	34	4,2	6	1,008	1,017
Bock	16	35	6,3	14	1,011	1,035
Pale ale	8	50	3,8	7,5	1,002	1,018
IPA	40	120	5	10	1,008	1,018
Amber ale	10	50	2,5	8,5	1,007	1,018
Brown ale	10	40	2,8	6,2	1,008	1,015
Porter	18	50	4	9,5	1,008	1,024
Stout	20	90	4	12	1,007	1,03
Strong ale	17	100	5,5	12	1,005	1,04
Wheat beer	0	35	2,5	11	1	1,022

Fuente: BJCP, 2015

1.3. FACTORES QUE PROVOCAN DETERIORO EN LAS CERVEZAS ARTESANALES

La cerveza es una bebida alcohólica que se obtiene mediante la fermentación del mosto de cebada y malta por levadura y se diferencia de otras bebidas de este estilo porque no se realizan procesos de concentración ni destilación. La cerveza es considerada una bebida estable microbiológicamente debido a sus características físico-químicas, sin embargo, existen microorganismos resistentes a las condiciones hostiles presentadas por este producto que ocasionan la alteración de las propiedades intrínsecas. Para un mejor análisis de los diversos factores cuya alteración pueden contribuir al deterioro de la cerveza, se han agrupado en factores intrínsecos y extrínsecos (Hughes, 2018).

1.3.1. Factores intrínsecos

Los factores intrínsecos están ligados a la composición de la cerveza, que se ve influenciada por la materia prima y los procesos de elaboración como: cocción, fermentación o maduración. Entre los principales cabe destacar el pH, contenido de alcohol, amargor, color, extracto aparente, gases disueltos, y la presencia de otros componentes como proteínas, compuestos fenólicos y biopolímeros (Baxter y Hughes, 2001).

- **pH**

El pH es una medida de la actividad de los protones en sistemas acuosos, que se obtiene a través de la relación de la concentración relativa de ácidos débiles no disociados en equilibrio con sus bases conjugadas. Por lo tanto, el valor del pH de la cerveza se verá influenciado por el contenido en ácidos orgánicos débiles presentes en la materia prima que se utiliza para su elaboración. Por ejemplo, aminoácidos, péptidos, fosfatos de sodio o potasio derivados de la malta o el ácido carbónico presente en el agua de elaboración; sin embargo, los componentes del lúpulo no otorgan diferencias significativas en el valor de pH (Lewis y Bamforth, 2006).

Los valores característicos de pH de la cerveza se encuentran en un rango de 3,8 - 4,8 y en cervezas de estilo Lambic pueden ser cercanos a 3. Pero cuando son relativamente altos pueden ocasionar la pérdida de estabilidad microbiológica, ya que el sustrato presentaría una de las condiciones apropiadas para el desarrollo de microorganismos. Además, este parámetro intrínseco tiene influencia sobre la estabilidad de la espuma y se ha descrito que existe una relación inversamente proporcional entre los valores de pH y la estabilidad de la espuma, es decir, cuanto mayor es el pH menor será la estabilidad de la misma (Baxter y Hughes, 2001).

- **Alcohol**

La medida estándar de alcohol en cerveza o ABV (alcohol por volumen) corresponde al contenido de alcohol etílico, expresado en porcentaje, y este valor puede variar en un rango amplio entre 0,5 – 12 % en una cerveza estándar. Este parámetro puede influir en la estabilidad de la cerveza de diversas maneras, por ejemplo: cuando el contenido de alcohol es bajo o en cervezas sin alcohol aumenta la susceptibilidad del producto a contaminaciones microbianas.

Así mismo un alto contenido en alcohol puede influir en la estabilidad de la espuma ya que la presencia de etanol aumenta la viscosidad del agua y reduce su drenaje líquido (Spedding, 2016). Además, influye en el sabor del producto final, no solo por el alcohol etílico, también por la presencia de otros alcoholes que se encuentran en menor proporción, como: n-propanol, isobutanol, alcohol amilo activo, alcohol isoamilo y alcohol 2-feniletilo (2-feniletanol) que son encargados de otorgar propiedades sensoriales a la cerveza (Liu, 2015).

- **Amargor**

Una de las cualidades organolépticas que distinguen la cerveza tanto industrial como artesanal

es su amargor, definido como la medida en unidades internacionales de amargor (BU) que corresponde a partes por millón (mg L^{-1}) de ácido α isomerizado presente en la cerveza terminada. Los α -isoácidos se producen en la etapa de ebullición del mosto a partir del lúpulo, o son añadidos en forma de productos comerciales después de la fermentación para incrementar el rendimiento cuantitativo. Estos productos normalmente están conformados por compuestos *cis* y *trans* de un solo ácido. Existe una correlación positiva entre el amargor y la hidrofobicidad de los ácidos presentes, dónde los isómeros *cis* pueden otorgar mayor amargor que los *trans* (Baxter y Hughes, 2001).

Los ácidos alfa o los α -isoácidos pueden otorgar a la cerveza propiedades antimicrobianas contra bacterias Gram positivas, pero en cervezas que se utilizan extractos de lúpulo isomerizado después de la fermentación se pierden estas propiedades y pueden aumentar el riesgo de contaminación. Otro de los problemas que podría ocasionar es la generación de sabores desagradables debido a su oxidación dónde se intensifica o pierde su amargor la cerveza. Además, estos ácidos pueden reaccionar con compuestos que contienen azufre y que en presencia de luz puede producir el compuesto 3-metil-2-buteno-tiol (MBT) que altera sus características organolépticas (Roberts, 2016).

- **Color**

El color en la cerveza surge de la reacción de Maillard que se produce en la materia prima, durante los procesos de ebullición y fermentación, pero cuando se desea ajustar el color a uno en específico suele incorporarse caramelo o extracto de malta después de la fermentación (Lewis y Bamforth, 2006). El rango de color va desde el amarillo pálido a marrón oscuro, pasando por tonos rojos como se puede apreciar en Figura 2 (Mosher, 2015). Este parámetro puede influir en el tiempo de vida útil de la cerveza, ya que conforme envejece su color se oscurece.

En la actualidad, existen dos escalas estandarizadas para expresar el color de la cerveza: la escala de la Convención Europea de Cervecería (EBC) y el Método de Referencia Estándar (SRM) de Estados Unidos, que debido a sus diferencias en metodología la primera es el doble que el índice de color determinado por la segunda.



Figura 2. Escala de color de acuerdo al método estándar de referencia (SRM)

Fuente: Mosher (2015)

- **Extracto aparente**

El extracto aparente es un indicador del grado de fermentación aparente alcanzado y define el cuerpo que se percibirá de la cerveza. Este valor del extracto se obtiene a partir de la relación porcentual entre la gravedad original del mosto y final del proceso de fermentación; siendo este último parámetro es un indicador de la cantidad de azúcares no fermentables por la levadura que existen en el producto final. Estos valores pueden estar expresados en ° Plato (°P), o como densidad aparente.

Por lo mencionado anteriormente, se puede determinar que el extracto aparente indica cuanto de la gravedad original del mosto se fermentó; cuando una cerveza presenta un valor alto de azúcar residual después de la fermentación, tendrá un valor de atenuación o extracto aparente más bajo (Mosher, 2015). La presencia de azúcares residuales en la cerveza podría ser la causa de la alteración de la estabilidad microbiológica, ya que podrían ser metabolizados por microorganismos que provocan deterioro de la calidad de la cerveza.

Cabe destacar, que conforme a los valores de extracto o atenuación aparente se puede caracterizar a muchos estilos de cerveza, ya que cuánto más alto es este valor mayor será la cantidad de alcohol que puede presentar la cerveza, y cuanto menor sea este indicador, mayor será el cuerpo y la sensación en boca que deja la cerveza.

Como este parámetro proviene de mediciones de la densidad final medida en la cerveza, el contenido de alcohol va a distorsionar la medida, por lo cual se podría obtener un valor de extracto real mediante la destilación del producto final (Palmer, 2017).

- **Gases disueltos**

En la cerveza se pueden encontrar gases disueltos como el dióxido de carbono, oxígeno y

nitrógeno que influyen en la calidad final del producto. El dióxido de carbono es el más soluble en cerveza, oscilando la concentración de CO₂ en la mayoría de las cervezas en un rango de 2,4-2,9 V/V, y está relacionado con las características organolépticas de la cerveza. El nitrógeno disuelto en la cerveza otorga características específicas a la espuma relacionadas con su apariencia y tamaño de burbujas. A diferencia de estos dos gases, la presencia de oxígeno después de la fermentación puede ocasionar efectos adversos en la calidad de la cerveza, como generación de turbidez y deterioro del sabor (Benedicty, 2016).

- **Otros componentes**

Entre la diversidad de compuestos que existen en la cerveza, la presencia de determinados compuestos fenólicos puede promover ciertos procesos oxidativos al reaccionar con péptidos, o generar “neblina de enfriamiento” en el producto final. También existen otros compuestos, como almidones residuales de los procesos de macerado o biopolímeros que pueden producir turbidez no deseada en la cerveza (Hughes, 2018).

1.3.2. Factores extrínsecos

Los factores extrínsecos son aquellos que están ligados a las condiciones de procesamiento o de conservación, como la temperatura o la luz.

- **Tratamientos tecnológicos**

Durante el procesado y para reducir la actividad microbiana y enzimática se emplean tratamientos de pasteurización o esterilización, principalmente la pasteurización y el proceso de filtrado. Uno de los problemas que puede ocasionar la pasteurización, tanto en túnel como flash, es la pérdida de sabor, o la generación de agregaciones de carbohidratos con compuestos fenólicos o proteínas de alto peso molecular (dos Santos y col. , 2019).

- **Temperatura de conservación**

Uno de los factores que influye en el deterioro de la cerveza es la temperatura de conservación, debido a que al almacenar la cerveza a temperaturas inferiores a 0 °C, se produce turbidez o neblina de enfriamiento, sin embargo, esta puede desaparecer cuando la c a temperatura ambiente este fenómeno desaparece pero cuando la cerveza se almacena a temperatura ambiente por más de seis meses este fenómeno es permanente (Stewart y Priest, 2011)

- **Condiciones de conservación**

Los principales factores de conservación que pueden provocar cambios indeseados en la cerveza son: la luz y el oxígeno. En el caso de la luz, como se mencionó anteriormente, cuando la cerveza es expuesta a una longitud de onda de 300-500 nm, se produce el MBT que cambia el olor de la cerveza a almizcle. Mientras que, cuando la cerveza es expuesta al aire a temperaturas elevadas se producen reacciones de oxidación que ocasionan cambios en la intensidad del color y sabor del producto final (Lewis y Bamforth, 2006).

1.4. MICROORGANISMOS CAUSANTES DE DETERIORO EN CERVEZA

La cerveza es considerada como un producto microbiológicamente estable, debido a: los valores bajos de pH que inhiben a la mayoría de los microorganismos; a la alta concentración de alcohol que convierte al sustrato en tóxico para ciertos microorganismos; la acción antimicrobiana del lúpulo; así como a la presencia de azúcares no fermentados o residuales que pueden ser metabolizados por bacterias específicas; el alto contenido de dióxido de carbono y la baja cantidad de oxígeno pueden inhibir el crecimiento microbiano. A pesar de que se puedan desarrollar hongos, levaduras salvajes o ciertas bacterias se sí se incrementan a valores superiores de 10^4 UFC mL⁻¹ es posible la generación de turbidez (Hill y Priest, 2018; Li y col., 2017).

1.4.1. Bacterias

Las bacterias de acuerdo con la estructura de su pared celular se pueden dividir en dos grupos: Gram positivas y Gram negativas; el primer grupo es susceptible a los compuestos presentes en el lúpulo, mientras que las bacterias Gram negativas no se ven afectadas de forma considerable por los ácidos presentes en el lúpulo (Hill y Priest, 2018).

1.4.1.1. Bacterias Gram positivas

La mayoría de los microorganismos que causan deterioro en la cerveza son bacterias ácido-lácticas (BAL), y destacan los géneros *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc* (Menz y col., 2009; Suzuki, 2015). Estas bacterias lácticas se consideran microorganismos indispensables en la industria alimentaria, se utilizan en la elaboración de productos fermentados, pero al mismo tiempo algunas especies y cepas de BAL pueden producir fermentaciones secundarias que deterioran alimentos y bebidas. En el caso de la cerveza, pueden llegar a producir turbidez, acidez, sabores y aromas desagradables en el producto terminado (Suzuki y col., 2008).

- ***Lactobacillus***

Los *Lactobacillus* son bacilos que no forman endosporas (Figura 3), catalasa negativos que pueden tolerar oxígeno y valores de pH bajos (Suzuki, 2015). En las cervecería artesanales la especie con mayor capacidad alterante es *Lactobacillus brevis*, pero otras especies que también pueden provocar deterioro son *L. paracasei*, *L. plantarum* y *L. linderi* (Hill y Priest, 2018). En la Tabla 2, se puede observar en detalle las características del tipo de fermentación, resistencia a la actividad inhibitoria del lúpulo y los efectos en la cerveza que producen las especies *L.brevis*, *L.plantarum* y *L. paracasei*.

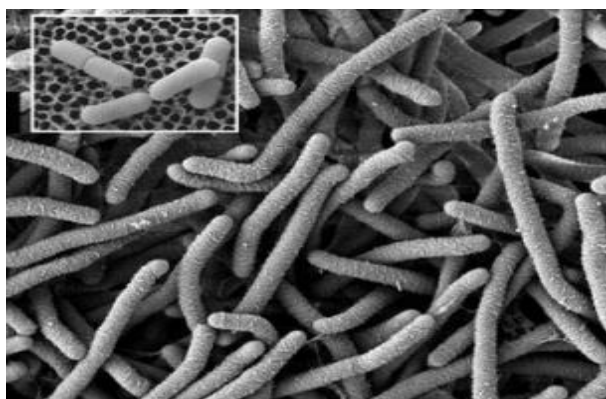


Figura 3. Microfotografía de microscopia por barrido electrónico de *L. plantarum*

Fuente: Ingham y col. (2008)

Tabla 2. Características generales de especies del género *Lactobacillus* que provocan deterioro en la cerveza

Características	Microorganismo		
	<i>L. brevis</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. paracasei</i>
Tipo de fermentación	Heterofermentativa obligada	Heterofermentativa facultativa	Heterofermentativa facultativa
Formación polisacáridos extracelulares	Si	No	No
Tolerancia al lúpulo	Alta (gen horA, hor C)	Débil (gen hor A)	Débil
Efectos en la cerveza	Turbidez, acidificación, no produce diacetilo	Sabor desagradable a diacetilo	Sabor desagradable a diacetilo

Fuente: Suzuki (2015)

- ***Pediococcus***

Los microorganismos de este género son cocos que se presentan en pares o tetradas (Figura 4A) homofermentativos y catalasa negativos, que pueden producir más del 85 % de ácido láctico a

partir de glucosa. En cerveza el principal agente que provoca deterioro es *Pediococcus damnosus*, se caracteriza por ser tolerante al lúpulo y crecer a bajas temperaturas, así como producir diacetilo, sustancias poliméricas extracelulares, ácidos propiónico y acético, sulfuro de hidrógeno y mercaptanos, e inhibir el crecimiento de levaduras (Hill y Priest, 2018; Sakamoto y Konings, 2003).

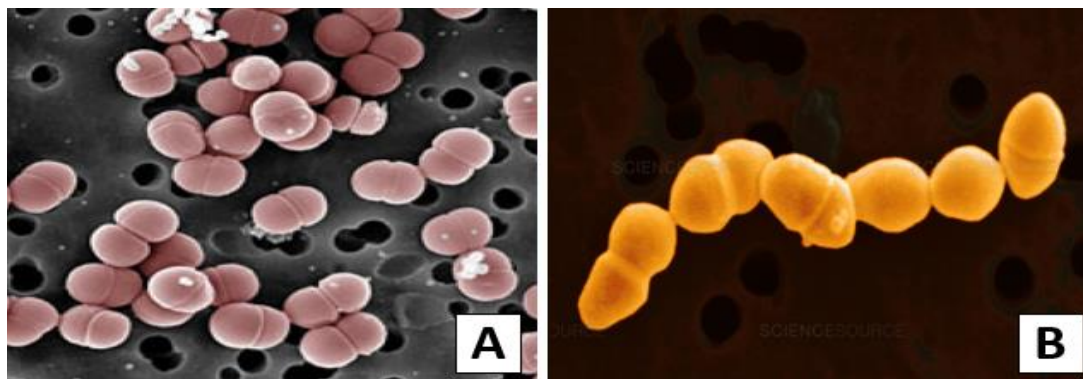


Figura 4. Estructura morfológica de *P. damnosus* (A) y *Leuconostoc* spp. (B)

Fuente: A: Sheahan (2016); B: SCIMAT (2019)

- ***Leuconostoc***

Estas bacterias asporógenas, anaerobias facultativas, catalasas negativas, son elipsoidales, se presentan en pares o en cadenas (Figura 4B), y son heterofermentativos a diferencia de los microorganismos de género *Pediococcus*. Las especies que provocan deterioro en la cerveza son *L. citreum* y *L. mesenteroides*, las cuales, no tienen alta resistencia al lúpulo, por lo cual el deterioro se produce en cervezas con pH altos y contenidos de alcohol bajos (Suzuki, 2015).

1.4.1.2. Bacterias Gram negativas

En la actualidad se considera que las contaminaciones de cerveza producidas por bacterias Gram negativas son insignificantes en comparación a las que se producen por bacterias Gram positivas. A pesar de esto, existen especies anaerobias y aerobias. En el primer grupo se pueden encontrar a especies pertenecientes a los géneros *Pectinatus*, *Megasphaera*, *Zymophilus*, *Selenomonas*; y en el segundo grupo a *Zymonas*, ciertas especies de *Enterobacteriaceae* y bacterias acéticas como *Acetobacter* y *Gluconobacter* (Hill y Priest, 2018).

1.4.2. Levaduras salvajes

A este grupo pertenecen aquellas levaduras que no se hayan introducido intencionalmente en la cerveza. Aunque se producen cervezas de fermentación espontánea realizada mediante cepas

salvajes de levadura (Lambic, Gueuze y Faro), algunas levaduras salvajes producen deterioro de la cerveza a nivel sensorial ya que pueden generar compuestos fenólicos volátiles similares al humo o sudor, además cambios en la turbidez y carbonatación, así como una disminución del cuerpo de la cerveza. Las especies del género *Dekkera* pueden ser agentes perjudiciales cuando se ha efectuado procesos erróneos de embotellado y se conserva oxígeno que le permite crecer. Otras especies de levaduras alterantes pertenecen a los géneros, *Pichia*, *Hanseniaspora*, *Torulaspota*, *Williopsis* y especies no cerveceras de *Saccharomyces* (Hill y Priest, 2018).

1.4.3. Hongos

Los hongos causantes de las contaminaciones provienen de la materia prima, principalmente de los granos, y pertenecen a los géneros *Fusarium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Alternaria*, *Penicillium* y *Cladosporium*, Estos pueden ocasionar efectos perjudiciales en la cerveza como la reducción de gases y la producción de micotoxinas (Briggs y col. , 2004; Hill y Priest, 2018).

2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

La elaboración de cerveza en España ostenta una posición destacada siendo el cuarto productor de la UE y se sitúa en undécimo puesto mundial, con una tendencia alcista del sector y una gran expansión del artesanal. En estos últimos años, diversos estudios demuestran que las bacterias ácido-lácticas (BAL) son el principal grupo microbiano responsable del deterioro de la cerveza. Entre ellas, las cervezas artesanales que normalmente no conllevan un proceso de pasteurización y/o filtración estéril, son las más susceptibles al deterioro de su calidad (turbidez, sabores y olores desagradables) que pueden causar la pérdida de la confianza del consumidor y grandes daños económicos al sector.

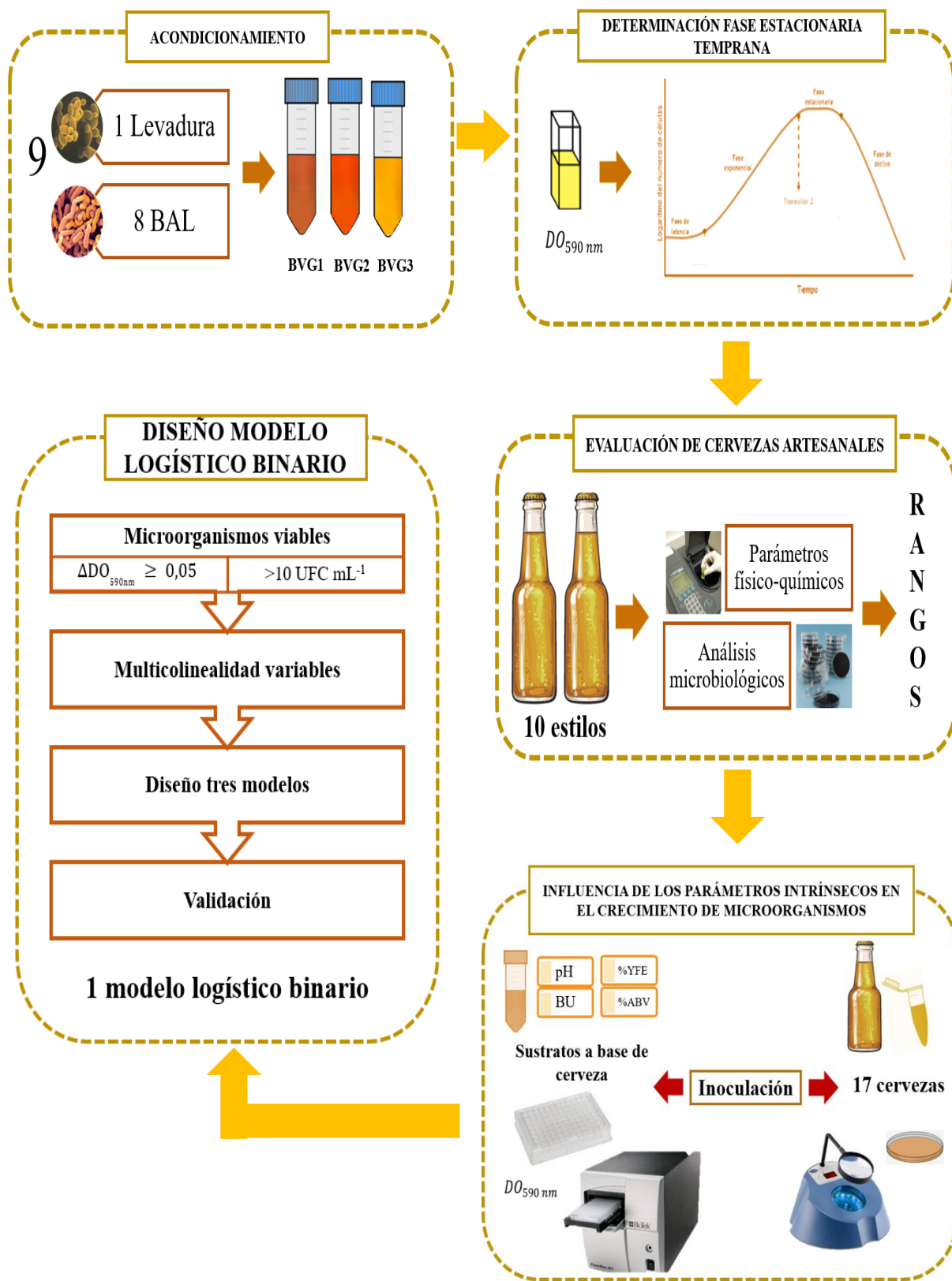
En este contexto, el **objetivo principal** de este estudio es investigar y determinar la susceptibilidad microbiana de diferentes estilos de cervezas artesanales a partir de sus parámetros físico-químicos con el fin de desarrollar una herramienta de calificación para predecir la susceptibilidad a la contaminación microbiana de cervezas artesanales que podría ser de uso práctico para el cervecero artesanal durante la elaboración del producto y para la toma de decisiones.

Para ello se plantearon, los siguientes **objetivos específicos**:

1. Determinar el tiempo de incubación necesario para que los principales microorganismos causantes del deterioro en la cerveza alcancen la fase estacionaria temprana durante su crecimiento.
2. Evaluar las características fisicoquímicas y estado microbiológico de 20 cervezas artesanales de diferentes estilos representativos del mercado
3. Evaluar la influencia de los parámetros intrínsecos de la cerveza artesanal en el crecimiento de microorganismos a través de un modelo logístico binomial.

Plan de trabajo

El presente trabajo se desarrolla en varias etapas, tal y como se muestra en el siguiente esquema:



3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. ACONDICIONAMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS AL CRECIMIENTO EN CERVEZA Y DETERMINACIÓN DE SU FASE ESTACIONARIA TEMPRANA

3.1.1. Bacterias ácido-lácticas y levaduras

Para el presente estudio, se escogieron 9 cepas de bacterias lácticas y levaduras, de la colección de microorganismos del Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL), previamente aisladas y caracterizadas por el grupo de investigación en el que se ha realizado el TFM. La selección se basó en datos bibliográficos reportados por Rouse y van Sinderen (2008), que indicaban los géneros y especies que provocan deterioro en la calidad de la cerveza, además se otorgó preferencia a aquellas cepas cuyo origen de aislamiento sea cervecero. En la Tabla 3 se detallan los géneros y especies de las seis bacterias ácido-lácticas y de la levadura seleccionadas, así como las diferentes cepas empleadas.

Tabla 3. Identificación de bacterias ácido lácticas y levaduras experimentales

Nomenclatura	Género y especie	Aislamiento
CIAL-B6	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	Ambiente cervecero
CIAL-BL1	<i>L. brevis</i>	Cerveza 4,5% ABV y 20 BU
CIAL-BD1	<i>L. brevis</i>	Cerveza 6,5% ABV y 14 BU
CECT 216	<i>L. brevis</i>	Cerveza
CIAL-BF1	<i>L. plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	Bebida alcoholica
CIAL-B2	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	Ambiente cervecero artesanal
CIAL-B1	<i>L. citreum</i>	Ambiente cervecero artesanal
CIAL-BF2	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Bebida alcoholica artesanal
CIAL-H2	<i>Dekkera bruxellensis</i>	Cerveza tipo Lambic (7 % ABV)

3.1.2. Acondicionamiento de los microorganismos al crecimiento en cerveza

Para la adaptación, las BAL se sembraron en caldo MRS (Difco™, Francia) e incubaron en condiciones de anaerobiosis a 28 °C durante 48 h y la cepa de levadura se sembró en caldo YPD (Difco™, Francia) e incubó a 30 °C durante 48 h. Posteriormente, se realizaron cultivos progresivos de adaptación en medios líquidos (BVG 1; BVG 2 y BVG 3) preparados por la combinación de cerveza (5 % ABV; 11 BU; pH 4,25; 0,25 % YFE) y una bebida no alcohólica a base de malta (0% ABV; 3 BU; pH 5,75; 6,6 % YFE), como se muestra en la Figura 5. A

continuación se esterilizaron con filtros de 0,45 μm (Millipore, Estados Unidos), se añadió cicloheximida (Thermo Scientific™, Estados Unidos) a una concentración de 10 ppm y se homogenizaron (Behr y col. , 2006).

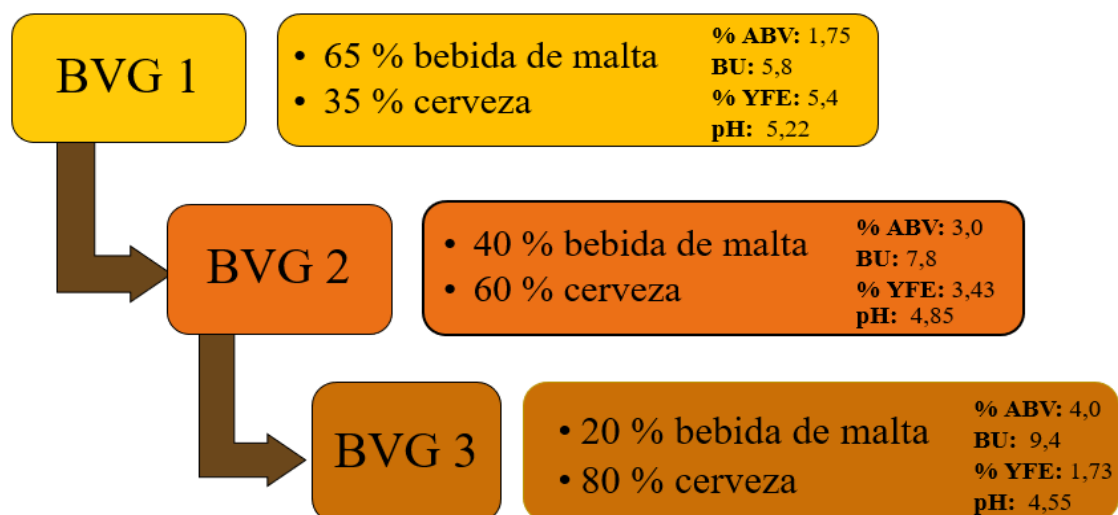


Figura 5. Secuencia de los medios de cultivo empleados para adaptación de las cepas bacterianas y levadura

Los cultivos desarrollados en los caldos MRS (BAL) o YPD (levadura) se centrifugaron (3000 rpm, 10 min, 4 °C) y tras lavar dos veces con solución salina se inocularon por separado en 10 mL de BVG1 e incubaron a 28 °C. Después del desarrollo de turbidez o formación de precipitado en el fondo del tubo, se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 min a 4 °C, se retiró el sobrenadante y se añadieron 10 mL de BVG 2 en cada tubo. De nuevo, se incubaron a 28 °C hasta desarrollo de turbidez o formación de precipitado y se repitió el procedimiento anterior con la adición de 10 mL de BGV3 e incubación a 28 °C. Para el mantenimiento y la conservación de las cepas adaptadas se hicieron cambios del medio BVG 3 cada 7 d.

3.1.3. Fase estacionaria temprana de las curvas de crecimiento

Con el fin de determinar el tiempo en el cual los microorganismos alcanzan la fase estacionaria temprana se construyeron las curvas de crecimiento. Para ello se inocularon 10 mL de BVG3 con 100 μL de cada microorganismo, previamente acondicionado, ajustado a una $\text{DO}_{590\text{nm}}:1$ ($\sim 10^8$ UFC mL^{-1} para las BAL y $\sim 10^7$ UFC mL^{-1} para la levadura). Se midieron las absorbancias ($\text{DO}_{590\text{nm}}$) cada 9 h hasta alcanzar un valor constante, que corresponde al tiempo necesario para alcanzar la fase estacionaria temprana.

3.2. EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS Y MICROBIOLÓGICAS DE CERVEZAS ARTESANALES DE DIFERENTES ESTILOS

3.2.1. Selección de cervezas

Se seleccionaron dos marcas diferentes por cada familia de estilo: IPA, Brown ale, Pale ale, Amber ale, Porter, Stout, Bock, Strong ale, Wheat beer y se incluyeron dos marcas diferentes de cervezas sin alcohol (< 0.5 % ABV), con la finalidad que esta selección abarque la totalidad de las escalas teóricas para densidad final (FG), alcohol por volumen (ABV) y unidades de amargor (BU).

3.2.2. Caracterización fisicoquímica

La preparación de la muestra y la determinación de los parámetros intrínsecos (pH, acidez total, unidades de amargor, extracto fermentable por levadura, y color) de las cervezas seleccionadas se analizaron según los métodos de la American Society of Brewing Chemists, (ASBC), descritas a continuación brevemente. Por otro lado, la caracterización de nivel de alcohol se la realizó en función del valor que presentaba cada una de las cervezas en su etiquetado, información obligatoria de acuerdo con el Real Decreto 678/2016.

- **Preparación de muestras**

Previo a ciertos análisis físicos y químicos de la cerveza es necesario efectuar un descarbonatado y atemperado de las muestras (método Beer-1,A ASBC 2008a), en el que se recomienda someter las muestras de la cerveza a una agitación lenta seguida por una agitación vigorosa con agitadores magnéticos durante 10 min. Posteriormente se centrifugaron (10 min, 4000 rpm, 4 °C) y se recogen los sobrenadantes que se atemperan a 15–20 °C (Podpora y col. , 2015).

- **pH, densidad específica y acidez total**

El valor de pH se determinó con un potenciómetro digital (pHenomenal®, Reino Unido). Para determinar la densidad o gravedad específica se midió con un refractómetro digital (Refracto 30GS, Japón) a cantidad de sólidos solubles totales (°Brix) de cada una de las muestras se convirtió a °P (Plato) (Palmer, 2017) y se determina la gravedad específica real con ayuda de tablas estandarizadas por la ASBC (2005). La acidez total se empleó el método de valoración

potenciométrico, para cuantificar el volumen necesario de 0,1 N NaOH para elevar el pH de 12,5 mL de cerveza hasta 8,2 (ASBC, 2008c).

- **Color**

La intensidad de color de la cerveza se determinó en muestras libres de turbidez y descarbonatadas a una longitud de onda de 430 nm (SPCORD 210 PLUS, Alemania) según el método estandarizado Beer-10A (ASBC 2008d). Cada ensayo se realizó por triplicado y se obtuvo el valor medio para cada una de las cervezas.

- **Extracto fermentable por levaduras**

Para determinar el extracto fermentable por levaduras (YFE) se fermentaron 50 mL de muestra de cada una de las cervezas con *S. pastorianus* (Saflager™ S-189), se incubaron a 25 °C con agitación de 96 rpm (Infors ® AG CH-4103, Bottmingen) hasta completar la fermentación. Para establecer esta condición, se midió la cantidad de sólidos solubles totales (°Brix) de las cervezas, antes de inocular y después de 48 h de fermentación, se realizaron mediciones periódicas hasta que el valor permanezca constante (ASBC, 2008e). Estos valores se midieron por triplicado y el valor medio se transforma a °P y se calculó el porcentaje de extracto aparente (ASBC, 2008b). Finalmente, el porcentaje del extracto total fermentable se computó en base a la diferencia de los porcentajes del extracto fermentable inicial y final.

- **Amargor**

El amargor de las cervezas (BU) se determinó mediante el método estandarizado Beer-23A (ASBC, 2008f), que consiste en la extracción principalmente de α -isoácidos con isooctano. Para esto se emplearon 10 mL de las muestras descarbonatadas, libres de turbidez y atemperadas a 10 °C, a las que se les añadió 1 mL de 3N HCl y 20 mL de isooctano (2,2,4-trimetilpentano). Posteriormente, se agitaron 15 min y para garantizar la separación de las fases acuosa y orgánica se centrifugaron (10 min, 3000 rpm, 10 °C), (Hunter y Dompkowski, 2018). El valor de la medición de absorbancia a ($DO_{275\text{ nm}}$) de la capa superior (isooctano) se multiplicó por 50 para calcular el BU. Cada ensayo se realizó por triplicado.

3.2.3. Análisis microbiológicos

Para evaluar ausencia de contaminantes en las cervezas y comprobar que ninguno de los parámetros fisicoquímicos estaba alterado por la presencia de microorganismos, se realizaron

pruebas para determinar la ausencia de bacterias ácido-lácticas, ácido acéticas y levaduras salvajes.

Con este fin, se empleó el método de la ASBC (2008g), que describe el protocolo de detección de microorganismos por la técnica de filtración con membrana en muestras de cerveza. Se emplearon membranas de acetato de nitrilo (Sartorius, 47 mm de diámetro) que se sembraron en agares selectivos (Tabla 4) para la detección de bacterias ácido-acéticas, ácido lácticas y levaduras salvajes. Para la detección inicial de bacterias lácticas se empleó el sustrato 1 y para verificar los casos en los que hubo crecimiento de colonias se empleó el sustrato 2, en bacterias ácido acéticas se utilizó solo un tipo de sustrato específico, mientras que para levaduras se emplearon los dos sustratos.

Tabla 4. Medios de cultivo selectivos para bacterias lácticas, acéticas y levaduras salvajes

	Tipos de microorganismos		
	Bacterias ácido lácticas	Bacterias acéticas	Levaduras
Sustrato 1	MRS 55 g/L Agar 20 g/L Cicloheximida 10 ppm	Sarco™ Bacterias Acéticas	Peptona 5 g/L Almidón 2 g/L Agar 20 g/L Extracto de carne 3 g/L
Sustrato 2	Sarco™ Bacterias Lácticas		Difco™ YPD Cicloheximida 10 ppm

Las placas se incubaron durante 10 d a 28 °C en condiciones de anaerobiosis para la detección de bacterias lácticas, mientras que para la detección de bacterias acéticas y levaduras se incubaron las placas a 28 °C durante 10 d en condiciones aeróbicas.

3.2.4. Análisis estadístico

Los resultados de cada parámetro fisicoquímico fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) con un intervalo de confianza del 95 % y se determinó la diferencia de medias por el método de mínimas diferencia significativa o LSD (Least Significant Difference). Se utilizó el programa Statgraphics Centurion XV.

3.3. EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE LOS PARÁMETROS INTRÍNSECOS DE CERVEZA ARTESANAL EN EL CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS CAUSANTES DE SU DETERIORO A TRAVÉS DE UN MODELO LOGÍSTICO BINOMIAL

Para evaluar la influencia de los parámetros intrínsecos de cerveza artesanal se realizaron tres modelos logísticos que se diferenciaban por el sustrato de análisis empleado. En el primero se emplearon medios nutritivos elaborados a base de cerveza (caso A), en los cuales se modificó uno de los parámetros fisicoquímicos: pH, alcohol, YFE o amargor y se mantuvieron constantes los tres restantes que no iban a ser evaluados en cada caso; en el segundo se emplearon las 17 cervezas comerciales evaluadas en el apartado 3.2 (caso B) y para elaborar el tercer modelo se combinó los resultados los dos casos anteriores (caso C).

3.3.1. Preparación de sustratos a base de cerveza con diferentes valores de los parámetros fisicoquímicos

Mediante una prueba de desafío microbiológico se evaluó la influencia del pH, amargor, alcohol y extracto fermentable por levaduras, en el crecimiento y supervivencia de los 9 microorganismos potencialmente contaminantes de cerveza.

Para cada parámetro se emplearon diferentes niveles que se detallan en la Tabla 5, estos se seleccionaron con el objetivo de abarcar los rangos de cada característica fisicoquímica determinados en el apartado 3.2.

Tabla 5. Niveles de evaluación de los parámetros fisico-químicos de cerveza

	Parámetros fisicoquímicos			
	pH	Alcohol (%)	Amargor (BU)	YFE (%)
Niveles	3,2	0	10	0,76
	3,5	2,5	15	1,16
	3,8	5	20	1,96
	4,1	7,5	30	2,36
	4,4	10	40	
	4,7	12	50	

Los sustratos de cerveza con diferentes valores de pH y alcohol se prepararon a partir de una cerveza sin alcohol (0,25% ABV; 11 BU; pH 4,18; 2,37 % YFE), previamente centrifugada a

5000 rpm durante 10 min a 4 °C y esterilizada por filtración (0,45 µm). Se ajustaron las concentraciones de alcohol con etanol (96 %) y los niveles de pH con 7 M HCl o 7 M NaOH (Menz, Vriesekoop y col. , 2010) .

En el caso de los sustratos de cerveza con diferentes valores del amargor se emplearon los sobrenadantes de dos cervezas artesanales previamente autoclavadas de 18 BU y 52 BU, tras su centrifugación a 3000 rpm durante 5 min, se mezclaron hasta conseguir las concentraciones descritas en la Tabla 5.

Los sustratos empleados en la evaluación de extracto fermentable de levadura (YFE) se prepararon a partir de cerveza artesanal (7 % ABV; 9 BU; pH 4,20; 0,79 % YFE), esterilizada por filtración (0,45 mm) que se ajustó con jarabe a base de maltosa a los porcentajes de YFE (Tabla 5).

Posteriormente, a la elaboración de cada uno de los sustratos de cerveza, se añadió cicloheximida a una concentración de 10 ppm, para inhibir el crecimiento de levadura cervecera y se inocularon los microorganismos como se detalla a continuación.

3.3.2. Inoculación y análisis del crecimiento de los microorganismos

- **Preparación del inóculo**

Para elaborar el inóculo se incubó cada microorganismo en el medio de adaptación BVG3 (Apartado 3.1.2) a 28 °C, durante el tiempo necesario hasta alcanzar la fase estacionaria temprana (Apartado 3.1.3). Posteriormente, el cultivo se centrifugó (3000 rpm, 10 min, 4 °C) y tras realizar dos lavados con solución salina estéril (0,9 %), se realizaron suspensiones de bacterias (10^8 UFC mL⁻¹, DO_{590nm}: 1) y levaduras (10^7 UFC mL⁻¹, DO_{590nm}: 1) con solución salina estéril y a partir de estas se efectuaron diluciones seriadas hasta alcanzar un inóculo de 10^6 UFC mL⁻¹ (Russell, 2003).

- **Inoculación artificial**

La inoculación artificial de los sustratos de cerveza elaborados para la evaluación de cada parámetro se realizó en placas de 96 pocillos a las que se adicionó 10 µL del inóculo anterior en cada pocillo que contenía 240 µL de los sustratos, con el objetivo de alcanzar una concentración aproximada de 10^5 UFC mL⁻¹. En el segundo caso, que corresponde a las cervezas artesanales comerciales, el objetivo de inoculación fue 10^3 UFC mL⁻¹ y se preparó

para 2 mL de cerveza que se colocaron en tubos eppendorf. La inoculación en los dos casos se realizó por triplicado en cabina anaeróbica y para evitar la evaporación en las placas se sellaron con parafilm (Menz, Vriesekoop, y col. , 2010).

- **Evaluación de crecimiento y desarrollo de microorganismos**

Las placas de 96 pocillos inoculadas se incubaron a 28 °C durante 15 d en condiciones de anaerobiosis mediante sobres BD Gas Pack™. A los 0, 7 y 15 días se midieron las DO_{590nm} con un lector de placas (BioTeck Sinergy™ HT, Estados Unidos). Paralelamente, se inocularon pocillos con caldo MRS e YPD como controles positivos de los microorganismos.

Los tubos eppendorf que contenían las cervezas comerciales inoculadas se incubaron a 28 °C durante 30 d. A los 0, 15 y 30 días se realizaron recuentos por la técnica de goteo. Para evaluar la presencia de BAL se emplearon placas con agar MRS suplementado con cicloheximida (10 ppm) que se incubaron hasta 10 d a 28 °C en anaerobiosis, en el caso de la levadura se emplearon placas con agar YPD con cicloheximida (10 ppm), que se incubaron hasta 7 días a 30 °C en aerobiosis.

- **Supervivencia de microorganismos**

En el primer caso de evaluación se determinó la supervivencia de microorganismos a partir de la variación de las densidades ópticas (Δ) medidas en los días 0 y 15. A los valores de $\Delta DO_{590nm} \geq 0,05$ se les asignó el valor de 1 (Menz, Andrighetto, y col. , 2010) y a los $\Delta DO_{590} < 0,05$ el valor 0 (variables de respuesta dicotómica). En las cervezas comerciales inoculadas se consideraron “1” los casos en los que permanecían células viables $>10 \text{ UFC mL}^{-1}$ después de 30 d de almacenamiento (Hill, 2018). Se estableció que 1 corresponde a la categoría de susceptibilidad a la contaminación microbiana.

3.3.3. Análisis estadístico

Para predecir la susceptibilidad de contaminación de cervezas artesanales, se diseñaron tres modelos logístico binomiales mediante el software IBM SPS Statitics 25, que permitieron asociar los parámetros fisicoquímicos en los tres casos de análisis y determinar la susceptibilidad a la contaminación microbiana de las cervezas. Con este fin, se empleó la técnica de “selección de variables por pasos hacia delante” que permitió que solo formen parte del modelo términos significativos.

Para clasificar los datos se analizó la capacidad de predicción de los tres modelos ajustados con diferentes puntos de corte (0-1) mediante el software Statgraphics Centurion XV. Posteriormente, se determinó para cada caso: el estado de multicolinealidad entre variables independientes, ajuste del modelo con R^2 de Cox-nell, R^2 de Nagelkerke y la prueba de Hosmer y Lemeshow, el porcentaje de aciertos mediante la tabla de clasificación y se analizaron las variables independientes sobre la susceptibilidad a la contaminación (variable dependiente) mediante el Chi-cuadrado de Wald y Odd ratio.

3.3.4. Validación de los modelos probabilísticos que determinan la susceptibilidad de crecimiento de microorganismos en cervezas artesanales

Para validar los modelos generados en el apartado anterior, fue necesario realizar procesos de inoculación artificial. Para cumplir con este procedimiento se emplearon 10 cervezas comerciales diferentes a las 17 cervezas que se usaron en la elaboración del modelo, se evaluó sus características fisicoquímicas (Apartado 3.2.2), se inocularon y determinó su crecimiento ($\Delta DO_{590} > 0,05$) de acuerdo con el apartado 3.3.2.

Se calculó la probabilidad de contaminación de cada cerveza con los modelos predictivos, con estos resultados se clasificaron las cervezas en una categoría determinada: susceptibles a contaminación ó no susceptibles a contaminación, cuando la probabilidad fue mayor o igual al punto de corte se categorizó en la primera categoría caso contrario en la segunda. Se determinó su porcentaje de aciertos tanto para casos positivos y negativos, y según esta información más el análisis de ajuste del modelo (Apartado 3.3.3) se seleccionó el modelo que se iba a emplear para diseñar la herramienta que permita categorizar a las cervezas de acuerdo con su susceptibilidad de contaminación (Alta-Nula).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. ACONDICIONAMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS AL CRECIMIENTO EN CERVEZA Y DETERMINACIÓN DE SU FASE ESTACIONARIA TEMPRANA

4.1.1. Selección y acondicionamiento de microorganismos

Para este estudio se seleccionaron nueve microorganismos, 8 cepas de BAL: *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* (CIAL-B6); *L. brevis* (CIAL-BL1; CIAL-BD1; CECT 216); *L. plantarum* subsp. *plantarum* (CIAL-BF1); *Leuconostoc pseudomesenteroides* (CIAL-B2); *L. citreum* (CIAL-B1); *P. pentosaceus* (CIAL-BF2) y una cepa de levadura *D. bruxellensis* (CIAL-H2) descritos previamente en la Tabla 3.

Después del período de adaptación en los diferentes medios líquidos (BVG 1; BVG 2; BVG 3), las 9 cepas lograron adaptarse a las condiciones propuestas en cada uno de ellos. Sin embargo, cómo se puede observar en la Figura 6, el medio BVG3 presentó una menor producción de biomasa en comparación con los otros dos medios. Esto pudo ser provocado por las condiciones hostiles que presentaba el tercer medio líquido de adaptación (4 % ABV, 9,4 BU, 1,73 % YFE y pH 4,55), ya que fue el resultado del incremento paulatino de valores de alcohol y unidades de amargor acompañado de una reducción de valores de extracto fermentable por levaduras y pH.

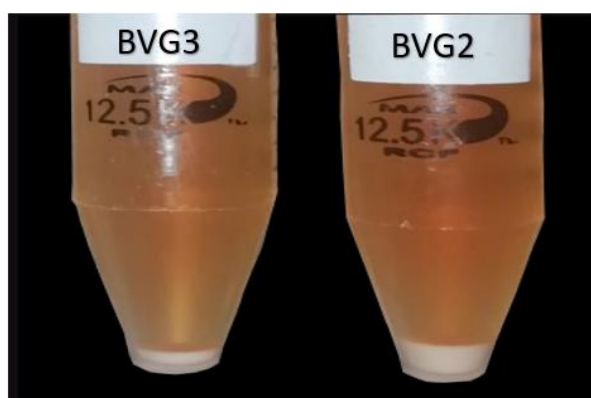


Figura 6. Crecimiento de biomasa de *D. bruxellensis* en BGV3 (ABV: 4 %, BU: 9,4, YFE: 1,73 % y pH: 4,5) y BVG2 (ABV: 3 %, BU: 7,8, YFE: 3,43 % y pH: 4,85)

Las bacterias ácido lácticas presentan diferentes mecanismos de resistencia a los parámetros intrínsecos de la cerveza, uno de ellos es la reducción de la superficie de contacto. En la Figura 7, se puede observar que *L. brevis* CIAL-BD1 presenta un tamaño celular inferior después de

su período de adaptación en BVG3, respecto al que presenta cuando se cultivó en medio MRS. Asano y col. (2007) también describen que *L. brevis* puede presentar una superficie de contacto mayor cuando se encuentran en MRS ya que le permite incorporar un contenido elevado de nutrientes, mientras que al estar expuesta a condiciones adversas como sustancias bactericidas y etanol la reducción de su tamaño le permite mejorar el despliegue de mecanismos de defensa.

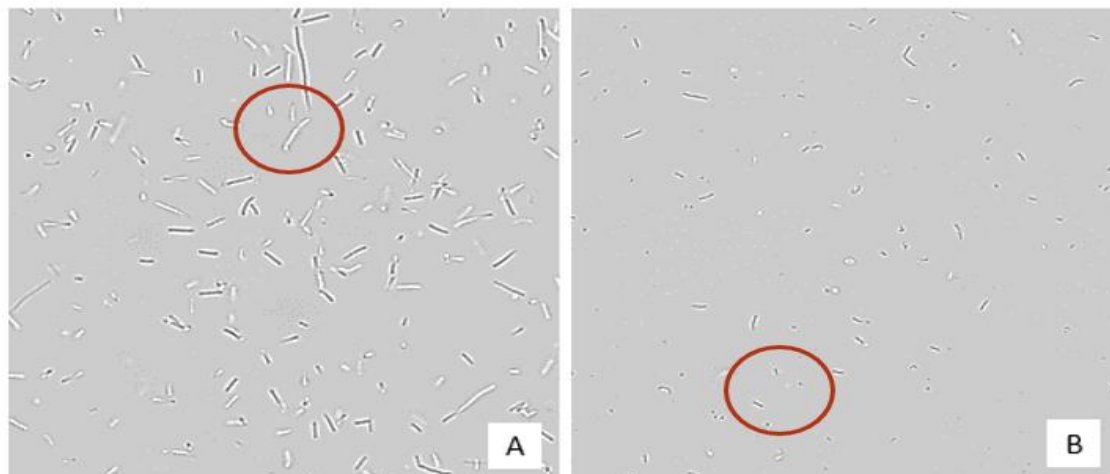


Figura 7. Morfología *L. brevis* después de un período de incubación de 7 días a 28 °C en MRS (A) y BVG3: ABV: 4 %, BU: 9,4, YFE: 1,73 % y pH: 4,5 (B) obtenidas a través de microscopía óptica y confocal

Tras acondicionar los 9 microorganismos, se determinó el tiempo de incubación necesario para alcanzar la fase estacionaria temprana. El motivo principal para llevar a los microorganismos a esta fase es que las células viables desarrollan mecanismos de adaptación a las condiciones de estrés de forma prolongada. Además, los microorganismos en la fase estacionaria temprana *in vitro* encuentran condiciones similares a las que presenta el entorno natural de las bacterias y levaduras. Por lo cual, es factible emplearlas en esta fase para contaminaciones artificiales de interés (Navarro y col. , 2010).

4.1.2. Determinación del tiempo de incubación necesario para que las BAL alcancen su fase estacionaria temprana

En las cepas *Lactobacillus*, la fase estacionaria temprana inició a las 85 h. Por otro lado, se puede observar en la Figura 8, que las tasas de crecimiento son distintas, ya que el incremento de turbidez es superior para las cepas de *L. brevis*, (CIAL-BL1, CIAL-BD1 y CECT 216); seguido por *L. paracasei* (CIAL-BF1) y *L. plantarum* (CIAL-B6).

De acuerdo con Aoudia y col. (2016), cuando las bacterias de género *Lactobacillus* crecen en

un medio que favorece su desarrollo pueden alcanzar su fase estacionaria en 24 h aproximadamente. En este caso las cepas de *Lactobacillus* estudiadas se encuentran bajo condiciones adversas, por lo cual su etapa de latencia se pudo incrementar, ya que como se puede observar en la Figura 8 después de 24 h de incubación las 5 cepas se encontraban en su fase de crecimiento

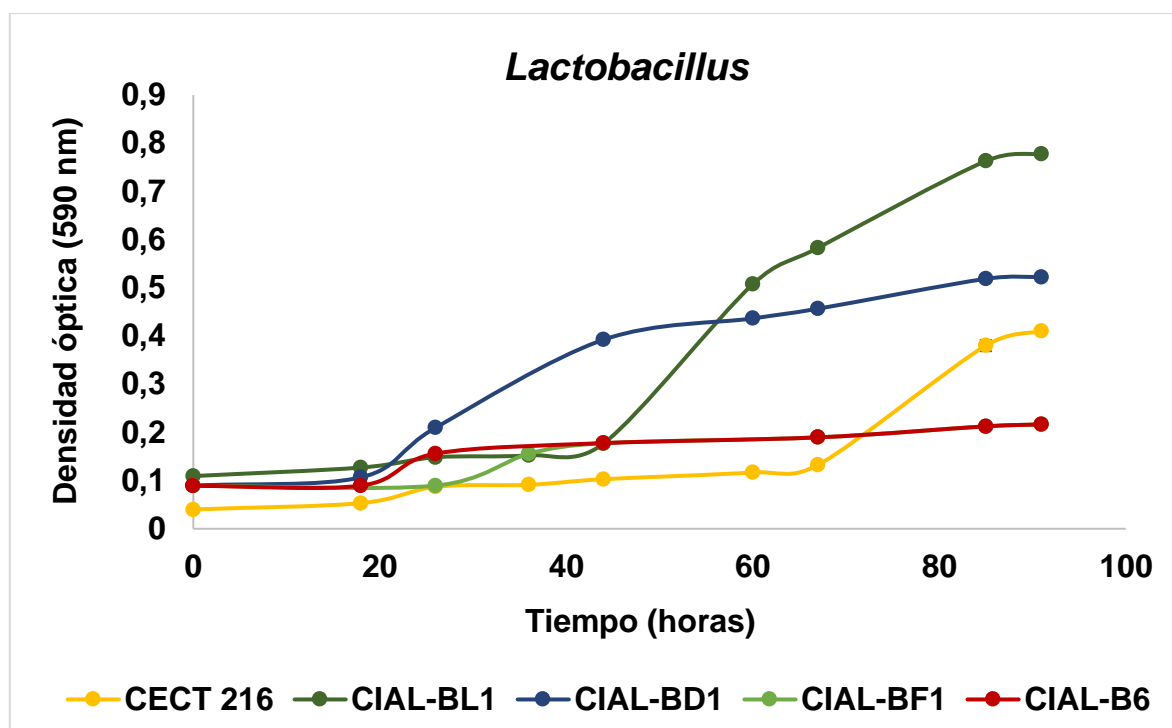


Figura 8. Curva de crecimiento de cepas *L.brevis* (CIAL-BL1, CIAL-BD1, CECT 216); *L.plantarum* (CIAL-BF1) y *L. paracasei* (CIAL-B6) en medio líquido BVG3 (ABV: 4 %, BU: 9,4, YFE: 1,73 % y pH: 4,5) e incubadas a 28 °C

Las cepas de *L. brevis* pueden tolerar valores de alcohol superiores al 14 % y resisten hasta 35 BU, mientras que *L. plantarum* y *L. paracasei* tienen baja resistencia al lúpulo y son microorganismos que se pueden encontrar fácilmente en el ambiente de las cervecerías. Las condiciones de resistencia de *L. brevis* son similares a las características que presenta BVG3, por lo cual esta podría ser una de las causas para que las tres cepas de *L. brevis* hayan presentado una mayor densidad óptica que las otras dos especies de *Lactobacillus* (Suzuki, 2015; Teixeira, 2014).

Entre las tres cepas de *L. brevis* (CIAL-BL1, CIAL-BD1 y CECT 216), se observaron diferencias intra-especies en la tolerancia a las condiciones de estrés. Esto podría estar relacionado con el origen de su aislamiento, puesto que CIAL-BL1 fue aislada de una cerveza con un valor de amargor de 20 BU a diferencia de CIAL-BD1 y CECT 216 que fueron aisladas

de un medio que contenía 14 BU y de ambientes cerveceros, respectivamente (Suzuki y col. , 2008).

En la Figura 9 se muestran, las curvas de crecimiento de las bacterias Gram positivas: *L. pseudomesenteroides* (CIAL-B2), *L. citreum* (CIAL-B1) y *P. pentosaceus* (CIAL-BF2). A diferencia de los aislados de *Lactobacillus* el tiempo de incubación que requieren las bacterias citadas para alcanzar la fase estacionaria temprana es de 91 h. De acuerdo con las mediciones de densidad óptica, CIAL-BF2 presentó mayor tasa de crecimiento que CIAL-B2 y CIAL-B1; pero inferior a las cepas de *L. brevis*. Por otro lado, las dos cepas de *Leuconostoc* en comparación a las ocho cepas de microorganismos restantes, fueron las que presentaron menor tasa de crecimiento.

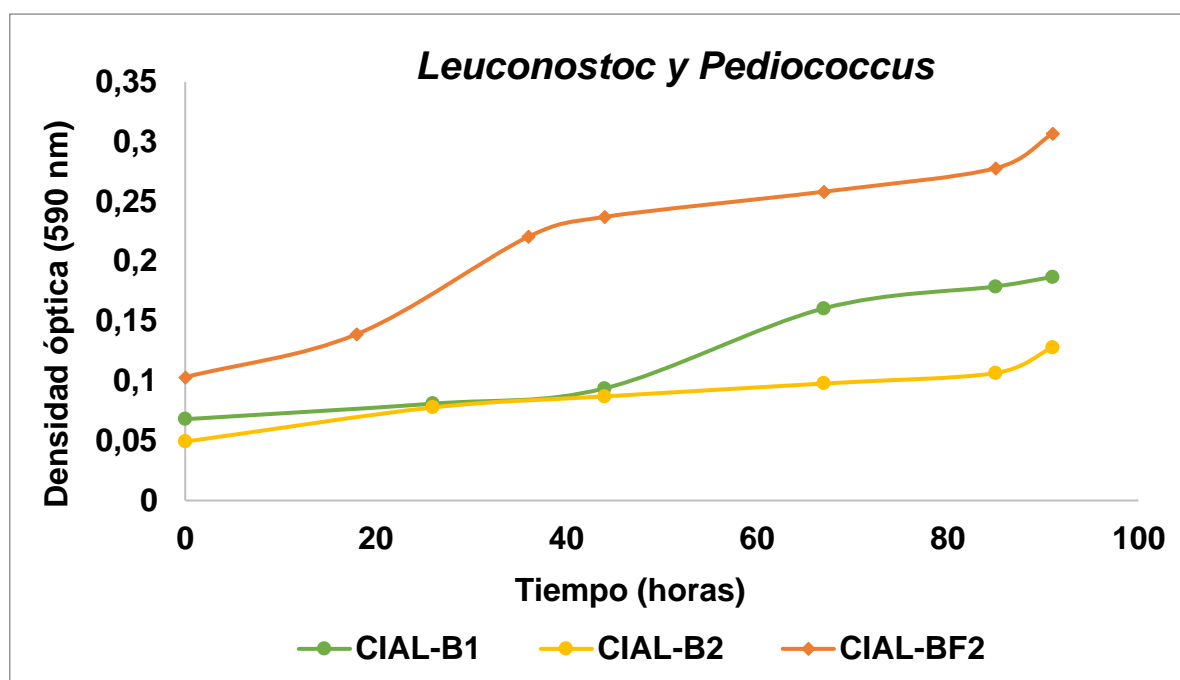


Figura 9. Curva de crecimiento de *L. pseudomesenteroides* (CIAL-B2), *L. citreum* (CIAL-B1), *P. pentosaceus* (CIAL-BF2), en medio líquido BVG3: ABV: 4 %, BU: 9,4, YFE: 1,73 % y pH: 4,5 incubadas a 28 °C

Estudios realizados por Nghe y Nguyen (2014), indican que la incubación de *P. pentosaceus* en placas Petri con medio MRS a 37 °C requiere de 36 h de incubación para alcanzar su fase estacionaria; y D'Angelo y col. (2017), indicaron que el tiempo en que *L. pseudomesenteroides* alcanza la fase estacionaria temprana es 14 h, mientras que *L. citreum* necesita 12 h. Por lo cual, se podría considerar que el tiempo de 91 h es razonable, ya que en medio BVG3 las cepas estaban expuestas a condiciones de estrés que puede generar una prolongación de sus etapas de adaptación.

4.1.3. Determinación de tiempo de incubación necesario para que *Dekkera bruxellensis* alcance su fase estacionaria temprana

En la Figura 10, se puede observar la alta tasa de crecimiento *D. bruxellensis* CIAL-H2, respecto a las BAL, pero que alcanza su fase estacionaria temprana aproximadamente en 85 h, tiempo similar a las cepas de *Lactobacillus* spp. Esto pudo ser provocado por un mayor consumo de nutrientes del sustrato ya que a diferencia de las bacterias toleran condiciones hostiles de alcohol y pH. Así mismo, la presencia de cierta cantidad de oxígeno le permite consumir mayor cantidad de azúcares que otras especies de *Saccharomyces*, además degradan azúcares complejos como dextrinas (Powell y Kerruish, 2017).

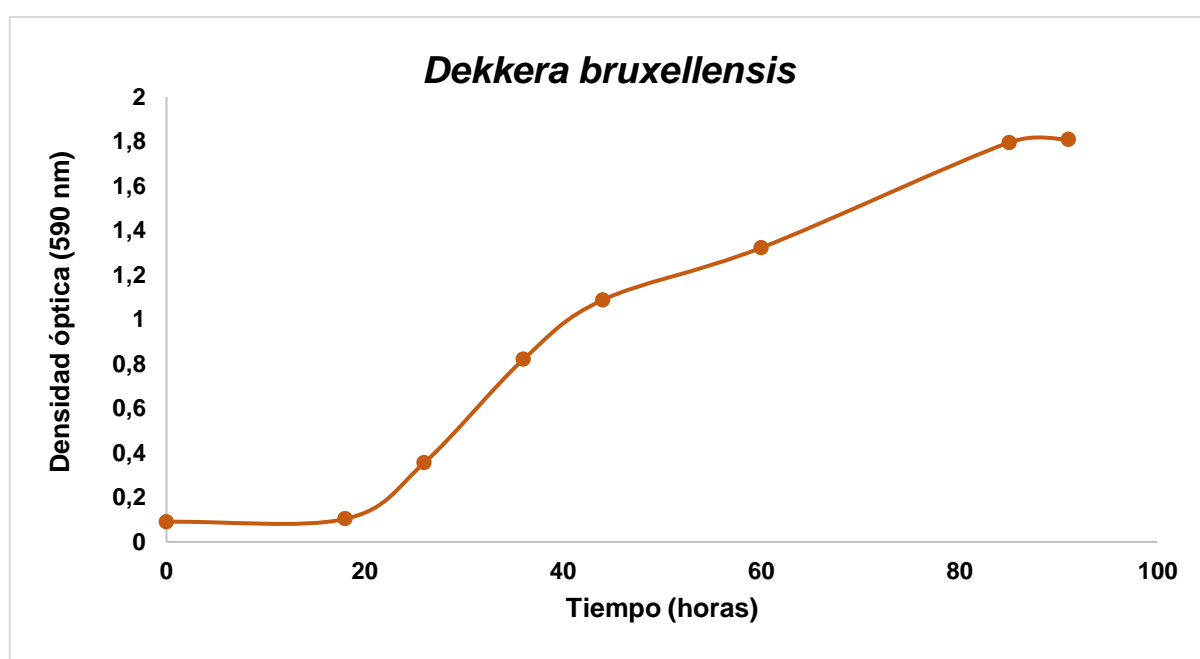


Figura 10. Curva de crecimiento *D. bruxellensis* en medio líquido BVG3: ABV: 4 %, BU: 9,4, YFE: 1,73 % y pH: 4,5 incubadas a 28 °C

Estudios realizados por Blomqvist y col. (2012), indicaron que cuando se incubaba *D. bruxellensis*, en un medio propicio para su crecimiento a una temperatura de 30 °C y en condiciones de anaerobiosis requería unas 70 h para alcanzar su fase estacionaria temprana. La presencia de oxígeno en la incubación podría ser la causa para que el tiempo de incubación en nuestro estudio sea superior. Schifferdecker y col. (2014), mencionan que el crecimiento en condiciones de anaerobiosis reduce el rendimiento de la glucosa, por lo cual habría una menor asimilación de azúcares y alcanzaría la fase de crecimiento en menor tiempo.

4.2. EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS FISCOQUÍMICAS Y MICROBIOLÓGICAS DE CERVEZAS ARTESANALES DE DIFERENTES ESTILOS

4.2.1. Caracterización fisicoquímica

Se seleccionaron 20 cervezas artesanales, dos por cada estilo: Strong Ale, Brown Ale, Pale Ale, Amber Ale, Bock, Cerveza de trigo, Indian Pale Ale (IPA), Porter, Sin alcohol y Stout (Apartado 3.2.1). En la Tabla 6, se describen los valores de los parámetros fisicoquímicos declarados por el fabricante

Respecto al contenido de alcohol de las cervezas seleccionadas, el valor mínimo es de un 0,25 %, que corresponde a la cerveza sin alcohol A, y el máximo del 12 %, que presentó la cerveza Bock A, lo que permite abarcar la mayor parte de la escala de alcohol descrita por el BJCP (2015), puesto que el máximo valor planteado por esta organización es 14 %, y con esta muestra se cubre hasta el 12 % ABV.

Tabla 6. Parámetros físico-químicos declarados en las cervezas seleccionadas para la experimentación

Estilos cerveceros	ABV (%)	BU	Color (°EBC)	Estilos cerveceros	ABV (%)	BU	Color (°EBC)
Strong Ale A	6,5	-	-	Cerveza de trigo A	5,5	-	-
Strong Ale B	10	-	-	Cerveza de trigo B	3,8	-	-
Brown Ale A	4,3	18	-	IPA A	7,2	70	-
Brown Ale B	5,2	40	40	IPA B	8	120	-
Pale Ale A	5	20	10	Porter A	5,9	25	-
Pale Ale B	5	-	-	Porter B	5	-	-
Pale Amber A	5,5	-	-	Sin alcohol A	0,25	-	-
Pale Amber B	5,8	35	-	Sin alcohol B	<0,5	-	-
Bock A	12	-	-	Stout A	4,2	40	110
Bock B	7	-	-	Stout B	9	66	-

- **Acidez total y pH**

Las 20 cervezas seleccionadas presentaron un rango de acidez de 0,11 – 0,40 % expresados en g/100 mL de ácido láctico (Figura 11). El menor valor lo presentó la cerveza sin alcohol B y el

mayor la cerveza de trigo B. Tang y Li (2016), mencionan que los valores de acidez titulable deben ser inferiores a 1,65 % por lo cual todas las cervezas se ajustan a los valores descritos para este parámetro.

Además, se puede evidenciar que las dos cervezas empleadas en cada estilo, a pesar de pertenecer a la misma familia, presentan diferencias significativas en su valor de acidez total de acuerdo con la prueba LSD. Este hecho podría ser causado por diferencias en la materia prima, el proceso de elaboración, la cepa de levadura empleada o posibles contaminaciones (Tang y Li, 2016).

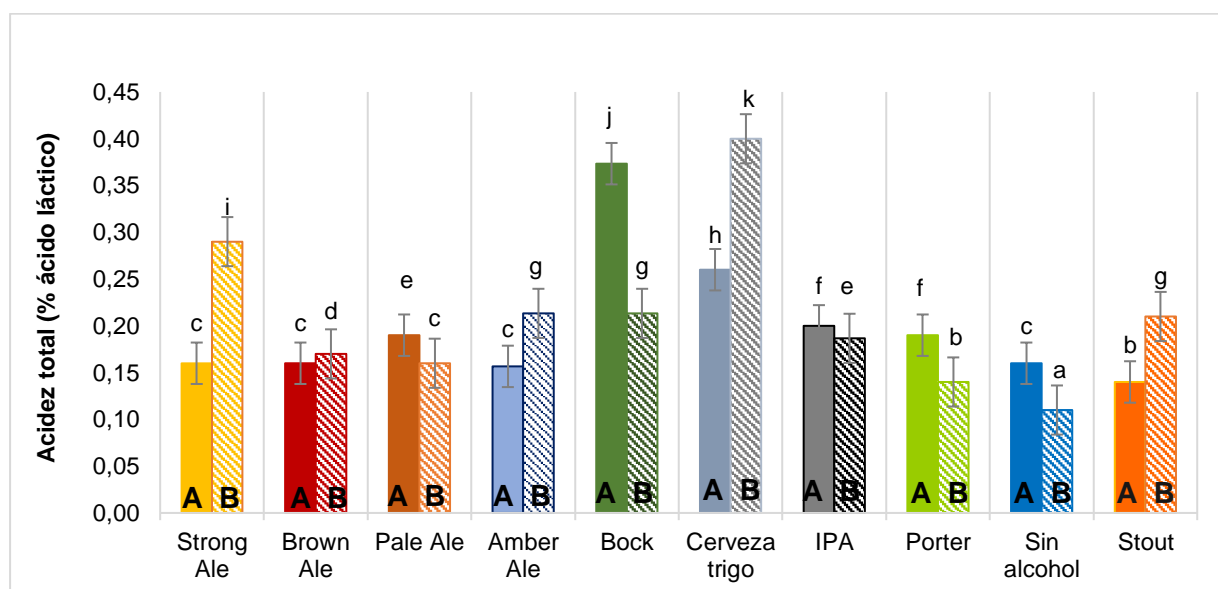


Figura 11. Acidez titulable (% ácido láctico) de los 10 estilos de cervezas, cada uno con dos tipos (cervezas A y B). Las letras minúsculas indican la existencia de diferencias significativas, determinadas con la prueba LSD ($p < 0,05$)

El pH de las muestras de cerveza, como se puede apreciar en la Figura 12, osciló en un rango de 3,14 a 4,70. El valor menor de pH lo presentó la cerveza de trigo B y el mayor la cerveza IPA B. Las cervezas con pH de 4,06 a 4,26 no presentan diferencias significativas entre sí, a pesar de corresponder a familias y estilos distintos de cervezas.

Baxter y Hughes (2001), han descrito que las cervezas presentan normalmente valores de pH entre 3,8 a 4,7. Por lo cual, la cerveza de trigo B quedaría fuera del rango establecido. Dentro del estilo cervezas de trigo, la tipo B, pertenece a la subcategoría *Berliner Weisse*, que se caracterizan por su bajo nivel de alcohol y sabor más ácido que la cerveza que emplea solo malta para su elaboración (BJCP, 2015). Esta última característica se evidencia también en su valor más alto de acidez total, y según Sadler y Murphy (2017), la acidez titulable es un

parámetro que permite conocer de mejor manera qué impacto tendrán los ácidos en el sabor de la cerveza y en este caso será superior.

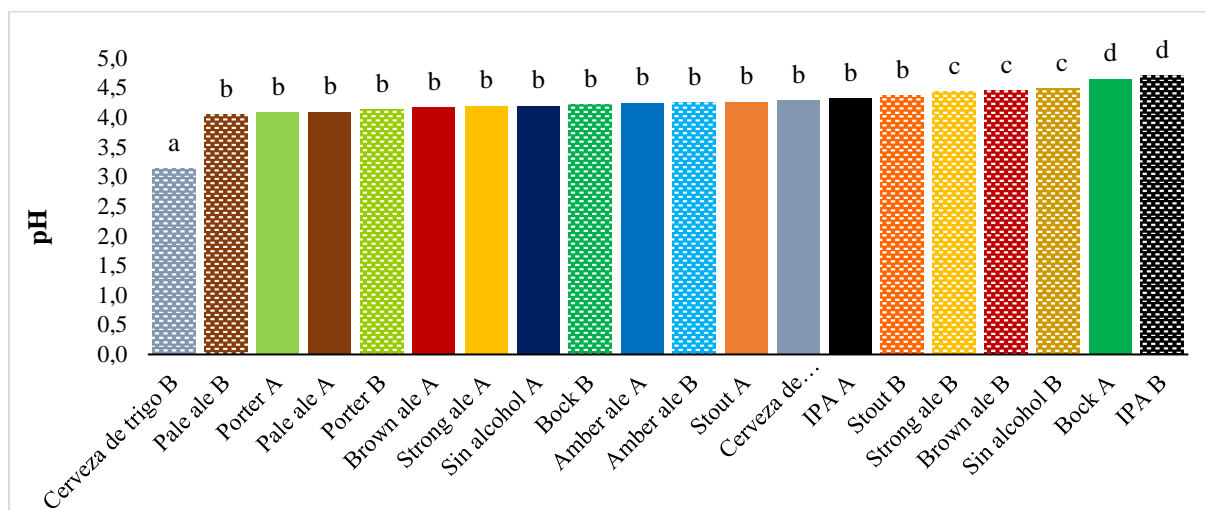


Figura 12. Valores de pH de los 10 estilos de cervezas, cada uno con dos tipos (cervezas A y B). Las letras minúsculas indican la existencia de diferencias significativas, determinadas con la prueba LSD ($p < 0,05$)

• Color

La escala de colores de las 20 cervezas analizadas está en un rango de 3 – 49,5 ° SRM (Tabla 7). La cerveza más clara corresponde a la cerveza de trigo B y la más oscura a Porter B. Los valores de color entre estilos presentan diferencias significativas entre sí de acuerdo con la prueba LSD ($p < 0,05$).

Tabla 7. Escala de colores analizada en 20 cervezas artesanales comerciales de 10 estilos diferentes

Estilos	° EBC	° SRM		Estilos	° EBC	° SRM	
Cerveza de trigo B	5,9 ± 0,0 ^a	3,0 ± 0,0 ^a		IPA B	29,4 ± 0,0 ^k	14,9 ± 0,0 ^k	
Sin alcohol B	9,3 ± 0,0 ^b	4,7 ± 0,0 ^b		Amber ale B	41,9 ± 0,1 ^l	21,3 ± 0,0 ^l	
Sin alcohol A	10,6 ± 0,0 ^c	5,4 ± 0,0 ^c		Amber ale A	45,0 ± 0,1 ^m	22,8 ± 0,1 ^m	
Pale ale A	16,2 ± 0,0 ^d	8,3 ± 0,1 ^d		Brown ale B	49,3 ± 0,0 ⁿ	25,0 ± 0,1 ⁿ	
Pale ale B	18,5 ± 0,0 ^e	9,4 ± 0,0 ^e		Strong ale B	65,4 ± 0,1 ^o	33,2 ± 0,1 ^o	
Brown ale A	18,9 ± 0,0 ^f	9,6 ± 0,0 ^f		Bock A	75,9 ± 0,1 ^p	38,4 ± 0,0 ^p	
Cerveza de trigo A	19,8 ± 0,0 ^g	10,0 ± 0,0 ^g		Stout A	76,9 ± 0,0 ^q	39,1 ± 0,0 ^q	
Bock B	20,5 ± 0,0 ^h	10,4 ± 0,0 ^h		Stout B	77,2 ± 0,0 ^r	39,2 ± 0,0 ^r	
Strong ale A	23,4 ± 0,0 ⁱ	11,9 ± 0,0 ⁱ		Porter A	94,3 ± 0,0 ^s	47,9 ± 0,0 ^s	
IPA A	25,0 ± 0,0 ^j	12,7 ± 0,0 ^j		Porter B	97,4 ± 0,3 ^t	49,5 ± 0,0 ^t	

Según los índices de color establecidos por el BJCP (2015) para cada estilo, las dos cervezas de estilo Ale pálida, IPA, Ale marrón, cervezas de trigo y sin alcohol presentan valores apropiados de acuerdo con el estilo de familia al que pertenecen. En las cervezas de estilo Bock únicamente cumple la cerveza del tipo B, ya que la del tipo A supera a 30 °SRM que es el valor máximo; lo mismo sucede con Ale ámbar A, Ale fuerte B y las dos cervezas Porter que superan el índice de 22, 25 y 40 °SRM, respectivamente.

Las causas para que las cervezas mencionadas anteriormente presenten un mayor índice de color de acuerdo con Palmer (2017), pueden estar relacionadas con el tiempo de ebullición, método de calentamiento, floculación de la levadura y los procesos oxidativos. Además, según Lewis y Bamforth (2006), puede haber iniciado su proceso de envejecimiento, ya que este factor provoca el incremento de color. Otra de las causas, puede ser que la resolución del espectrofotómetro disminuye cuando las cervezas son oscuras, y a pesar de haber realizado diluciones, están no son lineales en este tipo de casos.

- **Extracto fermentable por levaduras**

El rango de valores del extracto fermentable por levaduras (% YFE) de las 20 cervezas es 0,19 – 3,05 % y las cervezas que pertenecen al mismo estilo de familia presentan diferencias significativas entre sí ($p < 0,05$) (Figura 13). La cerveza Porter B presentó el valor mínimo y las cervezas, sin alcohol B y Pale Ale B, los valores superiores.

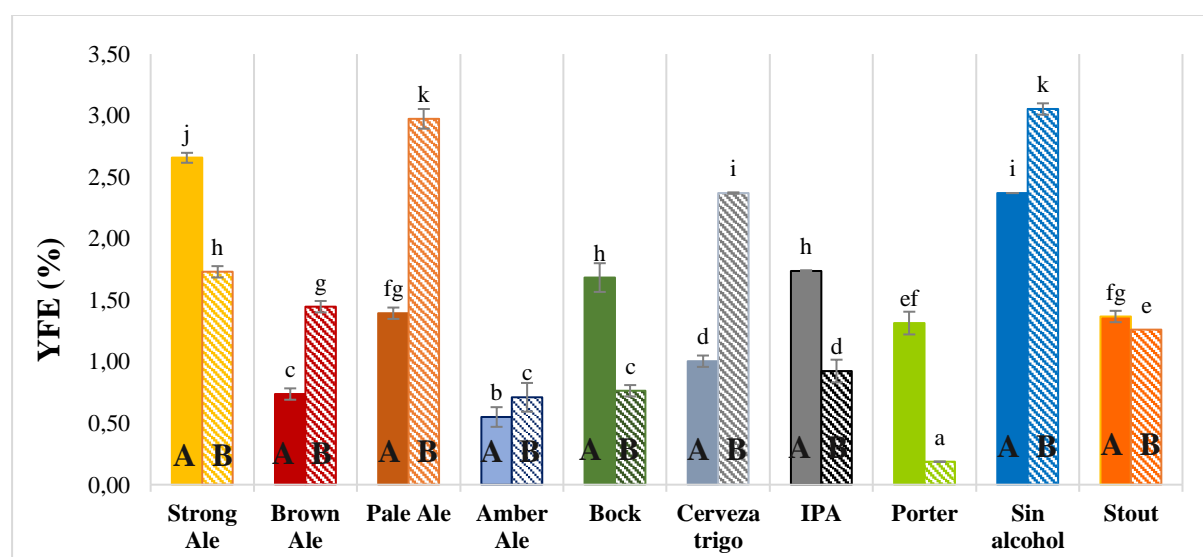


Figura 13. Extracto fermentable por levaduras (% YFE) de los 10 estilos de cervezas, cada uno con dos tipos (cervezas A y B). Las letras minúsculas indican la existencia de diferencias significativas, determinadas con la prueba LSD ($p < 0,05$)

A pesar de que las cervezas Porter se caracterizan por su baja dulzura residual, las dos cervezas analizadas presentaron valores inferiores al determinado para cervezas de este estilo, de 2 a 6% (BJCP 2015). Esto pudo ser provocado por la levadura empleada para su elaboración, ya que normalmente se usan cepas con alta atenuación y características de floculación media, sin embargo, pueden existir levaduras cuyo nivel de atenuación no es el indicado (Daniels, 2000).

Los valores inferiores a los especificados por BJCP (2015) observados para las cervezas Brown Ale, Amber Ale, IPA y Bock, de igual manera podría estar relacionado a una alta atenuación por las levaduras, no solo de la que utilizaron en el proceso de fermentación, también de la que se empleó para determinar azúcares residuales, ya que pudieron interferir otros parámetros intrínsecos como amargor, alcohol, pH u oxígeno

- **Amargor**

El amargor de la muestra de las 20 cervezas está en un rango de 9 a 75 BU y se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en su valor de amargor, a pesar de pertenecer las cervezas al mismo estilo (Figura 14). La cerveza Bock B fue la que presentó el menor valor analizado y la IPA B el valor mayor. Por lo tanto, con esta muestra de cervezas se puede abarcar casi toda la escala de amargor, ya que el valor más alto planteado por BJCP (2015), es 120.

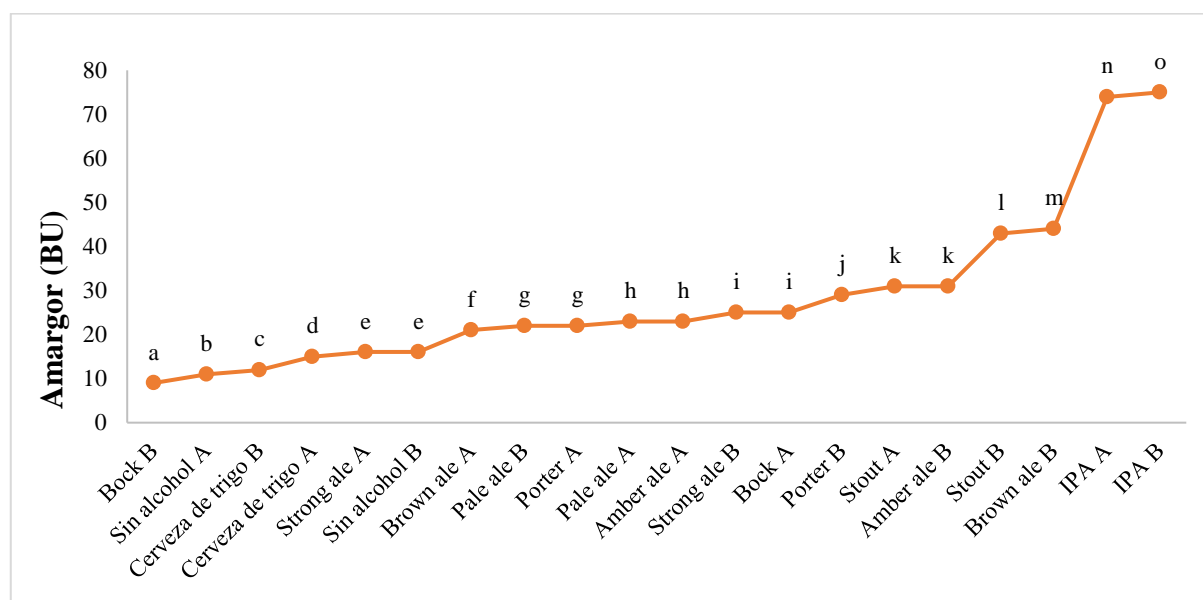


Figura 14. Nivel de amargor (BU) de los 10 estilos de cervezas, cada uno con dos tipos (cervezas A y B). Las letras minúsculas diferentes indican la existencia de diferencias significativas, determinadas con la prueba LSD ($p < 0,05$)

Las cervezas de estilo Bock, según BJCP (2015), pueden estar en un rango de 16 – 35, por lo

cual Bock B, no cumpliría con esta caracterización, esto podría estar relacionado con el pH en la extracción líquido-líquido, ya que si el pH es superior a 4 podría hacer que los α -isoácidos sean menos solubles en la fase orgánica (Hunter y Dompkowski, 2018).

Aunque la BJCP (2015) indica que las cervezas Brown Ale pueden presentar niveles de amargor entre 10 y 40 BU, se podría considerar que la cerveza B de éste estilo está fuera de rango, puesto que presenta un valor de 44 BU, sin embargo otros autores como Daniels (2000) describen que hay cervezas de este estilo que alcanzan hasta los 60 BU.

Por otro lado, en varias cervezas se obtuvieron valores diferentes a los marcados en el etiquetado, esto pudo ser provocado porque, el tiempo de almacenamiento de la muestra influye en la medida obtenida por los métodos espectrofotométricos. Además, en cervecería artesanal los cálculos para la obtención de BU se hacen de manera teórica en base al tipo y la cantidad de adicionada de lúpulo (Palmer, 2017).

4.2.2. Análisis microbiológicos

La vida útil de la cerveza muchas veces se puede ver afectada por contaminaciones con bacterias y levaduras salvajes que provocan alteraciones en la turbidez, el sabor y modificaciones del pH u otras propiedades intrínsecas (Menz y col. , 2009; Suzuki, 2012). Por ello, se determinó si las cervezas empleadas en el estudio presentaban contaminaciones microbianas por BAL, bacterias acéticas y levaduras que modificaran las características fisicoquímicas analizadas.

- **Bacterias ácido-lácticas**

Para conocer si las cervezas evaluadas presentaban bacterias ácido-lácticas se empleó como primer sustrato medio MRS suplementado con 10 ppm de cicloheximida (sustrato 1) para inhibir el crecimiento de levadura cervecera. En 19 cervezas no se evidenció desarrollo de BAL, solamente en la cerveza Pale Ale A se encontraron $2,5 \cdot 10^3$ UFC mL⁻¹ (Tabla 8), por lo cual para descartar que eran otro tipo de bacterias o levaduras se empleó el sustrato 2 (Sarco™ Bacterias Lácticas), que inhibe el crecimiento de mohos, levaduras y bacterias acéticas.

Como se muestra en la Tabla 8, en el sustrato 2 se verificó que las colonias que se desarrollaron en el sustrato 1 pertenecían a este grupo de bacterias y alcanzaban recuentos microbiológicos $1,5 \cdot 10^3$ UFC mL⁻¹. La presencia de estos microorganismos en esta cerveza puede estar

relacionada al estilo de cerveza ya que de acuerdo con su descripción comercial es también Saison y el BJCP (2015) detalla que en este tipo de cervezas se puede emplear estas bacterias para otorgar propiedades organolépticas. Debido al resultado, esta cerveza fue descartada de otras pruebas efectuadas en este estudio.

Tabla 8. Análisis microbiológicos de las 20 cervezas que pertenecen a 10 estilos diferentes

Estilos cerveceros	Bacterias ácido-lácticas		Bacterias ácido- acéticas	Levaduras salvajes	
	Sustrato 1	Sustrato 2	Sustrato 1	Sustrato 1	Sustrato 2
	UFC mL ⁻¹	UFC mL ⁻¹	UFC mL ⁻¹	UFC mL ⁻¹	UFC mL ⁻¹
Ale fuerte A	ND	-	ND	ND	ND
Ale fuerte B	ND	-	ND	ND	ND
Ale marrón A	ND	-	ND	ND	ND
Ale marrón B	ND	-	ND	ND	ND
Ale pálida A	2,5 · 10 ³	1,5 · 10 ³	ND	ND	ND
Ale pálida B	ND	-	ND	ND	ND
Ale ámbar A	ND	-	ND	ND	ND
Ale ámbar B	ND	-	ND	ND	ND
Bock A	ND	-	ND	1 · 10	ND
Bock B	ND	-	ND	ND	ND
Cerveza de trigo A	ND	-	ND	ND	ND
Cerveza de trigo B	ND	-	ND	ND	ND
IPA A	ND	-	ND	ND	ND
IPA B	ND	-	ND	ND	ND
Porter A	ND	-	ND	ND	ND
Porter B	ND	-	ND	ND	ND
Sin alcohol A	ND	-	ND	ND	ND
Sin alcohol B	ND	-	ND	ND	ND
Stout A	ND	-	ND	ND	ND
Stout B	ND	-	ND	ND	ND

ND: no detectado

- **Bacterias acéticas**

En el análisis de este tipo de bacterias se empleó el medio selectivo (Sarco TM Bacterias Acéticas) donde no se observó desarrollo de bacterias acéticas. Según Ziola y Bergsveinson

(2017), los problemas ocasionados por bacterias acéticas se presentan en cervezas envasadas en barril o en aquellas que se permanecen en contacto con el aire durante tiempos prolongados al ser envasada, debido a sus requerimientos de oxígeno. *La vigilancia permanente durante esta fase del procesamiento ha provocado que los problemas relacionados con este tipo de bacterias casi se hayan eliminado de las cervecerías.

- **Levaduras salvajes**

Para determinar contaminaciones por levaduras no *Saccharomyces* se emplearon dos sustratos, el primero a base de extracto de carne y el segundo YPD con cicloheximida, los dos se incubaron de forma paralela, y como se puede observar en la Tabla 8, en el primer sustrato la cerveza Bock A presentó una posible contaminación de 10 UFC mL^{-1} , pero al compararlo con el segundo sustrato no se detectó ningún tipo de crecimiento, por eso no se descartó esta cerveza del estudio.

4.3. EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE LOS PARÁMETROS INTRÍNSECOS DE CERVEZA ARTESANAL EN EL CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS CAUSANTES DE SU DETERIORO A TRAVÉS DE UN MODELO LOGÍSTICO BINOMIAL

4.3.1. Casos de supervivencia en sustratos a base de cerveza con diferentes valores de los parámetros fisicoquímicos

Para determinar los coeficientes del modelo estadístico se evaluaron 197 tratamientos distintos, que consistían en la variación de las variables pH, amargor, alcohol y extracto fermentable por levaduras, cuyos niveles se asignaron en función de los rangos establecidos para cada parámetro. Además, en cada nivel se evaluaron las diferentes cepas de microorganismos inoculadas. En la Tabla 9, se puede observar los casos de supervivencia para cada nivel, se consideró como un caso de supervivencia todo tratamiento en el cual su valor de diferencia entre los días 0 y 15 de $\Delta\text{DO}_{590\text{nm}} > 0,05$ (Apartado 3.3.2).

Los niveles que presentaron mayor porcentaje de supervivencia (100 %) son aquellos en los que los 9 microorganismos toleraron concentraciones de alcohol de 0; 2,5 y 5 % ABV; valores de pH de 4,1; 4,4 y 4,7; de amargor de 10, 15, 20 y 30 BU y de extracto fermentable por levaduras todos sus niveles. Mientras que el nivel en el que se observó menores casos de supervivencia fue a pH 3,2 y 12 % ABV ya que solamente creció uno de los 9 microorganismos

evaluados (*D. bruxellensis* CIAL-H2).

Tabla 9. Casos de supervivencia de microorganismos a diferentes niveles de parámetros físico-químicos de cerveza

Variable	Nivel	CS (%)	Variable	Nivel	CS (%)
ABV (%)	0	100	pH	4,7	100
ABV (%)	2,5	100	Amargor (BU)	10	100
ABV (%)	5	100	Amargor (BU)	15	100
ABV (%)	7,5	50	Amargor (BU)	20	100
ABV (%)	10	44	Amargor (BU)	30	100
ABV (%)	12	11	Amargor (BU)	40	67
pH	3,2	11	Amargor (BU)	50	67
pH	3,5	67	YFE (%)	0,76	100
pH	3,8	89	YFE (%)	1,16	100
pH	4,1	100	YFE (%)	1,96	100
pH	4,4	100	YFE (%)	2,36	100

CS: casos de supervivencia

4.3.2. Casos de supervivencia en cervezas artesanales comerciales

Este modelo estadístico se realizó con la evaluación de 135 tratamientos distintos, obtenidos de las 17 cervezas inoculadas con 8 microorganismos. En la Figura 15, se puede observar el porcentaje de casos de supervivencia para cada cerveza evaluada, que corresponden a aquellos en los que las células viables fueron mayores a 10 UFC mL⁻¹ después de 30 d de almacenamiento.

En la Figura 15, se puede observar que a pesar de pertenecer al mismo estilo existen diferencias en los casos de supervivencia de microorganismos tanto en las cervezas Strong Ale, Brown Ale, Amber Ale, Bock, Cervezas de trigo, Porter y Stout. En las cervezas IPA este comportamiento no se observó ya que sobrevivieron 3 de los 8 microorganismos: CIAL-H2, CIAL-BL1, CECT 216, que son considerados como los principales agentes contaminantes en cerveza (Hill y Priest, 2018).

A partir de esta información, se analizó mediante un modelo de regresión logística binaria la posible relación existente entre los parámetros físico-químicos (variables independientes) y crecimiento de microorganismos (variable dependiente). Para lo cual, se asignó el índice 1 a todos los casos en los que hubo supervivencia de microorganismos, que se consideraran como

cervezas susceptibles al crecimiento microbiano y 0 a los casos contrarios que se consideran como cervezas con baja susceptibilidad al crecimiento microbiano. Asignar estos niveles dicotómicos fue útil para predecir la probabilidad de que ocurra un suceso, en este caso el crecimiento de microorganismos potencialmente dañinos, lo cual permitió construir la herramienta que determine la susceptibilidad a la contaminación de una cerveza

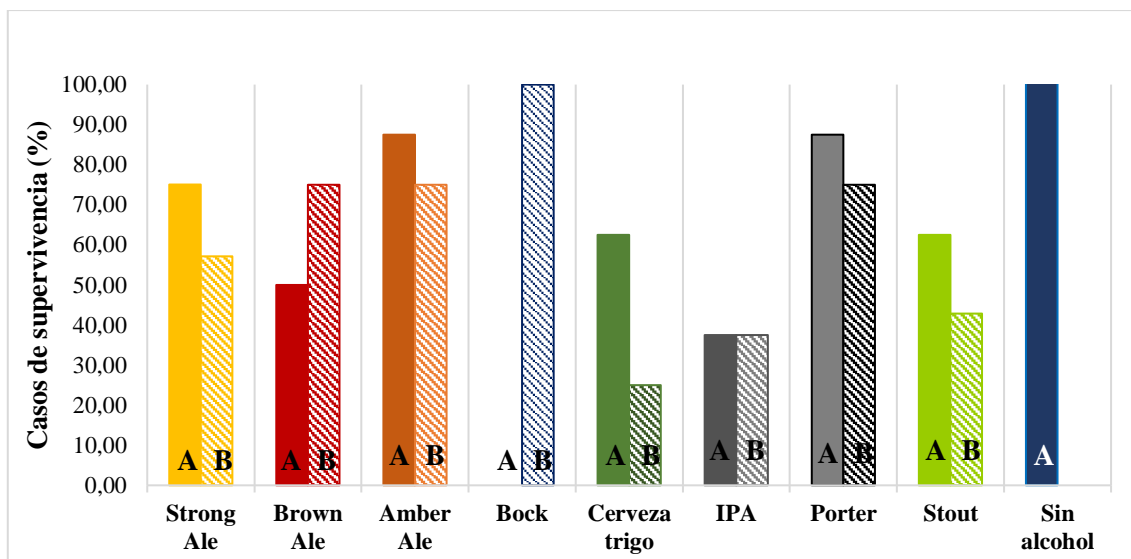


Figura 15. Casos de supervivencia de un total de 8 inoculaciones artificiales en 17 cervezas artesanales de estilos diferentes después de 30 días de almacenamiento a 28 °C

A continuación, se detalla el proceso de estimación del modelo de regresión logística binaria diseñado en función de los resultados de los dos ensayos de desafío microbiológico detallados anteriormente.

4.3.3. Estado de multicolinealidad entre variables independientes

Para utilizar el modelo de regresión logística binomial primero debe cumplir las pruebas de no-multicolinealidad entre variables independientes, ya que la multicolinealidad provoca inestabilidad al calcular los predictores individuales del modelo (Midi y col. , 2010). Por ello, se determinó la relación de multicolinealidad entre el amargor, pH, % YFE y % ABV, mediante el coeficiente de correlación de Pearson, parámetros de tolerancia, factor de inflación de varianza (VIF) e índice de condición.

De acuerdo con el análisis de correlación de Pearson, en ninguno de los tres casos (A, B y C), existieron casos de multicolinealidad perfecta entre variables (coeficientes cercanos a 1 o -1), pero si hubo casos de correlación significativa en el nivel de significación $p < 0,01$. Por lo cual, se analizaron los índices de condición, tolerancia y VIF. En los tres casos los índices de

condición determinados para % YFE fueron superiores a 30, sin embargo dos de tres variables no presentaron proporción de varianza superior a 0,50, debido a esto ninguna de las variables presentaría multicolinealidad severa, así como lo describen González y col. (2013). Esto coincide con el análisis realizado respecto a la tolerancia y VIF, donde Midi y col. (2010), mencionan que se considera presencia de colinealidad severa cuando la tolerancia de las variables es $< 0,1$ el $VIF > 2,5$, y como se observa en la Tabla 10 las variables no cumplen con esta condición. Por lo tanto, para la elaboración del modelo se consideraron las 4 variables independientes y sus respectivas interacciones.

Tabla 10. Estadística de colinealidad para los tres casos de análisis

Parámetros fisico-químico	Casos					
	A		B		C	
	Tolerancia	VIF	Tolerancia	VIF	Tolerancia	VIF
% ABV	0,700	1,429	0,707	1,415	0,888	1,127
BU	0,460	2,172	0,765	1,307	0,762	1,312
pH	0,754	1,326	0,592	1,690	0,799	1,252
% YFE	0,448	2,234	0,917	1,091	0,954	1,048

Casos de análisis **A:** sustratos modificados de cerveza; **B:** cervezas comerciales; **C:** combinación de los resultados de los dos ensayos

4.3.4. Estimación del modelo logístico binario

. Después de analizar la capacidad de predicción del modelo ajustado con diferentes puntos de corte mediante el software Statgraphics Centurion X, en los casos A y B se modificó el punto de corte del Software IBM SPSS Statistics que por defecto asigna al valor de 0,5, a un valor de 0,45; y en el caso C se conservó el valor de 0,5.

Una vez establecidos estos parámetros, se efectuaron análisis de contrastes de la regresión, ajuste del modelo, tablas de clasificación y se determinó las variables en la ecuación.

- **Contraste de la regresión**

Este factor se evaluó con la prueba ómnibus de coeficientes de modelo, el cual indicó que las variables independientes si permiten predecir el crecimiento de los microorganismos potencialmente alterantes en la cerveza y que el modelo es estadísticamente significativo ($p < 0,05$).

- **Ajuste del modelo**

La bondad de ajuste de los tres modelos se evaluó con los parámetros R^2 de Cox-nell, R^2 de Nagelkerke y con la prueba de Hosmer y Lemeshow. Los valores de R^2 , no tienen el mismo significado que en una regresión lineal, ya que son indicadores del incremento de verosimilitud y permiten comparar entre modelos y seleccionar el modelo cuyo valor sea más cercano a 1, para los tres casos en la Tabla 11 se puede observar cuales fueron los mejores valores que se obtuvieron después del proceso de iteración. El valor de R^2 de Nagelkerke, indica que el modelo que se obtiene con los datos del caso A explican el 65 % de la varianza en la susceptibilidad a contaminación microbiana, el caso B el 24 % y el caso C el 41 %.

Debido a que los dos parámetros de R^2 no permiten tener una idea completa del ajuste del modelo, se realizó la prueba de Hosmer y Lemeshow, cuya hipótesis nula plantea que el modelo se ajusta a la realidad, es decir que los valores pronosticados coinciden con los valores observados. Como se observa en la Tabla 11 en los tres casos se obtuvo un valor de $p \geq 0,05$, en consecuencia, se acepta la hipótesis nula y se podría considerar que los tres modelos presentan un nivel adecuado de ajuste.

Tabla 11. Resumen del modelo determinado por SPSS

Caso	R^2 de Cox y Snell	R^2 de Nagelkerke	Valor-p HL
A	0,40	0,65	0,783
B	0,18	0,24	0,068
C	0,28	0,41	0,133

- **Tablas de clasificación**

De acuerdo con los datos de la tabla de clasificación con un nivel de confianza del 95 %, se determinó para el caso A que 90 % de casos fueron pronosticados adecuadamente con el modelo probabilístico empleado, en el caso B un 74 % y en el caso C un 83 %. Con la información de las tablas de clasificación se pudo obtener la sensibilidad y especificidad de cada uno de los modelos, los mismos que se indican en la Tabla 12.

Según Núñez y col. (2011), se considera un modelo aceptable cuando estos dos indicadores son superiores a 75 %, por lo tanto el modelo obtenido en el caso A se ajusta bien a este. Sin embargo, Morell (2013), menciona que pruebas con alta sensibilidad como estos tres casos de análisis pueden ser útiles en pruebas diagnósticas.

Los valores predictivos positivos (VPP) permitirían conocer en particular cuál es la probabilidad de que una cerveza que ha sido categorizada como susceptible a contaminación cumpla con esta condición; y mediante los valores predictivos negativos (VPN) conocer cuál es la probabilidad de acierto en aquellas cervezas que no han sido consideradas como susceptibles (Morell, 2013). En la Tabla 12, se puede observar que los VPP son superiores a los VPN en los tres modelos, este comportamiento ha sido aceptado al diseñar el modelo ya que, de todos los casos posibles analizados con los puntos de corte, permitirían un menor riesgo desde el punto de vista de la seguridad alimentaria y a la vez evitar una pérdida económica innecesaria al dar de baja o poner en cuarentena un lote de producto sin contaminación.

Tabla 12. Parámetros de sensibilidad, especificidad y valores predictivos de los modelos

Casos	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Valores predictivos (%)	
			Positivo	Negativo
A	92	78	96	60
B	77	67	82	61
C	87	71	91	60

- **Variables en la ecuación**

El software estadístico permite obtener los coeficientes que forman parte de la ecuación de regresión logística, que corresponden a los valores señalados en la Tabla 13. Además, se puede observar que la validación que se hace con la prueba Chi-cuadrado de Wald es significativo para las variables independientes y para la constante de los tres casos analizados ($p < 0,05$).

Al comparar entre sí, los valores de Odd ratio o Exp (B), detallados en la Tabla 13, se observa en los tres casos, que el pH tiene el valor más alto, por lo cual tiene mayor influencia sobre la variable de respuesta (susceptibilidad al crecimiento microbiano). Por otro lado, el valor de Odd ratio, para el amargor y el alcohol en el caso A y C, cuando no se consideran las interacciones entre variables, es menor a 1 (Tabla 13), esto indicaría que un aumento en estas variables reduce la susceptibilidad de cervezas al crecimiento o supervivencia de microorganismos. Por último, en el caso del pH, el valor es superior a 1, lo que indica que un aumento en esta variable podría incrementar el riesgo de crecimiento de microorganismos, es decir, incrementa la susceptibilidad de la contaminación en las cervezas.

El pH tiene mayor influencia sobre la variable de respuesta debido a que los agentes contaminantes evaluados pueden adaptarse a las condiciones de amargor mediante procesos de

acondicionamiento progresivos a los α -isoácidos, como los efectuados en esta experimentación. De igual manera pueden ser más o menos resistentes según el origen de aislamiento. Respecto al contenido en alcohol, existen *Lactobacillus* spp. que pueden tolerar valores de alcohol inferiores al 16 %, pero no toleran valores bajos de pH ya que sus valores óptimos están en un rango de 6 – 7, a pesar de ser capaces de regular su pH intracelular frente a condiciones ácidas mediante el transporte de protones. También se debe considerar que a medida que el pH decrece la actividad antimicrobiana de los α -isoácidos puede aumentar (de Angelis y Gobbetti, 2011; Suzuki y col. , 2008)

Tabla 13. Variables incluídas en los modelos de regresión logística del caso A, B y C para predecir la susceptibilidad a la contaminación microbiana en cerveza artesanal

Casos	Párametros	Coefficientes	Error estándar	Wald	Sig.	Exp(B)
A	Constante	-21,926	4,339	25,541	0	0
	% ABV	-0,631	0,111	32,05	0	0,532
	BU	-0,212	0,042	25,552	0	0,809
	pH	7,112	1,314	29,304	0	1227,194
B	pH	1,763	0,686	6,606	0,01	5,832
	BU · %YFE · pH	0,012	0,005	6,876	0,009	1,012
	BU · %YFE · pH · %ABV	-0,002	0,001	14,372	0	0,998
	Constante	-6,363	2,839	5,024	0,025	0,002
C	Constante	-9,608	2,03	22,397	0	0
	% ABV	-0,346	0,049	50,429	0	0,708
	BU	-0,042	0,01	16,834	0	0,959
	pH	3,161	0,54	34,306	0	23,584

Los valores de los coeficientes determinados en la Tabla 13, permitieron constituir los tres modelos predictivos de susceptibilidad de contaminación de cervezas artesanales al reemplazar las funciones detalladas en la Tabla 14, en la función logística:

$$P(y) = \frac{1}{1 + e^{-y}}$$

Tabla 14. Funciones de predicción de susceptibilidad a la contaminación microbiana de los casos de análisis A, B y C

Casos	Funciones de predicción de susceptibilidad a la contaminación microbiana
A	$Y = -21,926 - 0,631 \% ABV - 0,212 BU + 7,112 pH$
B	$Y = -6,363 + 1,763 pH + 0,012 (BU \cdot \%YFE \cdot pH) - 0,002 (BU \cdot \%YFE \cdot pH \cdot \%ABV)$
C	$Y = -9,608 - 0,346 \% ABV - 0,042 BU + 3,161 pH$

4.3.5. Validación de los modelos probabilísticos que determinan la susceptibilidad de crecimiento de microorganismos en cervezas artesanales

Después de obtener la probabilidad de contaminación de las 10 cervezas y clasificarlas según sus puntos de corte (A: 0,45; B: 0,45 y C: 0,5). Se categorizó como una cerveza susceptible a la contaminación microbiana si la probabilidad era mayor al punto de corte y si era inferior a este límite se clasificó como una cerveza con bajo riesgo de contaminación. Se obtuvieron los casos pronosticados y se compararon con los casos observados después de la clasificación dicotómica según la $\Delta DO_{590nm} > 0,05$ después de 15 días de inoculación, y se determinaron los porcentajes de aciertos (Tabla 15). Se puede observar que con el modelo A se obtiene el menor porcentaje de aciertos, ya que dos cervezas que podrían ser susceptibles a contaminación, el modelo las categorizó como no susceptibles, mientras que con los modelos B y C se acertaron en las dos categorías.

Tabla 15. Tabla de clasificación de valores observados-pronosticados de los tres modelos obtenidos

Modelo	Observado	Pronosticado		
		Valor		Porcentaje correcto
		NSC	SC	
A	No susceptible a contaminación (NSC)	1	2	33
	Susceptible a contaminación (SC)	0	7	100
	Porcentaje global			80
B	No susceptible a contaminación (NSC)	1	0	100
	Susceptible a contaminación (SC)	0	9	100
	Porcentaje global			100
C	No susceptible a contaminación (NSC)	1	0	100
	Susceptible a contaminación (SC)	0	9	100
	Porcentaje global			100

Debido a que el modelo A, requiere de un ajuste para incrementar su predictibilidad por los falsos negativos y que el modelo B presentó como R^2 de Nagelkerke solo un 24 %, se seleccionó el modelo C para desarrollar la herramienta de predicción de susceptibilidad a contaminación en cerveza artesanal. Para incrementar su utilidad se realizó otra categorización en base con la probabilidad determinada por el modelo, que se puede observar en la Figura 16.

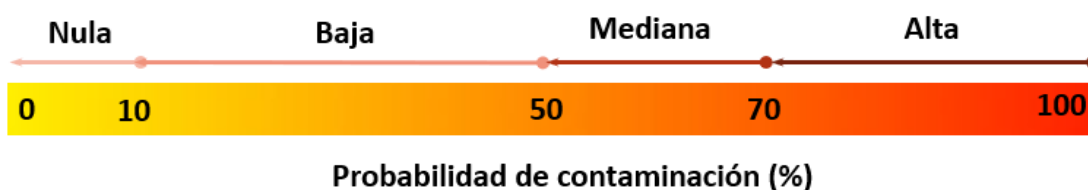


Figura 16. Rango de clasificación de probabilidades de contaminación en base al modelo C

Mediante la escala de probabilidad de contaminación se clasificó las 10 cervezas usadas como muestras para la validación del modelo, cuyos resultados se detallan en la Tabla 16.

Tabla 16. Probabilidades pronosticadas de 10 cervezas artesanales y su categorización de susceptibilidad de crecimiento

Cerveza	% ABV	BU	pH	% YFE	Probabilidad pronosticada (%)	Categoría
1	4,5	33	4,68	0,67	90,40	Alta
2	0,04	30	4,15	2,88	90,35	Alta
3	4,7	18	4,50	0,91	90,33	Alta
4	4,5	30	4,63	0,24	90,12	Alta
5	6	30	4,61	0,21	83,59	Alta
6	4,9	33	4,49	0,72	81,81	Alta
7	5,2	30	4,32	0,88	72,88	Alta
8	7	26	4,46	1,65	72,63	Alta
9	5,1	44	4,44	1,63	69,30	Mediana
10	6,5	10	3,47	0,96	21,28	Baja

De acuerdo con la herramienta, la máxima probabilidad es otorgada a la cerveza con el más alto valor de pH, esto pudo ser provocado por lo mencionado en el apartado 4.3.4 al analizar el Odd ratio dónde se observó que la variable pH tiene mayor influencia en el modelo. En segundo lugar se encuentra la cerveza sin alcohol, ya que si la presencia de etanol es mínima no se van a producir los efectos antimicrobianos sobre las BAL, principalmente la modificación de los

procesos metabólicos citoplasmáticos (Bergsveinson y Ziola, 2017),

En tercer lugar, se encuentra una de las cervezas con menor valor de amargor (18 BU) y en cuarto lugar una cerveza con un valor de pH más alto. En ambas, probablemente debido al bajo contenido de alcohol los efectos antimicrobianos y la muerte celular se ven disminuidos (Bergsveinson y Ziola, 2017; Pittet y col. , 2011). La quinta, con el mismo valor de amargor que la cuarta, presenta menor susceptibilidad, esto pudo ser causado por el mayor contenido de alcohol (6 % ABV) y de forma similar en la sexta cerveza la probabilidad de susceptibilidad a la contaminación se pudo reducir por el valor de pH inferior a la cuarta y quinta cerveza.

En la séptima cerveza la susceptibilidad a la contaminación microbiana se pudo reducir por la influencia del contenido de alcohol, ya que presenta un valor superior a la sexta cerveza, mientras que la octava cerveza a pesar de tener un pH similar al de la sexta cerveza presenta un menor amargor (26 BU)

En noveno lugar se clasificó con un riesgo moderado una cerveza con pH cercano al anterior (4,44) pero que presenta el valor más alto de amargor. De acuerdo con Behr y Vogel (2010), el efecto inhibitor del lúpulo también se ve influenciado por el valor de pH, ya que a valores bajos de pH los compuestos del lúpulo pueden provocar daños celulares en los microorganismos. En último lugar se clasificó la cerveza artesanal que presenta el valor de pH más bajo (3,47) esto concuerda con el efecto inhibitorio de valores de $\text{pH} < 4$ descrito por Menz, Vriesekoop, y col., (2010).

Después de la evaluación y validación experimental del modelo se puede evidenciar que concuerda con el comportamiento experimental de diferentes microorganismos que mediante cambios en la composición y perfil físico-químico provocan deterioro en la cerveza, y que por sus valores de predicción acertada el modelo diseñado puede ser utilizado como una herramienta de prevención durante el envasado de las cervezas. Sus aplicaciones tanto en el producto como en la línea de embotellado pueden servir en la práctica para la evaluación de la seguridad microbiológica y detección de puntos problemáticos de forma robusta y sensible, permitiendo la toma consciente de decisiones en un momento crítico en el que los productores focalizan su confianza, y en el que hacen realidad la salida al mercado del producto final.

5. CONCLUSIONES

En base a los objetivos planteados en este trabajo experimental, se puede concluir lo siguiente:

- El acondicionamiento mediante cultivos progresivos en diferentes medios líquidos, preparados por la combinación de cerveza y una bebida no alcohólica a base de malta, permitió la adaptación de nueve microorganismos, 8 cepas de BAL y una cepa de levadura, en un medio similar a la cerveza (4 %ABV, 9,4 BU, 1,73 % YFE: y pH: 4,5).
- La fase estacionaria temprana en las curvas de crecimiento de *D. bruxellensis*, *Lactobacillus brevis*, *L. plantarum*, *L. paracasei* se alcanzó después de 85 h, mientras que *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *L. citreum* y *P. pentosaceus* después de 91 h.
- La evaluación de parámetros físico-químicos de las 20 cervezas artesanales seleccionadas, dos por cada estilo (Strong Ale, Brown Ale, Pale Ale, Amber Ale, Bock, Cerveza de trigo, Indian Pale Ale, Porter, Sin alcohol y Stout) permitió establecer los rangos de pH (3,14 – 4,70), alcohol (0,25 - 12 %), amargor (9-75 BU) y extracto fermentable por levaduras (0,19 – 3,05 %.), abarcando estos la mayor parte de los valores de estos parámetros intrínsecos de la cerveza comercial.
- Los modelos de regresión logístico binario diseñados para evaluar la susceptibilidad al crecimiento de agentes microbianos en cerveza, confieren una mayor influencia a los valores de pH que a los de alcohol y amargor sobre la variable de respuesta.
- El valor del indicador Odd ratio obtenido a partir del análisis estadístico, con el test Chi-cuadrado de Wald, permitió establecer que incrementos en los valores de amargor y de alcohol y/o descensos del valor de pH reducen la susceptibilidad de cervezas al crecimiento o supervivencia de microorganismos.
- Tras la validación en 10 cervezas artesanas de los tres modelos estadísticos de regresión logístico binario, ajustados con datos experimentales de pH, amargor y alcohol; se seleccionó el tercer modelo cuya función logística es $P(y) = \frac{1}{1+e^{-y}}$; $Y = -9,608 - 0,346 \% ABV - 0,042 BU + 3,161 pH$. Este modelo permite determinar la susceptibilidad a la contaminación de la cerveza con una sensibilidad del 87 % y una especificidad del 71 %, lo que indica que es un modelo adecuado y robusto.

6. BIBLIOGRAFÍA

- American Society of Brewing Chemists (ASBC). (2005). *Tables related to determinations on wort, beer, and brewing sugars and syrups* (3ra ed.). San Paul: American Society of Brewing Chemists
- American Society of Brewing Chemists (ASBC). (2008a). Beer-1A *Preparation of sample for chemical and physical analysis* (9na ed.). Saint Paul, Estados Unidos
- American Society of Brewing Chemists (ASBC). (2008b). Beer-3 *Apparent extract* (9na ed.). Saint Paul, Estados Unidos
- American Society of Brewing Chemists (ASBC). (2008c). Beer-8A *Total acidity by potentiometric titration* (9na ed.). Saint Paul, Estados Unidos
- American Society of Brewing Chemists (ASBC). (2008d). Beer-10A *Spectrophotometric color method* (9na ed.). Saint Paul, Estados Unidos
- American Society of Brewing Chemists (ASBC). (2008e). Beer-16 *End fermentation (Yeast Fermentable extract)* (9na ed.). Saint Paul, Estados Unidos
- American Society of Brewing Chemists (ASBC). (2008f). Beer-23A *Bitterness Units (BU)* (9na ed.). Saint Paul, Estados Unidos
- American Society of Brewing Chemists (ASBC). (2008g). Microbiological Control–2C *Membrane Filtracion* (9na ed.). Saint Paul, Estados Unidos
- Aoudia, N., Rieu, A., Briandet, R., Deschamps, J., Chluba, J., Jego, G., Garrido, C., y Guzzo, J. (2016). Biofilms of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus fermentum*: Effect on stress responses, antagonistic effects on pathogen growth and immunomodulatory properties. *Food Microbiology*, 53, 51-59. doi: 10.1016/j.fm.2015.04.009
- Asano, S., Suzuki, K., Iijima, K., Motoyama, Y., Kuriyama, H., y Kitagawa, Y. (2007). Effects of morphological changes in beer-spoilage lactic acid bacteria on membrane filtration in breweries. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 104(4), 334-338. doi: 10.1263/jbb.104.334
- Baxter, E., y Hughes, P. (2001). *Beer: Quality, safety and nutritional aspects* (1ra ed.). Cambridge: Royal Society of Chemistry
- Behr, J., Gänzle, M. G., y Vogel, R. F. (2006). Characterization of a highly hop-resistant *Lactobacillus brevis* strain lacking hop transport. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(10), 6483-6492. doi: 10.1128/AEM.00668-06
- Behr, J., y Vogel, R. (2010). Mechanisms of hop inhibition include the transmembrane redox reaction. *Applied Environmental Microbiology*, 76(1), 142-149. doi: 10.1128/AEM.01693-09
- Benedicty, C. (2016). Dissolved gases. En C. Bamforth (Ed.), *Brewing materials and processes: A practical approach to beer excellence* (pp. 157-174). California: Elsevier

- Bergsveinson, J., y Ziola, B. (2017). Investigation of beer spoilage lactic acid bacteria using omic approaches. En N. Bokulich y C. Bamforth (Eds.), *Brewing Microbiology* (pp. 245-274). Norfolk: Caister Academic Press
- Blomqvist, J., Nogué, V. S., Gorwa-Grauslund, M., y Passoth, V. (2012). Physiological requirements for growth and competitiveness of *Dekkera bruxellensis* under oxygen-limited or anaerobic conditions. *Yeast*, 29(7), 265-274. doi: 10.1002/yea.2904
- Briggs, D., Brookes, P., Stevens, R., y Boulton, C. (2004). *Brewing: science and practice* (1ra ed.). Cornwall: CRC Press
- Busta, F., Prince, G., Bernard, D., Gravani, R., Hall, P., Pierson, M., Schaffner, D., Swanson, K., Woodwards, B., y Yiannas, F. (2003). Chapter VI. Microbiological challenge testing. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2, 46-50. doi: 10.1111/j.1541-4337.2003.tb00051.x
- Cerveceros de España. (2019). Informe socioeconómico del sector de la cerveza en España. Madrid, España: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación
- D'Angelo, L., Cicotello, J., Zago, M., Guglielmotti, D., Quiberoni, A., y Suárez, V. (2017). *Leuconostoc* strains isolated from dairy products: response against food stress conditions. *Food Microbiology*, 66, 28-39. doi: 10.1016/j.fm.2017.04.001
- Daniels, R. (2000). *Designing great beers: The ultimate guide to brewing classic beer styles* (2da ed.). Colorado: Brewers Publications
- de Angelis, M., y Gobbetti, M. (2011). Stress Response of *Lactobacilli*. In Stress Responses of Lactic Acid Bacteria. En E. Tsakalidou y K. Papadimitriou (Eds.), *Food Microbiology and Food Safety* (pp. 219-249). Boston: Springer
- dos Santos, G., Dal Magro, J., Mazutti, M., Oliveira, J., Di Luccio, M., Zobot, G., y Tres, M. (2019). Microfiltration for Filtration and Pasteurization of Beers. En A. Grumezescu y A. Holban (Eds.), *Engineering Tools in the Beverage Industry* (pp. 405-434). Cambridge: Elsevier
- Garavaglia, C., y Castro, D. (2018). The recent advent of micro producers in the Spanish brewing industry. En C. Garavaglia y J. Swinnen (Eds.), *Economic Perspectives on Craft Beer* (pp. 345-372). Cham: Springer
- González, C., Lise, A., y Felpeto, A. (2013). *Tratamiento de datos con R, Statistica y SPSS* (1ra ed.). Madrid: Ediciones Díaz de Santos
- Hill, A. (2018). Traditional methods of detection and identification of brewery spoilage organisms. En G. Stewart, I. Russell y A. Anstruther (Eds.), *Handbook of brewing* (pp. 530-545). Florida: CRC Press
- Hill, A., y Priest, F. (2018). Microbiology and microbiological control in the brewery. En G. Stewart, I. Russell y A. Anstruther (Eds.), *Handbook of Brewing* (pp. 530-545). Florida: CRC Press

- Hughes, P. (2018). The Stability and stabilization of beer. En M. Bordiga (Ed.), *Post-Fermentation and Distillation Technology* (pp. 159-181). Nueva York: CRC Press
- Hunter, R. A., y Dompkowski, E. J. (2018). Quantifying Beer Bitterness: An Investigation of the Impact of Sample Preparation. *Journal of Chemical Education*, 95(11), 2009-2012. doi: 10.1021/acs.jchemed.8b00420
- Informa D&B. (2019). Informe Especial basic de DBK Cervezas Artesanas (4ta ed.). Madrid, España
- Ingham, C. J., Beerthuyzen, M., y van Hylckama Vlieg, J. (2008). Population heterogeneity of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 microcolonies in response to and recovery from acid stress. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(24), 7750-7758. doi: 10.1128/AEM.00982-08
- Lewis, M., y Bamforth, C. (2006). *Essays in brewing science* (1ra ed.). California: Springer Science
- Li, Q., Wang, J., y Liu, C. (2017). Beers. En A. Pandey, M. Sanromán, G. Du, C. Socol y C. Dussap (Eds.), *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* (pp. 305-353). California: Elsevier
- Liu, S. (2015). Impact of yeast and bacteria on beer appearance and flavour. En A. Hill (Ed.), *Brewing Microbiology* (pp. 357-374). Cambridge: Elsevier
- Menz, G., Aldred, P., y Vriesekoop, F. (2009). Pathogens in Beer. En V. Preedy (Ed.), *Beer in health and disease prevention* (pp. 403-413). Londres: Elsevier
- Menz, G., Andrighetto, C., Lombardi, A., Corich, V., Aldred, P., y Vriesekoop, F. (2010). Isolation, identification, and characterisation of beer-spoilage lactic acid bacteria from microbrewed beer from Victoria, Australia. *Journal of the Institute of Brewing*, 116(1), 14-22. doi: 10.1002/j.2050-0416.2010.tb00393.x
- Menz, G., Vriesekoop, F., Zarei, M., Zhu, B., y Aldred, P. (2010). The growth and survival of food-borne pathogens in sweet and fermenting brewers' wort. *International Journal of Food Microbiology*, 140(1), 19-25. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.02.018
- Midi, H., Sarkar, S., y Rana, S. (2010). Collinearity diagnostics of binary logistic regression model. *Journal of Interdisciplinary Mathematics*, 13(3), 253-267. doi: 10.1080/09720502.2010.10700699
- Morell, E. (2013). *Bioestadística básica para investigadores con SPSS* (1ra ed.). Madrid: Bubok
- Mosher, R. (2015). *Mastering Homebrew: The complete guide to brewing delicious beer* (1ra ed.). California: Chronicle Books
- Navarro, J. M., Tormo, A., y Martínez-García, E. (2010). Stationary phase in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(4), 476-495. doi: 10.1111/j.1574-6976.2010.00213.x

- Nghe, D., y Nguyen, T. (2014). Characterization of antimicrobial activities of *Pediococcus pentosaceus* Vtcc-B-601. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 4(5), 61-64. doi: 10.7324/JAPS.2014.40511
- Núñez, E., Steyerberg, E., y Núñez, J. (2011). Estrategias para la elaboración de modelos estadísticos de regresión. *Revista Española de Cardiología*, 64(6), 501-507. doi: 10.1016/j.recesp.2011.01.019
- J Palmer, J. (2017). *How to brew: everything you need to know to brew beer right the first time* (4ta ed.). Boulder: Brewers Publications
- Pittet, V., Morrow, K., y Ziola, B. (2011). Ethanol tolerance of lactic acid bacteria, including relevance of the exopolysaccharide gene *gtf*. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 69(1), 57-61. doi: 10.1094/ASBCJ-2011-0124-01
- Podpora, B., Swiderski, F., Sadowska, A., Piotrowska, A., y Rakowska, R. (2015). Spent brewer's yeast autolysates as a new and valuable component of functional food and dietary supplements. *Journal of Food Processing & Technology*, 6(12), 1-5. doi: 10.4172/2157-7110.1000526
- Powell, C., y Kerruish, D. (2017). Beer-spoiling yeasts: genomics, detection, and control. En N. Bokulich y C. Bamforth (Eds.), *Brewing Microbiology: current research, omics and microbial ecology* (pp. 289-327). Norfolk: Caister Academic Press
- Real Decreto 678/2016, de 16 de diciembre por el que se aprueba la norma de calidad de la cerveza y de las bebidas de malta. Boletín Oficial del Estado. Madrid 16 de diciembre 2016, núm. 304, pp. 88520-88524.
- Roberts, T. (2016). Hops. En C. Bamforth (Ed.), *Brewing materials and processes* (pp. 47-75). California: Elsevier
- Rouse, S., y van Sinderen, D. (2008). Bioprotective potential of lactic acid bacteria in malting and brewing. *Journal of Food Protection*, 71(8), 1724-1733. doi: 10.4315/0362-028X-71.8.1724
- Russell, A. (2003). Challenge testing: principles and practice. *International Journal of Cosmetic Science*, 25(3), 147-153. doi: 10.1046/j.1467-2494.2003.00179.x
- Sadler, G. D., y Murphy, P. A. (2017). pH and titratable acidity. En S. Nielsen (Ed.), *Food Analysis* (pp. 219-238). New York: Springer, Cham
- Sakamoto, K., y Konings, W. N. (2003). Beer spoilage bacteria and hop resistance. *International Journal of Food Microbiology*, 89(2-3), 105-124. doi: 10.1016/S0168-1605(03)00153-3
- SCIMAT. (2019). *Leuconostoc lactis*. Recuperado de <https://www.sciencesource.com/archive/Leuconostoc-lactis-SS2108401.html>
- Schifferdecker, A. J., Dashko, S., Ishchuk, O. P., y Piškur, J. (2014). The wine and beer yeast

Dekkera bruxellensis. *Yeast*, 31(9), 323-332. doi: 10.1002/yea.3023

- Sheahan, T. (2016). *Pediococcus*: Friend and Foe. Recuperado de <https://www.brewersjournal.info/pediococcus-friend-and-foe/>
- Spedding, G. (2016). Alcohol and Its Measurement. En C. Bamforth (Ed.), *Brewing materials and processes: A practical approach to beer excellence* (pp. 123-150). Lexington: Elsevier
- Stewart, G., y Priest, F. (2011). Beer shelf life and stability. En D. Kilcast y P. Subramaniam (Eds.), *Food and Beverage Stability and Shelf Life* (pp. 527-539). Cambridge: Woodhead Publishing
- Suzuki, K. (2012). 125th Anniversary review: Microbiological instability of beer caused by spoilage bacteria. *Journal of the Institute of Brewing*, 117(2), 131-155.
- Suzuki, K. (2015). Gram-positive spoilage bacteria in brewing. En A. Hill (Ed.), *Brewing Microbiology* (pp. 140-173). Cambridge: Elsevier
- Suzuki, K., Asano, S., Iijima, K., y Kitamoto, K. (2008). Sake and beer spoilage lactic acid bacteria—A review. *Journal of the Institute of Brewing*, 114(3), 209-223. doi: 10.1002/j.2050-0416.2008.tb00331.x
- Tang, K., y Li, K. (2016). Biochemistry of wine and beer fermentation. En C. Larroche, M. Sanroman, G. Du y A. Pandey (Eds.), *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Food and Beverages Industry* (pp. 281-303). Oxford: Elsevier
- Teixeira. (2014). *Lactobacillus: Lactobacillus brevis*. En C. Batt y M. Tortorello (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology* (pp. 418-424). Londres: Elsevier
- Ziola, B., y Bergsveinson, J. (2017). Brewery-and beer spoilage-related Gram-negative Bacteria: The unpleasant, the malodorous and the outright fetid. En N. Bokulich y C. Bamforth (Eds.), *Brewing Microbiology* (pp. 275-288). Norfolk: Caister Academic Press